

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 983 916**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)
A61K 35/761 (2015.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)
C07K 16/40 (2006.01)
C12N 15/861 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.08.2017** **PCT/EP2017/071674**
87 Fecha y número de publicación internacional: **08.03.2018** **WO18041838**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.08.2017** **E 17771344 (3)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.04.2024** **EP 3503919**

54 Título: **Adenovirus armado con acoplador de célula T biespecífica**

30 Prioridad:

29.08.2016 GB 201614607
13.01.2017 GB 201700663
19.04.2017 GB 201706219
28.08.2017 GB 201713765

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
28.10.2024

73 Titular/es:

AKAMIS BIO LIMITED (100.0%)
Akamis House 4-10 The Quadrant, Barton Lane
Abingdon, Oxfordshire OX14 3YS, GB

72 Inventor/es:

CHAMPION, BRIAN, ROBERT;
BROMLEY ALICE, CLAIRE, NOEL;
FREEDMAN, JOSHUA, DAVID;
FISHER, KERRY, DAVID y
SEYMOUR, LEONARD, WILLIAM

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 983 916 T3

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

DESCRIPCIÓN

Adenovirus armado con acoplador de célula T biespecífica

- 5 La presente divulgación se refiere a un adenovirus modificado, en particular Enadenotucirev (EnAd), armado con un acoplador de célula T biespecífica que comprende al menos dos dominios de unión, en el que al menos uno de los dominios es específico para un antígeno de superficie en una célula T de interés. La divulgación se refiere adicionalmente a una composición, tal como una formulación farmacéutica que comprende el virus, uso del virus y formulaciones de virus, particularmente en el tratamiento, especialmente en el tratamiento de cáncer.
- 10 La divulgación también se extiende a procesos para preparar el virus y ADN que codifica lo mismo.

Antecedentes

- 15 El cáncer sigue siendo una enorme carga social para la sociedad en términos de las dificultades y el sufrimiento de los pacientes y sus seres queridos, y también en términos del alto coste financiero de tratar, cuidar y apoyar a los pacientes.

- 20 Se ha desarrollado una gran variedad de terapias para el tratamiento del cáncer, que incluye agentes quimioterapéuticos, radioterapia y, más recientemente, productos biológicos tales como anticuerpos. La terapia basada en anticuerpos contra el cáncer se ha establecido en los últimos 15 años y es una de las estrategias más exitosas e importantes para el tratamiento de pacientes con neoplasias hematológicas malignas y tumores sólidos. Ejemplos de terapias anticancerosas basadas en anticuerpos monoclonales que se utilizan en la actualidad son rituximab, que se dirige a CD20, bevacizumab, que se dirige a VEGF, cetuximab, que se dirige a EGFR, y labetuzumab, que se dirige a CEA.

- 25 Entre los diversos formatos de anticuerpos desarrollados, los acopladores de célula T Biespecífica (BITes) son muy prometedores. Se trata de moléculas biespecíficas relativamente simples que son específicas para la subunidad CD3 ϵ del complejo TCR de una célula T y también un antígeno objetivo de interés, tal como un antígeno de cáncer. Dado que los acopladores de célula T Biespecífica son específicos para el complejo TCR, esto permite que los acopladores de célula T Biespecífica activen las células T residentes para destruir las células que expresan un antígeno objetivo particular sobre su superficie celular, por ejemplo, las células cancerosas. Una propiedad importante de los acopladores de célula T Biespecífica es su capacidad para hacer que las células T CD4 $^{+}$ y CD8 $^{+}$ no activadas se dirijan a las células cancerosas. En otras palabras, se puede hacer que las células T activadas por los Acopladores de célula T Biespecífica destruyan las células independientemente de la expresión de MHC sobre la superficie celular. Esto es importante porque algunas células tumorales regulan a la baja el MHC, lo que las hace resistentes a agentes tales como las células CAR-T y los immTAC.

- 40 Desafortunadamente, los acopladores de célula T Biespecífica tienen una cinética de circulación pobre en relación con los anticuerpos de longitud completa. Esto significa que cuando se administran al paciente, una gran proporción de los acopladores de célula T Biespecífica no llegan a sus células objetivo. Además, el uso de ScFv anti-CD3 de alta afinidad como parte del acoplador de célula T Biespecífica puede conducir a una fuerte unión a las células T en la sangre, lo que también interfiere con el suministro al tumor. Como resultado, los acopladores de célula T Biespecífica no pueden alcanzar su máximo potencial como terapia anticancerígena porque no se pueden administrar de manera efectiva a las células tumorales. El documento de Alberto Fajardo Carlos et al (2015), Human Gene Therapy, vol. 26, no. 9, pp. A13-A14 describe el "acoplador de célula T Biespecífica ICOVIR15K-c", un adenovirus oncolítico que expresa un anticuerpo acoplador de célula T Biespecífica dirigido a EGFR bajo el control del promotor tardío principal.

- 50 El requisito para el suministro efectivo de agentes terapéuticos tales como los acopladores de célula T Biespecífica a las células tumorales se ha vuelto cada vez más importante, ya que se está volviendo más evidente que los tumores sólidos se protegen a sí mismos in vivo de varias maneras, por ejemplo, mediante el desarrollo de estroma alrededor del tumor. La progresión a un carcinoma se asocia con la proliferación de células epiteliales (células mitóticas) junto con el desarrollo de un estroma tumoral activado. En este caso, los componentes de la matriz extracelular (ECM), tales como los haces de colágeno, se degradan, debido al aumento del recambio. El número de células inflamatorias aumenta y los fibroblastos se diferencian en miofibroblastos, lo que resulta en su expresión de factores de crecimiento, componentes de la matriz y proteasas degradantes. La angiogénesis se mantiene, lo que resulta en un alto número de vasos tumorales permeables. Tras la activación de un estroma tumoral con angiogénesis persistente, comienza la invasión de células tumorales a través de la membrana basal degradada y los vasos sanguíneos se infiltran en el tejido tumoral.

- 60 Este estroma 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 blindo el microambiente hipóxico del tumor, que es permisivo y optimizado para el crecimiento del tumor. Existen algunas teorías que afirman que las células del estroma son una fuente de energía en el tumor.

Un gran componente del estroma tumoral son los fibroblastos, que han sido corrompidos para servir al propósito del cáncer. Otras células que infiltran el estroma son los macrófagos asociados al tumor (TAM), que son macrófagos de tipo 2 (M2) que pueden promover el crecimiento tumoral mediante la secreción de citocinas y quimiocinas, tal como la IL-10, que suprimen las respuestas inmunitarias.

Es especialmente difícil dirigir el estroma tumoral porque las células que forman el medio ambiente son células inmunitarias o de tejido conjuntivo "nativas", que se encuentran en todo el cuerpo. Por lo tanto, dirigirse a estas células con agentes terapéuticos puede provocar graves efectos fuera del objetivo.

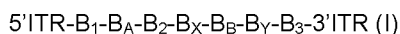
Por lo tanto, subsiste la necesidad de un método mejorado para suministrar un acoplador de célula T Biespecífica directamente a las células tumorales donde pueda proporcionar el máximo beneficio terapéutico, en particular el suministro a las células tumorales rodeadas de fibroblastos estromales.

Resumen de la invención

La invención es como se define en las reivindicaciones.

Los inventores actuales consideran que una de las formas más efectivas para suministrar los agentes terapéuticos directamente al tumor es con un adenovirus oncolítico diseñado por ingeniería para expresar agentes que activan las células T y se dirigen a un antígeno en el estroma.

De acuerdo con lo anterior, la presente divulgación proporciona un adenovirus oncolítico que comprende una secuencia de la fórmula (I):



en la que:

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

B_3 es un enlace o comprende: E4;

en la que el adenovirus codifica un Acoplador de célula T Biespecífica en la posición B_Y que comprende al menos dos dominios de unión en los que:

uno de los dichos dominios es específico a un componente del complejo receptor de células T (TCR); y

otro de los dichos dominios es específico a un antígeno estromal tumoral, en el que el adenovirus es Enadenotucirev (EnAd) o adenovirus de serotipo 11 (Ad11); y

en el que el antígeno estromal tumoral se selecciona de: proteína de activación de fibroblastos (FAP), TREM1, IGFBP7, FSP-1, receptor del factor- α de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR- α), receptor del factor- β de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR- β) y vimentina.

El acoplador de célula T Biespecífica o acopladores de célula T Biespecífica de la presente divulgación no comprenden un dominio transmembrana y por lo tanto, no se expresan en la superficie de las células cancerosas sino que comprenden una secuencia señal para facilitar la liberación de la molécula de acoplador de célula T Biespecífica a partir de la célula cancerosa. La invención se refiere a:

1. Un adenovirus oncolítico que comprende una secuencia de la fórmula (I) como se definió anteriormente, en la que:

B_1 es un enlace o comprende: E1A, E1B o E1A-E1B; B_A comprende -E2B-L1-L2-L3-E2A-L4;

B₂ 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;

5

B_B comprende L5;

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

10

B₃ es un enlace o comprende: E4;

en el que el adenovirus codifica un Acoplador de célula T Biespecífica en la posición B_y que comprende al menos dos dominios de unión en los que: uno de los dichos dominios es específico a un componente del complejo receptor de células T (TCR); y otro de los dichos dominios es específico a un antígeno estromal tumoral;

15

en el que el adenovirus es Enadenotucirev (EnAd) o adenovirus de serotipo 11 (Ad11); y en el que el antígeno estromal tumoral se selecciona de: proteína de activación de fibroblastos (FAP), TREM1, IGFBP7, FSP-1, receptor del factor-α de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR-α), receptor del factor-β de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR-β) y vimentina.

20

2. Un adenovirus de acuerdo con el párrafo 1, en el que el adenovirus es EnAd.

3. Un adenovirus de acuerdo con el párrafo 1 o 2, en el que el componente del complejo receptor de células T (TCR) es CD3, TCR-α o TCR-β.

25

4. Un adenovirus de acuerdo con el párrafo 3, en el que el componente del TCR es CD3 tal como CD3ε, CD3γ y CD3δ, en particular CD3ε.

5. Un adenovirus de acuerdo con uno cualquiera del párrafo 1 a 4, en el que uno de los dominios de unión es específico a FAP, por ejemplo una FAP que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 30.

30

6. Un adenovirus de acuerdo con uno cualquiera de los párrafos 1 a 5, en el que B_x no es un enlace.

35

7. Un adenovirus de acuerdo con uno cualquiera de los párrafos 1 a 6, en el que el adenovirus es capaz de replicación.

8. Un adenovirus de acuerdo con el párrafo 7, en el que el adenovirus es competente para replicación

40

9. Un adenovirus de acuerdo con uno cualquiera de los párrafos 1 a 6, en el que el adenovirus es deficiente en replicación

10. Un adenovirus de acuerdo con uno cualquiera de los párrafos 1 a 9, en el que B_x comprende uno o más transgenes o un casete de transgén.

45

11. Un adenovirus de acuerdo con uno cualquiera de los párrafos 1 a 10, en el que B_y comprende uno o más transgenes o un casete de transgén.

12. Un adenovirus de acuerdo con uno cualquiera de los párrafos 1 a 11, en el que el casete de transgén comprende además un elemento regulador independientemente seleccionado de:

50

a. una secuencia aceptora de empalme,

b. una secuencia de entrada interna al ribosoma o un péptido A de alta eficacia de autoescisión,

55

c. una secuencia de Kozak, y

d. combinaciones de las mismas.

60

13. Un adenovirus de acuerdo con el párrafo 12, en el que el casete de transgén comprende una secuencia de Kozak que está al inicio de la secuencia codificante de la proteína.

14. Un adenovirus de acuerdo con uno cualquiera de los párrafos 1 a 13 en el que el casete de transgén codifica un péptido A de alta eficacia de autoescisión.

65

15. Un adenovirus de acuerdo con uno cualquiera de los párrafos 1 a 14, en el que el casete de transgén comprende además una secuencia de poliadenilación.
- 5 16. Un adenovirus de acuerdo con uno cualquiera de los párrafos 1 a 15, en el que el casete de transgén comprende además un sitio de restricción en el extremo 5' de la secuencia de ADN y/o en el extremo 3' de la secuencia de ADN.
- 10 17. Un adenovirus de acuerdo con uno cualquiera de los párrafos 1 a 16, en el que el acoplador de célula T Biespecífica tiene una vida media corta, por ejemplo 48 horas o menos.
- 15 18. Un adenovirus de acuerdo con uno cualquiera de los párrafos 1 a 17, en el que el adenovirus codifica además un segundo acoplador de célula T Biespecífica.
- 20 19. Un adenovirus de acuerdo con uno cualquiera de los párrafos 1 a 18, en el que el adenovirus comprende al menos un transgén adicional, en el que el transgén adicional codifica una citocina o quimiocina o un inmunomodulador (tal como una citocina o quimiocina).
- 25 20. Un adenovirus de acuerdo con el párrafo 19, en el que la citocina o quimiocina se selecciona de MIP1 α , IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-9, IL-12, IL-13, IL-17, IL-18, IL-22, IL-23, IL-24, IL-25, IL-26, IL-27, IL-33, IL-35, IL-2, IL-4, IL-5, IL-7, IL-10, IL-15, IL-21, IL-25, IL-1RA, IFN α , IFN β , IFN γ , TNF α , linfotóxina α (LTA), Flt3L, GM-CSF, IL-8, CCL2, CCL3, CCL5, CCL17, CCL20, CCL22, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL13, CXCL12, CCL2, CCL19, CCL21, (por ejemplo, IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-9, IL-12, IL-13, IL-17, IL-18, IL-22, IL-23, IL-24, IL-25, IL-26, IL-27, IL-33, IL-35, IL-2, IL-4, IL-5, IL-7, IL-10, IL-15, IL-21, IL-25, IL-1RA, IFN α , IFN β , IFN γ , TNF α , linfotóxina α (LTA), GM-CSF, IL-8, CCL2, CCL3, CCL5, CCL17, CCL20, CCL22, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL13, CXCL12, CCL2, CCL19, CCL21), tal como IL-12, IL-18, IL-22, IL-7, IL-15, IL-21, IFN γ , TNF α , linfotóxina α (LTA), CCL3, CCL5, CXCL9, CXCL10, CXCL12, CCL2, CCL19 y CCL21.
- 30 21. Un adenovirus de acuerdo con uno cualquiera de los párrafos 1 a 20, en el que el adenovirus codifica además un inmunomodulador, tal como un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, o proteína o ligando de péptido, específico para una proteína de punto de control tal como CTLA-4, PD-1, PD-L1, PD-L2, VISTA, B7-H3, B7-H4, HVEM, ILT-2, ILT-3, ILT-4, TIM-3, LAG-3, BTLA, LIGHT o CD160, por ejemplo, CTLA-4, PD-1, PD-L1 y PD-L2, o para una molécula coestimuladora, tal como CD28, CD80, CD86, CD83, ICOS, B7H2, TL1A y 4-1BB.
- 35 22. Un adenovirus de acuerdo con uno cualquiera de los párrafos 1 a 21, en el que el acoplador de célula T Biespecífica comprende un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en una cualquiera de las SEQ ID NOs: 8 o 13 o una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la misma y un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en una cualquiera de las SEQ ID NOs: 9 o 12, o una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la misma, y en el que el acoplador de célula T Biespecífica es específico a CD3 o FAP, respectivamente.
- 40 23. Un adenovirus de acuerdo con uno cualquiera de los párrafos 1 a 22, en el que el acoplador de célula T Biespecífica comprende un scFv que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en una cualquiera de las SEQ ID NOs: 7 o 11 o una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la misma, y en el que el acoplador de célula T Biespecífica es específico a CD3 o FAP, respectivamente.
- 45 24. Un adenovirus de acuerdo con uno cualquiera de los párrafos 1 a 23, en el que el acoplador de célula T Biespecífica comprende una secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 4, o una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la misma, y en el que el acoplador de célula T Biespecífica es específico a FAP, por ejemplo una secuencia de aminoácidos como se establece en las SEQ ID NOs: 75.
- 50 25. Un adenovirus de acuerdo con uno cualquiera de los párrafos 1 a 24, en el que el adenovirus comprende una secuencia de ADN establecida en una cualquiera de las SEQ ID NOs: 36 y 37, o una secuencia de ADN que es al menos 95 % idéntica a la misma y que codifica un acoplador de célula T Biespecífica a FAP, por ejemplo una secuencia de ADN como se establece en una cualquiera de las SEQ ID NOs: 81 y 82.
- 55 26. Una composición que comprende un adenovirus de acuerdo con uno cualquiera de los párrafos 1 a 25 y un diluyente o portador.
- 60 27. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un adenovirus de uno cualquiera de los párrafos 1 a 25 o una composición del párrafo 26, para uso en un método para tratar un paciente
- 65 28. Un adenovirus oncolítico de uno cualquiera de los párrafos 1 a 25 o una composición del párrafo 26, para uso en el tratamiento de cáncer, en particular un tumor sólido.

29. Un adenovirus oncolítico para uso en la dirección a células estromales tumorales, en el que el adenovirus comprende una secuencia de la fórmula (I): en la que:

B₁ es un enlace o comprende: E1A, E1B o E1A-E1B;

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

B₂ 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 es una secuencia de ADN que comprende: un sitio de restricción, uno o más transgenes o ambos;

B₃ es un enlace o comprende: E4;

en el que el adenovirus codifica un Acoplador de célula T Biespecífica en la posición B_Y que comprende al menos dos dominios de unión en los que: uno de los dichos dominios es específico a un componente del complejo receptor de células T (TCR); otro de los dichos dominios es específico a un antígeno estromal tumoral expresado en fibroblastos, macrófagos asociados a tumores, células dendríticas, células NK y/o células T que se han infiltrado en el estroma; y en el que el adenovirus es Enadenotucirev (EnAd) o adenovirus de serotipo 11 (Ad11).

En una realización el adenovirus de acuerdo con la presente divulgación codifica al menos un transgén adicional, por ejemplo 1, 2,3 o 4 transgenes adicionales.

En una realización, se codifica un péptido de escisión diferente entre cada uno de los genes.

En una realización, todos los transgenes están en posición B_Y.

Ventajosamente, los inventores actuales han descubierto que armar un adenovirus con una molécula del acoplador de célula T Biespecífica permite que la molécula de fragmento de anticuerpo biespecífica se 'aproveche' de la capacidad del adenovirus para infectar selectivamente las células cancerosas, lo que permite el suministro dirigida del acoplador de célula T Biespecífica a las células tumorales.

Ventajosamente, los acopladores de célula T Biespecífica son pequeños y se pueden fabricar en células de mamíferos. Por lo tanto, una vez infectadas por los adenovirus de la presente divulgación, las moléculas del acoplador de célula T Biespecífica son sintetizadas por las células tumorales, secretadas y pueden actuar localmente, propagándose más allá de la huella inmediata del virus. Por lo tanto, esto permite que el acoplador de célula T Biespecífica se propague más allá del sitio inmediato de la infección, pero al mismo tiempo también limita la propagación del virus demasiado lejos del nido de células tumorales infectadas. Esto minimiza el riesgo de efectos no deseados fuera del objetivo.

En una realización, el adenovirus es EnAd. Se ha mostrado que EnAd tiene una actividad oncolítica potenciada en comparación con los adenovirus del estado de la técnica. También se ha mostrado que EnAd tiene una alta selectividad para las células de carcinoma derivadas del epitelio humano, tales como las células de cáncer de colon, pulmón, vejiga y riñón. Esto lo convierte en un vehículo de suministro ideal para las moléculas del acoplador de célula T Biespecífica, ya que las células T se pueden activar por la molécula del acoplador de célula T Biespecífica para atacar a las células objetivo, mientras que EnAd infecta y lisa simultáneamente las células cancerosas. Esto da lugar a un doble ataque al tumor que tiene un efecto oncolítico sinérgico

Uno de los dominios de unión es específico de un antígeno del estroma tumoral, por ejemplo proteína de activación de fibroblastos (FAP), TREM1, IGFBP7, FSP-1, receptor del factor-α de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR-α), receptor del factor-β de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR-β) y vimentina. Ventajosamente, las células estromales (células no transformadas) que expresan estos antígenos no están sujetas al mismo nivel de proceso de selección de mutación-resistencia que las células transformadas. Por lo tanto, estas células son más fáciles de dirigir para la terapia contra el cáncer, ya que no son un "objetivo móvil". Además, los tipos de receptores encontrados en las células estromales suelen ser comunes en diferentes tipos de cáncer. Por lo tanto, es probable que dirigirse a uno de los antígenos anteriores sea eficaz para múltiples tipos de cáncer.

En una realización uno de los dominios de unión es específico a FAP, por ejemplo una FAP que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 30 o una secuencia al menos 95 % idéntica a la misma. Ventajosamente, la FAP está regulada al alza en los fibroblastos asociados al tumor. Los

- fibroblastos son un componente vital de los carcinomas sólidos que favorecen el crecimiento, la invasión y la recuperación de las intervenciones. Normalmente, comprenden el 40-60 % de las células de los carcinomas avanzados. Ventajosamente, los fibroblastos son células genéticamente estables que tienen menos probabilidades de escapar a la terapia que las células cancerosas. Los fibroblastos activados también son
- 5 relativamente similares en una variedad de tipos de tumores. Por lo tanto, al activar las células T para dirigirse y destruir los fibroblastos asociados al tumor que expresan FAP, los adenovirus de la presente divulgación pueden ayudar a disminuir un espectro de rutas inmunosupresoras, tales como las mediadas por IL-10, TGF β e IDO.
- 10 Otros objetivos estromales incluyen macrófagos asociados a tumores y antígeno de células supresoras derivadas mieloides, por ejemplo, CD163, CD206, CD68, CD11c, CD11b, CD14, receptor de CSF1, CD15, CD33, CD66b y combinaciones de dos o más de los mismos.
- 15 En una realización uno de los dominios de unión es específico a un antígeno de superficie en una célula T de interés seleccionada de CD3 (tal como CD3 delta, CD3 épsilon o CD3 gamma), TCR- α y TCR- β , otro dominio de unión es específico a un antígeno estromal tumoral, y el adenovirus oncolítico es para uso en un método de tratamiento dirigido a células estromales tumorales.
- 20 En una realización uno de los dominios de unión es específico a CD3 (tal como CD3 delta, CD3 épsilon o CD3 gamma) y otro dominio de unión es específico a un antígeno estromal tumoral seleccionado del grupo que consiste en: proteína de activación de fibroblastos (FAP), TREM1, IGFBP7, FSP-1, receptor del factor- α de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR- α), receptor- β del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR- β) y vimentina.
- 25 En una realización uno de los dominios de unión es específico a CD3 (tal como CD3 delta, CD3 épsilon o CD3 gamma) y otro dominio de unión es específico a FAP.
- En una realización uno de los dominios de unión es específico a CD3 ϵ y otro dominio de unión es específico a FAP.
- 30 En una realización B $_X$ no es un enlace.
- En una realización ambos B $_X$ y B $_Y$ no son enlaces.
- 35 En una realización el adenovirus es quimérico.
- El adenovirus es oncolítico.
- En una realización el adenovirus es quimérico y oncolítico.
- 40 En una realización el adenovirus capaz de replicación.
- En una realización el adenovirus es quimérico, oncolítico y capaz de replicación.
- 45 En una realización el adenovirus es competente para replicación
- En otra realización el adenovirus es quimérico, oncolítico y competente para replicación.
- 50 En una realización B $_X$ comprende un transgén o casete de transgén, en particular un casete de transgén que codifica un acoplador de célula T Biespecífica de acuerdo con la presente divulgación.
- By comprende un transgén o casete de transgén que codifica un acoplador de célula T Biespecífica de acuerdo con la presente divulgación.
- 55 En una realización B $_Y$ comprende un transgén o un casete de transgén que codifica un acoplador de célula T Biespecífica de acuerdo con la presente divulgación y B $_X$ representa un enlace.
- En una realización tanto B $_X$ como B $_Y$ comprenden un transgén o casete de transgén.
- 60 Por lo tanto, el acoplador de célula T Biespecífica de elección se expresará mediante la célula cancerosa. El empleo de un promotor exógeno puede ser ventajoso en algunas realizaciones porque puede expresar fuerte y constitutivamente el anticuerpo o fragmento, lo que puede ser particularmente útil en algunas situaciones, por ejemplo, cuando el paciente tiene un cáncer muy generalizado. El empleo de un promotor endógeno puede ser ventajoso porque reduce el tamaño del casete de transgén que se debe incorporar para expresar el acoplador
- 65 de célula T Biespecífica, es decir, el casete puede ser más pequeño porque no es necesario incluir ningún promotor exógeno. Ventajosamente, cuando está bajo el control de estos promotores, el virus sigue siendo

competente para replicación y también es capaz de expresar el acoplador de célula T Biespecífica y/u otra proteína.

5 De acuerdo con lo anterior, en una realización el transgén o casete de transgén está bajo el control del promotor tardío principal endógeno. El empleo de un promotor endógeno en el virus también puede ser ventajoso en un contexto terapéutico porque el transgén solo se expresa cuando el virus se está replicando en una célula cancerosa a diferencia de un promotor exógeno constitutivo que transcribirá continuamente el transgén y puede conducir a una concentración inapropiada del anticuerpo o fragmento.

10 En una realización, un transgén o casete de transgén (por ejemplo que codifica un acoplador de célula T Biespecífica) está bajo el control de un promotor exógeno, tal como CMV. Ventajosamente, el uso de un promotor exógeno constitutivo da como resultado una transcripción continua del transgén, lo que puede ser deseable en ciertos casos.

15 En una realización un transgén o casete de transgén está bajo el control de un promotor endógeno y otro transgén o casete de transgén (por ejemplo que codifica un acoplador de célula T Biespecífica) está bajo el control de un promotor exógeno.

20 En una realización todos los transgenes o casetes de transgén (por ejemplo que codifican un acoplador de célula T Biespecífica) en el virus está/están bajo el control de un promotor endógeno.

En una realización el transgén o casete de transgén comprende además un elemento regulador independientemente seleccionado de:

25 i) una secuencia aceptora de empalme,

ii) una secuencia de entrada interna al ribosoma o un péptido 2A de alta eficacia de autoescisión,

30 iii) una secuencia de Kozak, y

iv) combinaciones de las mismas.

Por lo tanto, en una realización el casete de transgén comprende i) o ii) o iii) o iv).

35 En una realización el casete de transgén comprende i) y ii), o i) y iii), o i) y iv), o ii) y iii), o ii) y iv), o iii) y iv).

En una realización el casete de transgén comprende i) y ii) y iii), o i) y ii) y iv), o i) y iii) y iv), o ii) y iii) y iv).

40 En una realización, el casete de transgén comprende i) y ii) y iii) y iv).

En una realización, el casete de transgén comprende una secuencia de Kozak al inicio de la secuencia codificante de proteína (por ejemplo acoplador de célula T Biespecífica), que ayuda en la traducción de ARNm.

45 En una realización, el casete de transgén codifica un péptido 2A de alta eficacia de autoescisión.

En una realización el casete de transgén comprende además una secuencia de poliadenilación.

50 En una realización el casete de transgén comprende además un sitio de restricción en el extremo 3' de la secuencia de ADN y/o en el extremo 5' de la secuencia de ADN.

En una realización al menos un casete de transgén codifica ARNm monocistrónico.

55 En una realización la molécula del acoplador de célula T Biespecífica tiene una vida media corta, por ejemplo 48 horas o menos.

Ventajosamente, los actuales inventores han establecido que una variedad de transgenes se pueden insertar en B_x y B_y bajo el control de un promotor exógeno o endógeno, sin afectar negativamente el ciclo de vida del virus o la estabilidad del vector.

60 La molécula del acoplador de célula T Biespecífica se codifica al menos en la posición B_y, bajo el control del promotor tardío principal. Ventajosamente, el transgén o casete de transgén permite que el acoplador de célula T Biespecífica o cualquier molécula adicional se exprese junto con propio adenovirus. Es importante destacar que los inventores actuales demostraron con éxito que la expresión del acoplador de célula T Biespecífica no afectó significativamente la capacidad de EnAd para replicarse ni afectó negativamente su actividad oncolítica.

65 En una realización, el adenovirus codifica además un segundo acoplador de célula T Biespecífica.

En una realización, la primera molécula del acoplador de célula T Biespecífica es específica a un antígeno tumoral, por ejemplo un antígeno tumoral como se describió anteriormente, y la segunda molécula del acoplador de célula T Biespecífica es específica a un antígeno estromal tumoral, por ejemplo un antígeno estromal como se describió anteriormente.

En una realización la primera molécula del acoplador de célula T Biespecífica es específica a un antígeno tumoral seleccionado del grupo que consiste en: CEA, MUC-1, EpCAM, receptores HER HER1, HER2, HER3, HER4, PEM, A33, G250, antígenos de carbohidratos Le^y, Le^x, Le^b, PSMA, TAG-72, STEAP1, CD166, CD24, CD44, E-caderina, SPARC, ErbB2 y ErbB3 y la segunda molécula del acoplador de célula T Biespecífica es específica a un antígeno estromal tumoral seleccionado del grupo que consiste en: proteína de activación de fibroblastos (FAP), TREM1, IGFBP7, FSP-1, receptor del factor- α de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR- α), receptor del factor- β de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR- β) y vimentina.

En una realización la primera molécula del acoplador de célula T Biespecífica es específica a EpCAM y la segunda molécula del acoplador de célula T Biespecífica es específica a un antígeno estromal tumoral seleccionado del grupo que consiste en: proteína de activación de fibroblastos (FAP), TREM1, IGFBP7, FSP-1, receptor del factor- α de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR- α), receptor del factor- β de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR- β) y vimentina.

En una realización la primera molécula del acoplador de célula T Biespecífica es específica a un antígeno tumoral seleccionado del grupo que consiste en: CEA, MUC-1, EpCAM, receptores HER HER1, HER2, HER3, HER4, PEM, A33, G250, antígenos de carbohidratos Le^y, Le^x, Le^b, PSMA, TAG-72, STEAP1, CD166, CD24, CD44, E-caderina, SPARC, ErbB2 y ErbB3 y el segundo acoplador de célula T Biespecífica es específico a FAP.

En una realización la primera molécula del acoplador de célula T Biespecífica es específica a EpCAM y la segunda molécula del acoplador de célula T Biespecífica es específica a FAP.

En una realización la primera molécula del acoplador de célula T Biespecífica es específica a un antígeno estromal tumoral y la segunda molécula del acoplador de célula T Biespecífica es específica a una proteína no activadora de TCR.

En una realización la primera molécula del acoplador de célula T Biespecífica es específica a un antígeno estromal tumoral seleccionado del grupo que consiste en: proteína de activación de fibroblastos (FAP), TREM1, IGFBP7, FSP-1, receptor del factor- α de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR- α), receptor del factor- β de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR- β) y vimentina y la segunda molécula del acoplador de célula T Biespecífica es específica a una proteína no activadora de TCR seleccionada del grupo que consiste en: CD31, CD2 y CD277.

En una realización la primera molécula del acoplador de célula T Biespecífica es específica a FAP y la segunda molécula del acoplador de célula T Biespecífica es específica a una proteína no activadora de TCR seleccionada del grupo que consiste en: CD31, CD2 y CD277.

En una realización el adenovirus solo comprende un acoplador de célula T Biespecífica.

En otra realización el adenovirus comprende dos acopladores de célula T Biespecífica.

En otra realización el adenovirus comprende tres acopladores de célula T Biespecífica.

Además de codificar uno, dos o tres acopladores de célula T Biespecífica el virus también puede codificar a 1, 2, 3 o 4 transgenes adicionales.

En una realización el adenovirus codifica además una citocina o quimiocina.

En una realización el adenovirus codifica además una citocina.

En una realización el adenovirus codifica además a quimiocina.

En otra realización el adenovirus codifica además una citocina y una quimiocina.

En una realización el adenovirus comprende un acoplador de célula T Biespecífica y al menos una citocina o quimiocina, por ejemplo 1, 2 o 3 citocinas, 1, 2 o 3 quimiocinas o una combinación de 2 o 3 genes cada gen codifica independientemente una citocina o quimiocina.

En otra realización el adenovirus comprende dos acopladores de célula T Biespecífica y al menos una citocina o quimiocina por ejemplo 1 o 2 citocinas, 1 o 2 quimiocinas o una combinación de una citocina y una quimiocina.

5 En otra realización el adenovirus comprende tres acopladores de célula T Biespecífica y al menos una citocina o quimiocina.

10 En una realización la citocina o quimiocina se selecciona de IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-9, IL-12, IL-13, IL-17, IL-18, IL-22, IL-23, IL-24, IL-25, IL-26, IL-27, IL-33, IL-35, IL-2, IL-4, IL-5, IL-7, IL-10, IL-15, IL-21, IL-25, IL-1RA, IFN α , IFN β , IFN γ , TNF α , linfotóxina α (LTA) y GM-CSF, IL-8, CCL2, CCL3, CCL5, CCL17, CCL20, CCL22, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL13, CXCL12, CCL2, CCL19, CCL21, por ejemplo IL-12, IL-18, IL-22, IL-7, IL-15, IL-21, IFN γ , TNF α , linfotóxina α (LTA), CCL3, CCL5, CXCL9, CXCL12, CCL2, CCL19 y CCL21.

15 En una realización, la citocina codificada se selecciona de la superfamilia TNF alfa (TNFRSF incluye TNF-alfa, TNF-C, OX40L, CD154, FasL, LIGHT, TL1A, CD70, Siva, CD153, ligando 4-1BB, TRAIL, RANKL, TWEAK, APRIL, BAFF, CAMLG, NGF, BDNF, NT-3, NT-4, ligando GITR, EDA-A, EDA-A2), superfamilia TGF-beta, familia IL-1 (es decir, IL-1 e IL-8), familia IL-2, familia IL-10, familia IL-17, familia del interferón.

20 En una realización la quimiocina se selecciona del grupo que comprende MIP-1 alfa, RANTES, IL-8, CCL5, CCL17, CCL20, CCL22, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL13, CXCL12, CCL2, CCL19 y CCL21.

En una realización, el adenovirus comprende además un inmunomodulador, tal como un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, o proteína o ligando de péptido, específico para una proteína de punto de control o molécula coestimuladora, o ligandos de unión específicos para dichas moléculas.

25 En una realización el inmunomodulador es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, o proteína o ligando de péptido, específico para una proteína de punto de control tal como CTLA-4, PD-1, PD-L1, PD-L2, VISTA, B7-H3, B7-H4, HVEM, ILT-2, ILT-3, ILT-4, TIM-3, LAG-3, BTLA, LIGHT o CD160, por ejemplo CTLA-4, PD-1, PD-L1 y PD-L2.

30 En una realización el inmunomodulador es un inhibidor, por ejemplo un inhibidor de punto de control.

En una realización el inmunomodulador es un agonista

35 En otra realización el inmunomodulador es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, o proteína o ligando de péptido, específico para una molécula coestimuladora tal como CD28, CD80, CD86, CD83, ICOS, B7H2, TL1A y 4-1BB.

40 En una realización el adenovirus comprende un primer anticuerpo, fragmento de anticuerpo, proteína o ligando de péptido específico para una proteína de punto de control y un segundo anticuerpo, fragmento de anticuerpo, proteína o ligando de péptido específico a una molécula coestimuladora.

45 En una realización el acoplador de célula T Biespecífica comprende un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en una cualquiera de las SEQ ID NOs: 8, 13 o 18, o una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la misma y un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en una cualquiera de las SEQ ID NOs: 9, 12 o 17, o una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la misma, y el acoplador de célula T Biespecífica es específico a CD3, FAP o EpCAM, respectivamente.

50 En una realización el acoplador de célula T Biespecífica comprende un scFv que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en una cualquiera de las SEQ ID NOs: 7, 11 o 16, o una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la misma, y el acoplador de célula T Biespecífica es específico a CD3, FAP o EpCAM, respectivamente.

55 En una realización, un acoplador de célula T Biespecífica empleado en la presente divulgación (es decir, codificado por el adenovirus) comprende un dominio de unión con un dominio VH con una secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 8 o una secuencia al menos 95 % idéntica a la misma, y un dominio VL con una secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 9 o una secuencia al menos 95 % idéntica a la misma, y el acoplador de célula T Biespecífica es específico a CD3.

60 En una realización, un acoplador de célula T Biespecífica empleado en la presente divulgación (es decir, codificado por el adenovirus) comprende un dominio de unión con un dominio VH con una secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 13 o una secuencia al menos 95 % idéntica a la misma, y un dominio VL con una secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 12 o una secuencia al menos 95 % idéntica a la misma, y el acoplador de célula T Biespecífica es específico a FAP.

65

- En una realización, un acoplador de célula T Biespecífica empleado en la presente divulgación (es decir, codificado por el adenovirus) comprende un dominio de unión con un dominio VH con una secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 18 o una secuencia al menos 95 % idéntica a la misma, y un dominio VL con una secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 17 o una secuencia al menos 95 % idéntica a la misma, y el acoplador de célula T Biespecífica es específico a EpCAM.
- En una realización, un acoplador de célula T Biespecífica empleado en la presente divulgación (es decir, codificado por el adenovirus) comprende un dominio de unión con un dominio VH con una secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 8 o una secuencia al menos 95 % idéntica a la misma, y un dominio VL con una secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 9 o una secuencia al menos 95 % idéntica a la misma, y un dominio de unión con un dominio VH con una secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 13 o una secuencia al menos 95 % idéntica a la misma, y un dominio VL con una secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 12 o una secuencia al menos 95 % idéntica a la misma, y el acoplador de célula T Biespecífica es específico a CD3 y FAP.
- En una realización, un acoplador de célula T Biespecífica empleado en la presente divulgación (es decir, codificado por el adenovirus) comprende un dominio de unión con un dominio VH con una secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 8 o una secuencia al menos 95 % idéntica a la misma, y un dominio VL con una secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 9 o una secuencia al menos 95 % idéntica a la misma, y un dominio de unión con un dominio VH con una secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 18 o una secuencia al menos 95 % idéntica a la misma, y un dominio VL con una secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 17 o una secuencia al menos 95 % idéntica a la misma, y el acoplador de célula T Biespecífica es específico a CD3 y EpCAM.
- En una realización, un acoplador de célula T Biespecífica empleado en la presente divulgación (es decir, codificado por el adenovirus) comprende una secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 7, 11, 16 o una secuencia al menos 95 % idéntica a una cualquiera de las mismas, y el acoplador de célula T Biespecífica es específico a CD3, FAP o EpCAM, respectivamente.
- En una realización, un acoplador de célula T Biespecífica empleado en la presente divulgación (es decir, codificado por el adenovirus) comprende una secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 7 o una secuencia al menos 95 % idéntica a la misma, y el acoplador de célula T Biespecífica es específico a CD3.
- En una realización, un acoplador de célula T Biespecífica empleado en la presente divulgación (es decir, codificado por el adenovirus) comprende una secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 11 o una secuencia al menos 95 % idéntica a la misma, y el acoplador de célula T Biespecífica es específico a FAP.
- En una realización, un acoplador de célula T Biespecífica empleado en la presente divulgación (es decir, codificado por el adenovirus) comprende una secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 16 o una secuencia al menos 95 % idéntica a la misma, y el acoplador de célula T Biespecífica es específico a EpCAM.
- En una realización el acoplador de célula T Biespecífica comprende una secuencia de aminoácidos establecida en las SEQ ID NOs: 2 o 4, o una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la misma, por ejemplo un aminoácido como se establece en las SEQ ID NOs: 73 o 75, y el acoplador de célula T Biespecífica es específico a EpCAM y FAP, respectivamente.
- En una realización el adenovirus de acuerdo con la presente divulgación comprende una secuencia de ADN establecida en una cualquiera de las SEQ ID NOs: 36 o 37, o una secuencia d ADN que se hibrida con la misma bajo condiciones estrictas.
- En una realización el adenovirus de acuerdo con la presente divulgación comprende una secuencia de ADN establecida en una cualquiera de las SEQ ID NOs: SEQ ID NOs: 81 o 82.
- En una realización el adenovirus de acuerdo con la presente divulgación comprende una secuencia de ADN mostrada en una cualquiera de las SEQ ID NO: 36, 37, 80, 82, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 120, 298 o una secuencia que codifica el mismo virus, o una secuencia que se hibrida a cualquiera de los mismos bajo condiciones estrictas.
- En una realización el adenovirus de acuerdo con la presente divulgación comprende una secuencia de ADN mostrada en una cualquiera de las SEQ ID NO: 34, 35, 36, 37, 79, 80, 82, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 120 o 298.
- El experto es consciente de que hay redundancia en el código de ADN, por lo tanto, la presente divulgación se extiende a EnAd o Ad11 que codifica un acoplador de célula T Biespecífica con un aminoácido divulgado en el presente documento.
- La etiqueta de afinidad deca-His de terminal C (HHHHHHHHHH SEQ ID NO: 24) es útil para la purificación del acoplador de célula T Biespecífica o adenovirus. Sin embargo, es opcional y se puede excluir, por ejemplo, en

el producto final. El experto también sabría que se pueden utilizar otras etiquetas de afinidad distintas de deca-His y también se pueden excluir sin afectar la función biológica del acoplador de célula T Biespecífica o del adenovirus. De acuerdo con lo anterior, en una realización el acoplador de célula T Biespecífica comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en una cualquiera de las SEQ ID NOs: 2 o 4 pero excluye la etiqueta de afinidad deca-His en el extremo de terminal C de la secuencia, por ejemplo como se establece en las SEQ ID NOs: 73 o 75. En otra realización, el adenovirus comprende una secuencia de ADN establecida en una cualquiera de las SEQ ID NOs: 36 o 37 pero excluye la etiqueta de afinidad deca-His, por ejemplo una secuencia de ADN como se establece en una cualquiera de las SEQ ID NOs: 81 o 82.

La exclusión de la etiqueta de afinidad deca-His se extiende además a todas las otras secuencias divulgadas en el presente documento que comprenden la etiqueta de afinidad deca-His, es decir la presente divulgación incluye las mismas secuencias de aminoácidos o ADN que carecen de la etiqueta deca-His de terminal C (HHHHHHHHHHH o CATCACCATCACCATCACCACCATCACCAT), por ejemplo como se establece en una cualquiera de las SEQ ID NOs: 72 a 82.

En una realización un acoplador de célula T Biespecífica codificado por el virus de la presente divulgación está bajo el control de un promotor exógeno, por ejemplo el promotor CMV. El exógeno se puede colocar entre el MPL y el transgén codificado cuando el transgén se encuentra entre las regiones L5 y E4.

El exógeno se puede colocar entre el transgén codificado y L5 cuando el transgén está entre las regiones L5 y E3.

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

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

En un aspecto, el método es para el tratamiento de cáncer, por ejemplo un cáncer epitelial, en particular un tumor sólido.

En un aspecto, se proporciona un método de tratamiento que comprende administrar un virus de acuerdo con la presente divulgación en combinación con un inhibidor de punto de control (tal como un inhibidor PD-1 o PDL1), en particular en el que el inhibidor de punto de control se codifica en el virus.

En un aspecto, 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 de punto de control (por ejemplo como se enumera en otra parte del presente documento tal como un inhibidor de PD-1 o PDL1), en particular en el que el inhibidor de punto de control no se codifica en el virus.

Los acopladores de célula T Biespecífica codificados por el virus según la presente divulgación tienen la capacidad de potenciar la citotoxicidad del virus.

Sorprendentemente, los acopladores de célula T Biespecífica codificados por un virus, según la presente divulgación, pueden activar células CD4+ y/o células CD8+, por ejemplo, incluso células en el entorno supresor del tumor, que incluyen las células T en el entorno fluido, como la ascitis, del tumor.

Ventajosamente, los acopladores de célula T Biespecífica codificados por un virus, según la presente divulgación, pueden activar las células T citotóxicas, por ejemplo, incluso las células T en el entorno supresor del tumor, que incluyen las células T en el entorno fluido, tales como la ascitis, del tumor.

Incluso más sorprendente, los acopladores de célula T Biespecífica codificados por un virus, según la presente divulgación, son capaces de estimular (activar) la proliferación de células T.

Los virus que codifican los acopladores de célula T Biespecífica, de acuerdo con la presente divulgación, parecen ser capaces de eludir, superar o revertir el microambiente inmunosupresor del tumor.

En una realización, la activación de las células T da lugar a la regulación al alza de un marcador de células T, por ejemplo CD25.

En una realización, una unión de un acoplador de célula T Biespecífica en un virus, de acuerdo con la presente divulgación, es específica de un neoantígeno.

Descripción detallada

La invención es como se define en las reivindicaciones.

La célula inmunitaria, como se emplea en el presente documento, es una célula con un papel funcional en el sistema inmunitario, que incluye (pero no se limita a) macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, células NK, linfocitos, tales como los linfocitos T (en particular las células T y las células NKT).

El término anticuerpo, como se utiliza en el presente documento, se refiere a una molécula de inmunoglobulina capaz de unirse específicamente a un antígeno objetivo, tal como un carbohidrato, polinucleótido, lípido, polipéptido, péptido, etc., a través de al menos un sitio de reconocimiento de antígeno (también denominado sitio de unión en el presente documento), ubicado en la región variable de la molécula de inmunoglobulina. A menos que el contexto indique lo contrario, el término se extiende a los anticuerpos de longitud completa y a las moléculas de anticuerpos multiespecíficos que comprenden anticuerpos de longitud completa.

Como se utiliza en el presente documento, la "molécula de anticuerpo" incluye los anticuerpos y los fragmentos de unión de los mismos y los formatos multiespecíficos de cualquiera de los mismos.

El sitio de unión al antígeno, como se emplea en el presente documento, se refiere a una porción de la molécula, que comprende un par de regiones variables, en particular un par de cognados que interactúan específicamente con el antígeno objetivo.

Específicamente, como se emplea en el presente documento, se pretende referirse a un sitio de unión que solo reconoce el antígeno del que es específico o un sitio de unión que tiene una afinidad de unión significativamente mayor al antígeno al que es específico en comparación con la afinidad a antígenos a los que no es específico, por ejemplo 5, 6, 7, 8, 9, 10 veces mayor afinidad de unión.

Los fragmentos de unión o fragmentos de unión a anticuerpos, como se emplean en el presente documento, se refieren a fragmentos de unión a anticuerpos y moléculas de anticuerpos multiespecíficas que comprenden fragmentos de unión a anticuerpos, que incluyen, pero no se limitan a, Fab, Fab modificado, Fab', Fab' modificado, F(ab')₂, Fv, anticuerpos de dominio único, scFv, anticuerpos bi, tri o tetravalentes, Bis-scFv, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos y fragmentos de unión a epítomos de cualquiera de los anteriores (véanse, por ejemplo, Holliger and Hudson, 2005, Nature Biotech. 23(9):1126-1136; Adair and Lawson, 2005, Drug Design Reviews - Online 2(3), 209-217). Los métodos para crear y fabricar estos fragmentos de anticuerpos son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Verma et al., 1998, Journal of Immunological Methods, 216:165-181). Otros fragmentos de anticuerpos que se utilizan en la presente divulgación incluyen los fragmentos Fab y Fab' descritos en las solicitudes internacionales de patente WO05/003169, WO05/003170 y WO05/003171. Los anticuerpos multivalentes pueden comprender múltiples especificidades, por ejemplo, biespecíficos o pueden ser monoespecíficos (véase, por ejemplo, los documentos WO92/22853 y WO05/113605).

En una realización, el adenovirus comprende una molécula de anticuerpo multiespecífica.

La molécula de anticuerpo multiespecífica, como se emplea en el presente documento, se refiere a una molécula de anticuerpo que tiene dos o más dominios de unión al antígeno, por ejemplo, dos (biespecíficos) o tres (triespecíficos) o cuatro (tetraespecíficos) dominios de unión.

Las moléculas de anticuerpos multiespecíficos de la presente divulgación se pueden construir a partir de varios fragmentos de anticuerpos, tales como los descritos anteriormente. Por ejemplo, una diacuerpo es una molécula de anticuerpo biespecífica compuesta por un dímero no covalente de fragmentos de ScFv, mientras que un F(ab')₂ es una molécula de anticuerpo biespecífica compuesta por 2 fragmentos de Fab ligados por una región bisagra. Por lo tanto, el experto sabrá que diferentes fragmentos de anticuerpos se pueden disponer en varias combinaciones para producir una molécula de anticuerpo bi o multiespecífica.

Ejemplos de formatos de anticuerpos triespecíficos o tetraespecíficos incluyen, pero no se limitan a, Fabs, triacuerpo, tetracuerpo, tricuerpo, DVD-Ig, IgG-scFv, ScFv2-Fc, tandAbs y DNL-Fab3.

La molécula de anticuerpo biespecífica, como se emplea en el presente documento, se refiere a una molécula con dos dominios de unión a antígenos, que se pueden unir a los mismos antígenos o a antígenos diferentes. Un acoplador de célula T Biespecífica es una subclase de moléculas de anticuerpos biespecíficas.

Los dominios se pueden unir a diferentes antígenos.

Alternativamente, todos los dominios se pueden unir al mismo antígeno, que incluyen la unión al mismo epítopo en el antígeno o la unión a diferentes epítomos en el mismo antígeno.

Los ejemplos de formatos de anticuerpos biespecíficos incluyen, pero no se limitan a, el acoplador de célula T Biespecífica, F(ab')₂, F(ab')-ScFv2, di-scFv, diacuerpo, minicuerpo, scFv-Fc, DART, TandAb, ScDiacuerpo, ScDiacuerpo-CH3, Diacuerpo-CH3, triple cuerpo, minianticuerpo, minicuerpo, minicuerpo TriBi, ScFv-CH3 KI

(perillas en orificios), Fab-ScFv, SCFv-CH-CL-scFv, scFv-KIH, Fab-scFv-Fc, HCAb tetravalente, scDiacuerpo-Fc, Diacuerpo-Fc, intracuerpo, anticuerpos con acoplamiento y bloqueo, ImmTAC, HSAcuerpo, ScDiacuerpo-HAS, humacuerpo y Tándem ScFv-tóxico (véase, por ejemplo, Christoph Spiess et al, Molecular Immunology 67 (2015) pages 95-106).

El adenovirus de la presente divulgación comprende un acoplador de célula T Biespecífica que es específico para al menos un antígeno de superficie en una célula T de interés. Ejemplos de antígenos de superficie de célula T incluyen, pero no se limitan a: CD3, CD2, VLA- 1, CD8, CD4, CCR6, CXCR5, CD25, CD31, CD45RO, CD197, CD127, CD38, CD27, CD196, CD277 y CXCR3, particularmente CD2, CD3, CD31 y CD277.

El Acoplador de célula T Biespecífica, como se utiliza en el presente documento, se refiere a una clase de anticuerpos monoclonales biespecíficos artificiales que comprenden 2 scFvs de diferentes anticuerpos o secuencias de aminoácidos de 4 genes diferentes en una sola cadena de péptidos de aproximadamente 55 KDa. Uno de los scFvs es específico para una célula inmunitaria, tal como el antígeno de una célula T, tal como el receptor CD3, expresado en la superficie de las células T. El otro scFv normalmente se une a una célula tumoral a través de una molécula específica del tumor. De acuerdo con lo anterior, los acopladores de célula T Biespecífica son capaces de formar un ligamiento entre las células T y las células tumorales en virtud de sus especificidades para un antígeno en la célula T y un antígeno en la célula tumoral. Esto conduce a la activación de las células T y desencadena las células T para que ejerzan sus efectos citotóxicos sobre las células tumorales, independientemente del MHC I o de las moléculas coestimuladoras. Ejemplos de terapias basadas en el acoplador de célula T Biespecífica actualmente aprobadas o en fase de ensayos clínicos son, por ejemplo, el Blinatumomab (Blyncto®), que se dirige a CD19 y es para el tratamiento del linfoma no Hodgkin y la leucemia linfoblástica aguda, y el Solitomab, que se dirige a EpCAM y es para el tratamiento de cánceres gastrointestinales y de pulmón.

En una realización, el activador de células inmunitarias (tal como el activador de células T) está dispuesto en el formato VL1-ligador1-VH1-ligador2-VH2-ligador3-VL2, por ejemplo, empleando ligadores seleccionados independientemente de las secuencias de ligadores divulgadas en el presente documento.

En una realización los ligadores en un acoplador de célula T Biespecífica de acuerdo con la presente divulgación se seleccionan independientemente de la SEQ ID NO: 10, 14, 23, 124 a 162 y 166 a 297.

En una realización el ligador1 y ligador3 tienen la misma secuencia, por ejemplo una secuencia mostrada en una cualquiera de las SEQ ID NOs: 10, 14, 23, 124 a 162 y 166 a 296, en particular 10, 14 y 23.

En una realización ligador1 y ligador3 tienen diferentes secuencias de aminoácidos, por ejemplo independientemente seleccionadas de las SEQ ID NOs: 10, 14, 23, 124 a 162 y 166 a 296, en particular 10, 14 y 23.

En una realización el Ligador1 es de la SEQ ID NO: 10.

En una realización el Ligador1 es de la SEQ ID NO: 14.

En una realización el Ligador3 es de la SEQ ID NO: 10.

En una realización el Ligador3 es de la SEQ ID NO: 14.

En una realización el Ligador1 y Ligador3 son de la SEQ ID NO: 10.

En una realización el Ligador1 y Ligador3 son de la SEQ ID NO: 14.

En una realización el Ligador1 es de la SEQ ID NO: 10 y Ligador 3 es de la SEQ ID NO: 14.

En una realización el Ligador1 es de la SEQ ID NO: 14 y Ligador3 es de la SEQ ID NO: 10.

En una realización el Ligador2 es diferente tanto al Ligador 1 como al Ligador3.

En una realización el Ligador 2 se selecciona de una cualquiera de las SEQ ID NOs: 10,14, 23,124 a 162 y 166 a 297, tal como la SEQ ID NO: 297.

En una realización el Ligador1 está en el rango de 10 a 30 aminoácidos en 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.

En una realización el Ligador3 está en el rango de 10 y 30 aminoácidos en 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.

En una realización el Ligador 2 está en el rango de 2 a 10 aminoácidos en longitud, tal como 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10.

5 En una realización VH1 y VL1 son específicos a un antígeno de células T de acuerdo con la presente divulgación, tal como CD3.

En una realización VH2 y VL2 son específicos a un antígeno de célula inmunitaria, tal como un antígeno de células T, de acuerdo con la presente divulgación, tal como CD3.

10 En una realización VH1 y VL1 son específicos a un antígeno de interés, tal como un antígeno cancerígeno o antígeno estromal, etc.

En una realización VH2 y VL2 son específicos a un antígeno de interés, tal como un antígeno cancerígeno o antígeno estromal, etc.

15 El estroma o antígeno estromal, como se emplea en el presente documento, se refiere a un objetivo terapéutico de antígeno en el estroma, incluso expresado en la estructura molecular de la matriz del estroma, tales como las moléculas de tejido conjuntivo o moléculas asociadas con esta matriz o antígenos asociados con los componentes celulares del estroma, por ejemplo, expresados en fibroblastos, macrófagos asociados a tumores, 20 células dendríticas, Células NK y/o células T que se han infiltrado en el estroma. Los ejemplos de antígenos del estroma incluyen, pero no se limitan a, 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.

25 Los fibroblastos se pueden dirigir al emplear la proteína de activación de fibroblastos (FAP) del antígeno, en particular un anticuerpo específico de FAP que no se une a CD26 (véase el documento US2012/0258119).

La FAP se identificó originalmente como una serina proteasa en fibroblastos estromales reactivos. La clonación molecular posterior reveló que la FAP es idéntica a la seprasa, una gelatinasa asociada a la membrana de 170 30 kDa que se expresa en las estirpes celulares de melanoma. El ADNc de longitud completa codificó una proteasa transmembrana tipo H de 760 aminoácidos (aa) altamente homóloga a la dipeptidil peptidasa IV (DPPIV) con una identidad aa del 52 % en toda la secuencia y casi el 70 % en el dominio catalítico. El documento US5,587,299, describe las moléculas de ácido nucleico que codifican FAP y aplicaciones de las mismas.

35 La FAP y la DPPIV tienen tamaños de genes similares y son cromosómicamente adyacentes entre sí en 2q24, lo que sugiere un evento de duplicación de genes (número de acceso Genbank U09278). Ambas proteínas son miembros de la familia de las prolil peptidasas. Esta clase de enzimas es inducible, activa en la superficie celular o en fluidos extracelulares, y es la única capaz de escindir dipéptidos de terminal N de polipéptidos con prolina o alanina en la penúltima posición. La DPPIV, también denominada CD26, se expresa constitutivamente 40 en varios tipos de células, que incluyen fibroblastos, células endoteliales y epiteliales, subconjuntos de leucocitos como las células NK, linfocitos T y macrófagos. Una pequeña proporción de DPPIV circula como proteína soluble en la sangre. A diferencia de la DPPIV, la FAP no se expresa normalmente en el tejido adulto normal y su forma soluble proteolíticamente activa se denomina Enzima de Escisión α 2-Antiplasmina (APCE). La expresión de FAP marcada ocurre en condiciones asociadas con el estroma activado, que incluyen la cicatrización de heridas, cánceres epiteliales, osteoartritis, artritis reumatoide, cirrosis y fibrosis pulmonar. 45

La estructura de FAP ha sido resuelta (PDB ID 1Z68) y es muy similar a la de DPPIV. La FAP está anclada en la membrana plasmática por una secuencia de señal desordenada de aproximadamente 20 aminoácidos y tiene un dominio citoplasmático corto, amino terminal, de seis aminoácidos. La mayor parte de la proteína, que incluye el dominio catalítico, está expuesta al entorno extracelular. La glicoproteína FAP es un homodímero que 50 consiste en dos subunidades idénticas de 97 kDa. Cada subunidad de monómero FAP consiste en dos dominios, un dominio $\alpha\beta$ hidrolasa (aa 27-53 y 493-760) y un dominio de hélice β de ocho palas (aa 54-492) que encierran una gran cavidad. Un pequeño bolsillo dentro de esta cavidad en la interfaz de ambos dominios contiene la tríada catalítica (Ser624, Asp702 e His734). La FAP obtiene su actividad enzimática tras la homodimerización de las subunidades y, además de su actividad dipeptidil peptidasa, la FAP también tiene actividad gelatinasa y endopeptidasa específicas para el colágeno tipo I. La hélice β actúa como andamiaje para las interacciones proteína-proteína y determina la unión del sustrato y la matriz extracelular (ECM). Además, la hélice β está involucrada en la formación de complejos supramoleculares de FAP con otras prolil peptidasas o con otras moléculas unidas a la membrana. Se encontró que la formación de complejos 60 heteroméricos o tetrámeros de FAP y DPPIV se asocia con la invadopadía de las células migratorias en un sustrato de colágeno. El colágeno tipo I induce una estrecha asociación de FAP con las integrinas β 1, por lo que desempeña una importante función organizativa en la formación y adhesión de invadopodios. Aunque los mecanismos implicados no se conocen en detalle, la formación de estos dominios de membrana ricos en proteinasa en el frente de invasión celular contribuye a la degradación pericelular dirigida de la ECM. Esto indica que las interacciones entre la FAP y la ECM pueden estar estrechamente relacionadas con el 65 comportamiento celular invasivo al influir en la adhesión, migración, proliferación y apoptosis celular a través

de las rutas de las integrinas y apoya la función de la FAP en la patogénesis y progresión de la enfermedad. En resumen, la FAP es reconocida como una proteína multifuncional que ejecuta sus funciones biológicas de manera dependiente de las células a través de una combinación de su actividad proteasa y su capacidad para formar complejos con otras moléculas de la superficie celular. La sobreexpresión de FAP en estirpes celulares epiteliales y fibroblásticas promueve un comportamiento maligno, lo que apunta a la situación clínica, donde los niveles de expresión celular de FAP se correlacionan con un peor resultado clínico.

A través de moléculas de señalización paracrina, las células cancerosas activan los fibroblastos estromales e inducen la expresión de FAP, que a su vez, afecta la proliferación, invasión y migración de las células cancerosas. Estudios recientes han demostrado que el 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). La FAP se expresa en gran medida en fibroblastos estromales reactivos en el 90 % de los carcinomas epiteliales humanos, que incluyen los de mama, pulmón, colorrecto y ovario (Garin-Chesa, P et al (1990) PNAS USA 87: 7236-7239). Chen et al han mostrado recientemente que la 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).

La FAP se puede dirigir al unirse a dicho antígeno y bloquear estéricamente su interacción con moléculas biológicamente relevantes. Alternativamente, o adicionalmente, el entrecruzamiento de la molécula de FAP con otra molécula de FAP o una molécula diferente, por ejemplo, un antígeno en la superficie de una célula cancerosa se puede lograr empleando una molécula de anticuerpo multiespecífica, tal como una biespecífica. Este entrecruzamiento aumentó la visibilidad de las células portadoras de los antígenos para el sistema inmunitario, que luego se puede activar para neutralizar o destruir el mismo.

Se considera que los macrófagos asociados a tumores (TAMs) expresan TREM1, CD204, CD68 (solos o en combinación con CD163 o CD206). Estos marcadores se pueden utilizar para dirigirse a los TAM.

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 la liberación de partículas virales recién generadas. Los transgenes incorporados que codifican anticuerpos, los acopladores de célula T Biespecífica y otras "cargas útiles" se sintetizan recientemente y son secretados activamente por las células tumorales antes de su muerte, y algunas moléculas también se liberarán durante la lisis celular.

Las moléculas de anticuerpos con una vida media corta pueden ser particularmente adecuadas para uso en la presente divulgación porque esto minimiza los efectos fuera del objetivo porque el cuerpo elimina rápidamente las moléculas si están disponibles sistémicamente.

Las células NKT tienen la capacidad de dirigir y destruir los macrófagos asociados a los tumores. Sin embargo, su actividad parece estar inhibida por el entorno hipóxico del tumor. Esta actividad se puede restablecer al proporcionar a las células de la NKT IL-2 y/o IL-15, por ejemplo, codificada en el virus de la presente divulgación.

Por lo tanto, en una realización, el virus, de acuerdo con la presente divulgación, codifica aún más una citocina para activar y células NKT, por ejemplo, seleccionadas de IL-2, IL-15 y combinaciones de las mismas. El gen que codifica la citocina puede estar en la misma ubicación o en una ubicación diferente al gen que codifica la molécula de anticuerpo, por ejemplo, seleccionado de forma independiente de E1, E3, E4, B_x y B_y.

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.

El transgén, como se emplea en el presente documento, se refiere a un gen que se ha insertado en la secuencia del genoma, que es un gen que no es natural para el virus (exógeno) o que normalmente no se encuentra en esa ubicación particular en el virus. A continuación se dan ejemplos de transgenes. El transgén, como se emplea en el presente documento, también incluye un fragmento funcional del gen, es decir, una porción del gen que, cuando se inserta, es adecuada para realizar la función o la mayor parte de la función del gen de longitud completa.

El transgén y la secuencia codificante se utilizan indistintamente en el presente documento en el contexto de las inserciones en el genoma viral, a menos que el contexto indique lo contrario. La secuencia codificante, como se emplea en el presente documento, significa, por ejemplo, una secuencia de ADN que codifica un ARN funcional, péptido, polipéptido o proteína. Normalmente, la secuencia codificante es el ADN_c para el transgén que codifica el ARN funcional, el péptido, el polipéptido o la proteína de interés. A continuación se describen el ARN funcional, los péptidos, los polipéptidos y las proteínas de interés.

Claramente, el genoma del virus contiene secuencias codificantes de ADN. Los genes endógenos (que ocurren de forma natural) en la secuencia genómica del virus no se consideran un transgén, en el contexto de la

presente especificación, a menos que luego hayan sido modificados por técnicas recombinantes, como que se encuentren en un lugar no natural o en un entorno no natural

5 En una realización, el transgén, como se emplea en el presente documento, se refiere a un segmento de ADN que contiene un gen o secuencia de ADNc que se ha aislado de un organismo y se introduce en un organismo diferente, es decir, el virus de la presente divulgación. En una realización, este segmento no nativo del ADN puede retener la capacidad de producir ARN funcional, péptido, polipéptido o proteína.

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

15 En una realización, el transgén insertado codifica una proteína, polipéptido o péptido no humano (tal como una proteína, polipéptido o péptido de mamífero no humano) o molécula de ARN, por ejemplo de un ratón, rata, conejo, camello, llama o similar. Ventajosamente, los virus de la presente divulgación permiten que los transgenes sean transportados dentro de la célula cancerosa. Por lo tanto, las respuestas generadas por el paciente humano a una secuencia no humana (como una proteína) se pueden minimizar mediante este suministro intracelular.

20 Una secuencia de ADN puede comprender más de un transgén, por ejemplo, 1, 2, 3 o 4 transgenes, tal como 1 o 2.

Un casete de transgén puede comprender más de un transgén, por ejemplo, 1, 2, 3 o 4 transgenes, tal como 1 o 2.

25 En una o más realizaciones, el casete está dispuesto como se muestra en una o más de las Figuras o los ejemplos.

30 El casete de transgenes, como se emplea en el presente documento, 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 ARNm monocistrónicas y/o policistrónicas.

35 En una realización, el transgén o casete de transgén codifica un ARNm monocistrónico o policistrónico y, por ejemplo, el casete es adecuado para inserción en el genoma del adenovirus en una ubicación bajo el control de un promotor endógeno o exógeno o una combinación de los mismos.

40 El ARNm monocistrónico, como se emplea en el presente documento, se refiere a una molécula de ARNm que codifica un solo ARN funcional, péptido, polipéptido o proteína.

En una realización, el casete de transgén codifica ARNm monocistrónico.

45 En una realización, el casete de transgén en el contexto de un casete que codifica ARNm monocistrónico significa un segmento de ADN que contiene opcionalmente un promotor exógeno (que es una secuencia reguladora que determinará dónde y cuándo el transgén está activo) o un sitio de empalme (que es una secuencia reguladora que determina cuándo una molécula de ARNm será escindida por el espliceosoma), una secuencia codificante (es decir, el transgén), usualmente se deriva del ADNc para la proteína de interés, que contiene opcionalmente una secuencia de señal de poliA y una secuencia terminadora.

50 En una realización, el casete de transgén puede codificar una o más secuencias de ARNm policistrónicas.

55 El ARNm policistrónico, como se emplea en el presente documento, se refiere a una molécula de ARNm que codifica dos o más ARN funcionales, péptidos o proteínas o una combinación de los mismos. En una realización, el casete de transgén codifica un ARNm policistrónico.

60 En un casete de transgén de la realización, en el contexto de un casete que codifica ARNm policistrónico incluye un segmento de ADN que contiene opcionalmente un promotor exógeno (que es una secuencia reguladora que determinará dónde y cuándo el transgén está activo) o un sitio de empalme (que es una secuencia reguladora que determina cuándo una molécula de ARNm será escindida por el espliceosoma), dos o más secuencias codificantes (es decir, los transgenes), usualmente se derivan del ADNc para la proteína o péptido de interés, por ejemplo, en el que cada secuencia codificante está separada por un IRES o un péptido 2A. Después de la última secuencia codificante que se va a transcribir, el casete puede contener opcionalmente una secuencia de poliA y una secuencia terminadora.

65 En una realización, el casete de transgén codifica un ARNm monocistrónico seguido de un ARNm policistrónico. En otra realización, el casete de transgén es un ARNm policistrónico seguido de un ARNm monocistrónico.

En una realización, el adenovirus es un adenovirus humano. "Adenovirus", "serotipo" o "serotipo adenoviral", como se emplea en el presente documento, se refiere a cualquier adenovirus que se puede asignar a cualquiera de los más de 50 serotipos adenovirales actualmente conocidos, que se clasifican en subgrupos A-F, y se extiende aún más a cualquier serotipo adenoviral aún no identificado o no clasificado. Véase, por ejemplo, Strauss, "Adenovirus infections in humans," en *The Adenoviruses*, Ginsberg, ea., Plenum Press, New York, NY, pp. 451-596 (1984) y Shenk, "Adenoviridae: The Viruses and Their Replication," en *Fields Virology*, Vol.2, Fourth Edition, Knipe, 35ea., Lippincott Williams y Wilkins, pp. 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

Los adenovirus de la presente divulgación son virus del subgrupo B, a saber, Ad11, en particular Ad11p (la cepa de Slobitski) y derivados de los mismos, tal como EnAd.

Los adenovirus se designan a sus grupos/serotipos en base a la cápside, tal como el hexón y/o la fibra

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 realización, el adenovirus de la presente divulgación es quimérico. Cuando un adenovirus es quimérico, entonces se emplearán las características de la cápside externa para determinar el serotipo. La quimérica, como se emplea en el presente documento, 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 realización, el virus oncolítico tiene una fibra, proteínas hexón y pentón del mismo serotipo, por ejemplo Ad11, en particular Ad11p, por ejemplo Ad11p, por ejemplo encontrado en las posiciones 30812-31789, 18254-21100 y 13682-15367 de la secuencia genómica de este último, donde las posiciones de nucleótidos son relativas a la ID del Genbank 217307399 (número de acceso: GC689208).

En una realización, el adenovirus es enadenotucirev (también conocido como EnAd y anteriormente como ColoAd1). Enadenotucirev, como se emplea en el presente documento, se refiere al adenovirus quimérico de la SEQ ID NO: 38. Se trata de un adenovirus quimérico oncolítico competente para la replicación que tiene propiedades terapéuticas potenciadas en comparación con los adenovirus de tipo silvestre (véase WO2005/118825). EnAd tiene una región quimérica E2B, que presenta ADN de Ad11p y Ad3, y supresiones en E3/E4. Los cambios estructurales en enadenotucirev dan como resultado un genoma que es aproximadamente 3.5 kb más pequeño que Ad11p, lo que proporciona un "espacio" adicional para la inserción de transgenes.

Enadenotucirev (EnAd) tiene una fibra, pentón y hexón de Ad11p, por lo que es un virus del subgrupo B. Casi toda la región E3 y parte de la región E4 se suprime en EnAd. Por lo tanto, tiene un espacio significativo en el genoma para acomodar material genético adicional sin dejar de ser viable. Además, debido a que EnAd es un adenovirus del subgrupo B, la inmunidad preexistente en humanos es menos común que, por ejemplo, Ad5. Otros ejemplos de virus oncolíticos quiméricos con fibra Ad11, pentón y hexón incluyen el OvAd1 y el OvAd2 (véase WO2008/080003 SEQ ID NO: 2 y 3 en los mismos). Por lo tanto, en una realización el adenovirus es OvAd1 u OvAd2.

EnAd parece infectar preferentemente las células tumorales, se replica rápidamente en estas células y causa lisis celular. Esto, a su vez, puede generar respuestas inmunitarias inflamatorias, estimulando de esta manera al cuerpo para que también combata el cáncer. Se plantea la hipótesis de que parte del éxito de EnAd está relacionado con la rápida replicación del virus in vivo.

Si bien EnAd lisa selectivamente las células tumorales, puede ser posible introducir propiedades beneficiosas adicionales, por ejemplo aumentar la actividad terapéutica del virus o reducir los efectos secundarios del virus al armarlo con transgenes, como un transgén que codifica una proteína de señalización celular o un anticuerpo, o un transgén que codifica una entidad que estimula una(s) proteína(s) de señalización celular.

Armar ventajosamente a un virus, con ADN que codifica ciertas proteínas, tal como un acoplador de célula T Biespecífica, que se puede expresar dentro de la célula cancerosa, puede permitir que las propias defensas del cuerpo se empleen para combatir las células tumorales de manera más efectiva, por ejemplo, al hacer que las células sean más visibles para el sistema inmunológico o al suministrar un gen/proteína terapéutica preferentemente a las células tumorales objetivo.

Además, la capacidad de insertar transgenes que son reporteros en el genoma puede ayudar a los estudios clínicos o preclínicos.

Es importante que la expresión de los transgenes no afecte negativamente la replicación u otras propiedades ventajosas del virus. Por lo tanto, el gen o los genes se deben insertar en una ubicación que no comprometa la capacidad de replicación y otras propiedades ventajosas del virus. Además, el genoma de los adenovirus está muy empaquetado 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 acomodar.

El adenovirus oncolítico, como se emplea en el presente documento, significa un adenovirus que destruye preferentemente las células cancerosas en comparación con las células no cancerosas.

En una realización, el virus oncolítico es apoptótico. Es decir, acelera la muerte celular programada.

En una realización, el virus oncolítico es citolítico. La actividad citolítica de los adenovirus oncolíticos de la divulgación se puede determinar en estirpes celulares tumorales representativas y los datos se pueden convertir en una medida de potencia, por ejemplo, con un adenovirus perteneciente al subgrupo C, tal como Ad5, que se utiliza como estándar (es decir, dada una potencia de 1). Un método adecuado para determinar la actividad citolítica es un ensayo MTS (véase el Ejemplo 4, Figura 2 del documento WO2005/118825).

En una realización, el virus oncolítico es necrolítico. Es decir, provoca o acelera la necrosis celular o la muerte celular inmunogénica. En una realización, la muerte de células necrolíticas es ventajosa porque desencadena e induce respuestas inmunitarias en el paciente (huésped).

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

La capacidad de replicación, como se emplea en el presente documento, se refiere a un virus competente para la replicación o a un virus cuya replicación depende de un factor en las células cancerosas, por ejemplo, un factor regulado al alza, tal como p53 o similar.

En una realización, el virus es competente para replicación. La replicación competente en el contexto de la presente especificación 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 estirpe celular de empaquetamiento. Un vector viral, por ejemplo suprimido en la región E1, capaz de replicarse en una estirpe celular de empaquetamiento complementaria no es un virus competente para la replicación en el contexto actual.

Los vectores virales tienen una replicación deficiente y requieren una célula de empaquetamiento para proporcionar un gen complementario que permita la replicación.

El genoma de adenovirus, como se emplea en el presente documento, significa la secuencia de ADN que codifica las proteínas estructurales y los elementos 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 se encuentran en la misma posición en el genoma viral (denominados en el presente documento elementos estructurales). Cada extremo del genoma viral tiene una secuencia corta conocida como repetición terminal invertida (o ITR), que es necesaria para la replicación viral. El genoma viral contiene cinco unidades de transcripción temprana (E1A, E1B, E2, E3 y E4), tres unidades tempranas tardías (IX, IVa2 y E2 tardías) y una unidad tardía (mayor tardía) que se procesa para generar cinco familias de ARNm tardíos (L1-L5). Las proteínas codificadas por los genes tempranos están involucradas 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 el prefijo de la letra E y los genes tardíos tienen el prefijo de la letra L.

El genoma de los adenovirus está muy empaquetado, es decir, hay poca secuencia no codificante y, por lo tanto, puede ser difícil encontrar una ubicación adecuada para insertar transgenes. Los inventores actuales han identificado dos regiones de ADN donde se toleran los transgenes, en particular los sitios identificados que son adecuados para acomodar transgenes complicados, como los que codifican anticuerpos. Es decir, el

transgén se expresa sin afectar negativamente a la viabilidad del virus, propiedades nativas tal como las propiedades oncolíticas o la replicación.

5 En una realización, el virus oncolítico o oncolítico parcial, de acuerdo con la divulgación, puede ser el resultado de la supresión en la región E4 y/o E3, por ejemplo, suprimido en parte de la región E4 o completamente eliminado en la región E3, o alternativamente suprimido en parte de la región E4 (como E4orf4) y completamente suprimido en la región E3, por ejemplo, como se ejemplifica en las secuencias divulgadas en el presente documento.

10 En una realización, el virus oncolítico de la divulgación es quimérico. Quimérico, como se emplea en el presente documento, se refiere al virus que comprende ADN de dos o más serotipos diferentes y tiene propiedades de virus oncolíticos.

15 En una realización, el virus oncolítico es EnAd o un derivado activo del mismo, que conserva las propiedades beneficiosas esenciales del virus. EnAd se divulga en WO2005/118825 (y la secuencia completa del virus se proporciona en el presente documento SEQ ID NO: 38. La región quimérica E2B se divulga en el presente documento como SEQ ID NO: 71.

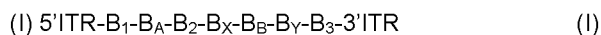
20 Los virus oncolíticos alternativos incluyen OvAd1 y OvAd2, que se divulgan respectivamente como la SEQ ID NO: 2 y 3 en el documento WO2008/080003.

25 Ventajosamente, los adenovirus de la presente divulgación exhiben una actividad viral similar, por ejemplo, replicación y/o infectividad, perfiles a EnAd después de la infección de una variedad de diferentes estirpes celulares de cáncer de colon in vitro.

Elementos estructurales de los adenovirus

30 La presente divulgación también se refiere a las nuevas secuencias de virus o componentes/constructos virales, tal como los plásmidos, divulgados en el presente documento.

En una realización, el adenovirus comprende un genoma que comprende la secuencia de la fórmula (I)



35 en la que: B₁ comprende E1A, E1B o E1A-E1B; B_A comprende E2B-L1-L2-L3-E2A-L4; B₂ 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 (en particular un transgén que codifica al menos un acoplador de célula T Biespecífica de acuerdo con la presente divulgación, por ejemplo bajo el control de un promotor exógeno) o ambos; B_B comprende L5; B_Y es una secuencia de ADN que comprende: uno o más transgenes que codifican al menos un acoplador de célula T Biespecífica de acuerdo con la presente divulgación, bajo el control de un promotor endógeno MPL y
40 opcionalmente un sitio de restricción; B₃ es un enlace o comprende E4.

En una realización, el adenovirus comprende un genoma que comprende la secuencia de la fórmula (Ia):



en la que: B_A, B₂, B_X, B_B, B_Y y B₃ se definieron anteriormente para la fórmula (I).

50 En una realización, el adenovirus comprende un genoma que comprende la secuencia de la fórmula (Ia) en la que B_X es un enlace.

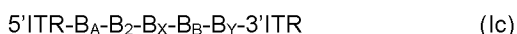
En una realización, el adenovirus comprende un genoma que comprende la secuencia de la fórmula (Ib):



en la que: B_A, B_X, B_B, B_Y y B₃ son como se definió anteriormente para la fórmula (I).

En una realización, el adenovirus comprende un genoma que comprende la secuencia de la fórmula (Ib) en la que B_X es un enlace.

60 En una realización, el adenovirus comprende un genoma que comprende la secuencia de la fórmula (Ic):



65 en la que: B_A, B_X, B_B y B_Y son como se definió anteriormente para la fórmula (I) y B₂ es E3.

En una realización, el adenovirus comprende un genoma que comprende la secuencia de la fórmula (Ic) en la que B_x es un enlace.

5 En una realización, el adenovirus comprende un genoma que comprende la secuencia de la fórmula (Ic) en la que B_y es un enlace.

En una realización el adenovirus comprende un genoma que comprende la secuencia de la fórmula (Id):

5'ITR-B₁-B_A-B_x-B_B-B_y-B₃-3'ITR (Id)

10 en la que: B₁, B_A, B_x, B₃ son como se definió anteriormente para la fórmula (I) y B_B comprende L5.

En una realización el adenovirus comprende un genoma que comprende la secuencia de la fórmula (Id) en la que B_x es un enlace.

15 En una realización el adenovirus comprende un genoma que comprende la secuencia de la fórmula (Ie):

5'ITR-B₁-B_A-B₂-B_B-B_y-3'ITR (Ie)

20 en la que: B₁, B_A, y B_y son como se definió anteriormente para la fórmula (I) y B₂ comprende E3; y B_B comprende L5.

En una realización se proporciona un compuesto de la fórmula (I), (Ia), (Ib), (Ic), (Id) o (Ie) en la que B_x y B_y no son un enlace y comprenden un transgén un sitio de restricción o ambos, tal como B_x y B_y son ambos un transgén. En una realización de la fórmula (I), (Ia), (Ib), (Ic) o (Id) solo B_y codifica uno o dos acopladores de célula T Biespecífica, por ejemplo un acoplador de célula T Biespecífica (y B_x no codifica un acoplador de célula T Biespecífica), en particular dicho acoplador de célula T Biespecífica o acopladores de célula T Biespecífica están bajo el control del promotor MPL endógeno. En una realización de la fórmula (I), (Ia), (Ib), (Ic) o (Id) B_x codifica un acoplador de célula T Biespecífica (por ejemplo bajo el control de un promotor exógeno tal como un promotor CMV) y B_y codifica un acoplador de célula T Biespecífica (por ejemplo bajo el control del promotor MPL endógeno).

Un enlace se refiere a un enlace covalente que conecta una secuencia de ADN con otra secuencia de ADN, por ejemplo, que conecta una sección del genoma del virus con otra. Por lo tanto, cuando una variable en la fórmula (I), (Ia), (Ib), (Ic), (Id) o (Ie) en el presente documento representa un enlace, la característica o elemento representado por el enlace está ausente, es decir, suprimido.

Dado que la estructura de los adenovirus es, en general, similar, los elementos que se presentan a continuación se discuten en términos de los elementos estructurales y la nomenclatura comúnmente utilizada que se refiere a ellos, que son conocidos por el experto. Cuando se hace referencia a un elemento en el presente documento, nos referimos a la secuencia de ADN que codifica el elemento o a una secuencia de ADN que codifica la misma proteína estructural del elemento en un adenovirus. Esto último es relevante debido a la redundancia del código de ADN. Es posible que sea necesario tener en cuenta la preferencia de los virus por el uso de codones para obtener resultados optimizados.

Cualquier elemento estructural de un adenovirus empleado en los virus de la presente divulgación puede comprender o consistir en la secuencia natural o puede tener similitud en la longitud dada de al menos el 95 %, como 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %. La secuencia original se puede modificar para omitir el 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 % o 1 % del material genético. El experto es consciente de que, al realizar cambios, los marcos de lectura del virus no se deben interrumpirse de tal manera que se interrumpa la expresión de las proteínas estructurales.

En una realización, el elemento dado es una secuencia de longitud completa, es decir, el gen de longitud completa.

En una realización, el elemento dado es menor que una longitud completa y conserva la misma función o la función correspondiente que la secuencia de longitud completa.

En una realización para un elemento dado que es opcional en las construcciones de la presente divulgación, la secuencia de ADN puede ser menor que una longitud completa y no tener ninguna funcionalidad.

Los genes estructurales que codifican proteínas estructurales o funcionales del adenovirus están generalmente ligados por regiones no codificantes del ADN. Por lo tanto, existe cierta flexibilidad en cuanto a dónde "cortar" la secuencia genómica del elemento estructural de interés (especialmente las regiones no codificantes del mismo) con el fin de insertar un transgén en los virus de la presente divulgación. Por lo tanto, a los efectos de la presente especificación, el elemento se considerará un elemento estructural de referencia en la medida en

que sea adecuado para el propósito y no codifique material extraño. Por lo tanto, si es apropiado, el gen se asociará con regiones no codificantes adecuadas, por ejemplo, como se encuentra en la estructura natural del virus.

Por lo tanto, en una realización, un inserto, tal como el ADN que codifica un sitio de restricción y/o un transgén, se inserta 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 esto puede ser necesario tener en cuenta.

Los sitios identificados en el presente documento, que están asociados con la región L5 (por ejemplo, entre L5 y la región E4), son adecuados para acomodar una variedad de secuencias de ADN que codifican entidades complejas tales como ARNi, citocinas, cadena simple o proteínas multiméricas, tales como anticuerpos, tal como un acoplador de célula T Biespecífica.

El gen, como se emplea en el presente documento, se refiere a las secuencias codificante y a cualquier no codificante asociada con la misma, por ejemplo, intrones y exones asociados. En una realización, un gen comprende o consta sólo de componentes estructurales esenciales, por ejemplo, la región codificante.

A continuación se presenta una discusión relacionada con elementos estructurales específicos de los adenovirus.

Las secuencias de Repetición Terminal Invertida (ITR) son comunes a todos los adenovirus conocidos y se denominaron así debido a su simetría, y son los orígenes cromosómicos virales de la replicación. Otra propiedad de estas secuencias es su capacidad para formar una horquilla.

La 5'ITR, como se emplea en el presente documento, se refiere a parte o la totalidad de una ITR desde el extremo 5' de un adenovirus, que conserva la función de la ITR cuando se incorpora a un adenovirus en una ubicación apropiada. En una realización, la 5'ITR comprende o consiste en la secuencia de aproximadamente 1 bp a 138 bp de la SEQ ID NO: 38 o una secuencia 90, 95, 96, 97, 98 o 99 % idéntica a la misma a lo largo de toda la longitud, en particular la secuencia que consiste en aproximadamente 1 bp a 138 bp de la SEQ ID NO: 38.

La 3'ITR, como se emplea en el presente documento, se refiere a parte o la totalidad de una ITR desde el extremo 3' de un adenovirus, que conserva la función de la ITR cuando se incorpora a un adenovirus en una ubicación apropiada. En una realización, la 3'ITR comprende o consiste en la secuencia de aproximadamente 32189 bp a 32326 bp de la SEQ ID NO: 38 o una secuencia 90, 95, 96, 97, 98 o 99 % idéntica a la misma a lo largo de toda la longitud, en particular la secuencia que consiste en aproximadamente 32189 bp a 32326 bp de la SEQ ID NO: 38.

B₁, como se emplea en el presente documento, se refiere a la codificación de la secuencia de ADN: parte o la totalidad de un E1A de un adenovirus, parte o la totalidad de la región E1B de un adenovirus, e independientemente parte o la totalidad de las regiones E1A y E1B de un adenovirus.

Cuando B₁ es un enlace, entonces las secuencias E1A y E1B se omitirán del virus. En una realización, B₁ es un enlace y, por lo tanto, el virus es un vector.

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

E1A, como se emplea en el presente documento, se refiere a la secuencia de ADN que codifica parte o la totalidad de una región E1A de un adenovirus. Esta última en el presente documento se refiere al polipéptido/proteína E1A. Puede estar mutada de tal manera que la proteína codificada por el gen E1A tenga cambios de aminoácidos conservadores o no conservadores, de tal manera que tenga: la misma función que el tipo silvestre (es decir, la proteína no mutada correspondiente); aumento de la función en comparación con la proteína de tipo silvestre; disminución de la función, como la ausencia de función en comparación con la proteína de tipo silvestre; o tiene una nueva función en comparación con la proteína de tipo silvestre o una combinación de la misma, según corresponda.

E1B, como se emplea en el presente documento, se refiere a la secuencia de ADN que codifica parte o la totalidad de una región E1B de un adenovirus (es decir, polipéptido o proteína), puede estar mutada de tal manera que la proteína codificada por el gen/región E1B tiene cambios de aminoácidos conservadores o no conservadores, de tal manera que tiene: la misma función que el tipo silvestre (es decir, la proteína no mutada correspondiente); aumento de la función en comparación con la proteína de tipo silvestre; disminución de la

función, tal como la ausencia de función en comparación con la proteína de tipo silvestre; o tiene una nueva función en comparación con la proteína de tipo silvestre o una combinación de la misma, según corresponda.

Por lo tanto, B₁ se puede modificar o no modificarse en relación con una región E1 de tipo silvestre, tal como una E1A y/o E1B de tipo silvestre. El experto puede identificar fácilmente si E1A y/o E1B están presentes o (parcialmente) suprimidos o mutados.

El tipo silvestre, como se emplea en el presente documento, se refiere a un adenovirus conocido. Un adenovirus conocido es aquel que ha sido identificado y nombrado, independientemente de si la secuencia está disponible.

En una realización, B₁ tiene la secuencia de 139 bp a 3932 bp de la SEQ ID NO: 38.

B_A, como se emplea en el presente documento, se refiere a la secuencia de ADN que codifica las regiones E2B-L1-L2-L3-E2A-L4, que incluyen las secuencias no codificantes, según corresponda. Por lo general, esta secuencia no comprenderá un transgén. En una 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 los mismos, tal como Ad3, Ad11 o una combinación de los mismos. En una realización es E2B-L1-L2-L3-E2A-L4 se refiere a que comprende estos elementos y otros elementos estructurales asociados con la región, por ejemplo B_A generalmente incluirá la secuencia que codifica la proteína IV2a, por ejemplo de la siguiente manera: IV2A IV2a-E2B-L1-L2-L3-E2A-L4

En una 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 realización, la región E2B tiene la secuencia de 5068 bp a 10355 bp de la SEQ ID NO: 38 o una secuencia 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la misma en toda su longitud.

En una realización, el E2B en el componente B_A comprende las secuencias mostradas en la SEQ ID NO: 71 (que corresponde a la SEQ ID NO: 3 divulgada en el documento WO2005/118825).

En una realización, B_A tiene la secuencia de 3933pb a 27184pb de la SEQ ID NO: 38.

E3, como se emplea en el presente documento, se refiere a la secuencia de ADN que codifica parte o la totalidad de una región E3 del adenovirus (es decir, proteína/polipéptido), puede estar mutada de tal manera que la proteína codificada por el gen E3 tiene cambios de aminoácidos conservadores o no conservadores, de tal manera que tiene la misma función que el tipo silvestre (la proteína no mutada correspondiente); aumento de la función en comparación con la proteína de tipo silvestre; disminución de la función, tal como la ausencia de función en comparación con la proteína de tipo silvestre o tiene una nueva función en comparación con la proteína de tipo silvestre o una combinación de la misma, según corresponda.

En una realización, la región E3 procede de un serotipo de adenovirus dado en la Tabla 1 o de una combinación de los mismos, en particular un serotipo del grupo B, por ejemplo Ad3, Ad7, Ad11 (en particular Ad11p), Ad14, Ad16, Ad21, Ad34, Ad35, Ad51 o una combinación de los mismos, tal como Ad3, Ad11 (en particular Ad11p) o una combinación de los mismos.

En una realización, la región E3 está parcialmente suprimida, por ejemplo, se suprime el 95 %, 90 %, 85 %, 80 %, 75 %, 70 %, 65 %, 55 %, 50 %, 45 %, 40 %, 35 %, 30 %, 25 %, 20 %, 15 %, 10 %, 5 %. En una realización, B₂ es un enlace, en el que el ADN que codifica la región E3 está ausente

En una realización, el ADN que codifica la región E3 puede ser reemplazado o interrumpido por un transgén. Como se emplea en el presente documento, "la región E3 reemplazada por un transgén, como se emplea en el presente documento, incluye parte o la totalidad de la región E3 que es reemplazada por un transgén.

En una realización, la región B₂ comprende la secuencia de 27185 bp a 28165 bp de la SEQ ID NO: 38.

En una realización, B₂ consiste en la secuencia de 27185 bp a 28165 bp de la SEQ ID NO: 38.

B_x, como se emplea en el presente documento, se refiere a la secuencia de ADN en la vecindad del extremo 5' del gen L5 en B_B. En la vecindad o proximal al extremo 5' del gen L5, como se emplea en el presente documento, se refiere a: adyacente (contiguo) al extremo 5' del gen L5 o una región no codificante inherentemente asociada con este gen, es decir, colindante o contigua al extremo 5' primario del gen L5 o una región no codificante inherentemente asociada con el mismo. Alternativamente, en la vecindad o proximal a se puede referir a estar cerca del gen L5, de tal manera que no hay secuencias codificantes entre la región B_x y el extremo 5' del gen L5.

Por lo tanto, en una realización, B_x se une directamente a una base de L5 que representa, por ejemplo, el inicio de una secuencia codificante del gen L5.

Por lo tanto, en una realización, B_x se une directamente a una base de L5 que representa, por ejemplo, el inicio de una secuencia no codificante, o se une directamente a una región no codificante naturalmente asociada con L5. Una región no codificante naturalmente asociada a L5, como se emplea en el presente documento, se refiere a parte de todas las regiones no codificantes que forman parte del gen L5 o que son contiguas al mismo, pero no forman parte de otro gen.

En una realización, B_x comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 39. Esta secuencia es una secuencia artificial no codificante en la que se puede insertar en la misma una secuencia de ADN, que comprende por ejemplo un transgén (o un casete de transgenes), un sitio de restricción o una combinación de estos. Esta secuencia es ventajosa porque actúa como un tampón, ya que permite cierta flexibilidad en la ubicación exacta del transgén, al tiempo que minimiza los efectos perturbadores sobre la estabilidad y viabilidad del virus.

El(los) inserto(s) puede(n) aparecer en cualquier lugar dentro de la SEQ ID NO: 39 desde el extremo 5', el extremo 3' o en cualquier punto entre bp 1 a 201, por ejemplo, entre los pares base 1/2, 2/3, 3/4, 4/5, 5/6, 6/7, 7/8, 8/9, 9/10, 10/11, 11/12, 12/13, 13/14, 14/15, 15/16, 16/17, 17/18, 18/19, 19/20, 20/21, 21/22, 22/23, 23/24, 24/25, 25/26, 26/27, 27/28, 28/29, 29/30, 30/31, 31/32, 32/33, 33/34, 34/35, 35/36, 36/37, 37/38, 38/39, 39/40, 40/41, 41/42, 42/43, 43/44, 44/45, 45/46, 46/47, 47/48, 48/49, 49/50, 50/51, 51/52, 52/53, 53/54, 54/55, 55/56, 56/57, 57/58, 58/59, 59/60, 60/61, 61/62, 62/63, 63/64, 64/65, 65/66, 66/67, 67/68, 68/69, 69/70, 70/71, 71/72, 72/73, 73/74, 74/75, 75/76, 76/77, 77/78, 78/79, 79/80, 80/81, 81/82, 82/83, 83/84, 84/85, 85/86, 86/87, 87/88, 88/89, 89/90, 90/91, 91/92, 92/93, 93/94, 94/95, 95/96, 96/97, 97/98, 98/99, 99/100, 100/101, 101/102, 102/103, 103/104, 104/105, 105/106, 106/107, 107/108, 108/109, 109/110, 110/111, 111/112, 112/113, 113/114, 114/115, 115/116, 116/117, 117/118, 118/119, 119/120, 120/121, 121/122, 122/123, 123/124, 124/125, 125/126, 126/127, 127/128, 128/129, 129/130, 130/131, 131/132, 132/133, 133/134, 134/135, 135/136, 136/137, 137/138, 138/139, 139/140, 140/141, 141/142, 142/143, 143/144, 144/145, 145/146, 146/147, 147/148, 148/149, 150/151, 151/152, 152/153, 153/154, 154/155, 155/156, 156/157, 157/158, 158/159, 159/160, 160/161, 161/162, 162/163, 163/164, 164/165, 165/166, 166/167, 167/168, 168/169, 169/170, 170/171, 171/172, 172/173, 173/174, 174/175, 175/176, 176/177, 177/178, 178/179, 179/180, 180/181, 181/182, 182/183, 183/184, 184/185, 185/186, 186/187, 187/188, 189/190, 190/191, 191/192, 192/193, 193/194, 194/195, 195/196, 196/197, 197/198, 198/199, 199/200 o 200/201.

En una realización, B_x comprende la SEQ ID NO: 39 con una secuencia de ADN insertada entre bp 27 y bp 28 o un lugar correspondiente entre las posiciones 28192 bp y 28193 bp de la SEQ ID NO: 38.

En una realización, el inserto es un inserto de sitio de restricción. En una realización, el inserto de sitio de restricción comprende uno o dos sitios de restricción. En una realización, el sitio de restricción es un inserto de sitio de restricción de 19 bp que comprende 2 sitios de restricción. En una realización, el inserto del sitio de restricción es un inserto del sitio de restricción de 9 bp que comprende 1 sitio de restricción. En una 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 realización, el sitio de restricción es un inserto de sitio de restricción de 19 bp que comprende 2 sitios de restricción y al menos un transgén, por ejemplo, uno o dos transgenes. En una realización, el inserto de sitio de restricción es un inserto de sitio de restricción de 9 bp que comprende 1 sitio de restricción y al menos un transgén, por ejemplo, uno, dos o tres transgenes, tal como uno o dos. En una realización, dos sitios de restricción intercalan uno o más, tal como dos transgenes (por ejemplo, en un casete de transgenes). En una realización, cuando B_x comprende dos sitios de restricción, dichos sitios de restricción son diferentes entre sí. En una realización mencionada, uno o más sitios de restricción en B_x no ocurren naturalmente en el genoma particular del adenovirus en el que se han insertado. En una realización dicho uno o más sitios de restricción en B_x son diferentes a otros sitios de restricción ubicados en otras partes del genoma del adenovirus, por ejemplo, diferentes a los sitios de restricciones que ocurren naturalmente y/o sitios de restricción introducidos en otras partes del genoma, tal como un sitio de restricción introducido en B_y. Por lo tanto, en una realización, el sitio o sitios de restricción permiten que el ADN en la sección se corte específicamente.

Ventajosamente, el uso de sitios de restricción "únicos" proporciona selectividad y control sobre el lugar donde se corta el genoma del virus, simplemente al utilizar la enzima de restricción adecuada.

El corte específico, como se emplea en el presente documento, se refiere a donde el uso de una enzima específica para los sitios de restricción corta el virus solo en la ubicación deseada, usualmente una ubicación, aunque ocasionalmente puede ser un par de ubicaciones. Un par de ubicaciones, como se emplean en el presente documento, se refiere a dos sitios de restricción en proximidad entre sí que están diseñados para ser cortados por la misma enzima (es decir, no se pueden diferenciar entre sí).

En una realización, el inserto del sitio de restricción es la SEQ ID NO: 50.

En una realización, B_x tiene la secuencia de 28166 bp a 28366 bp de la SEQ ID NO: 38.

En una realización, B_x es un enlace.

5 En una realización, B_x comprende un sitio de restricción, por ejemplo 1, 2, 3 o 4 sitios de restricción, tal como 1 o 2. En una realización, B_x comprende al menos un transgén, por ejemplo, 1 o 2 transgenes. En una realización, B_x comprende al menos un transgén, por ejemplo 1 o 2 transgenes y uno o más sitios de restricción, por ejemplo 2 o 3 sitios de restricción, en particular cuando los sitios de restricción intercalan un gen o la secuencia de ADN que comprende los genes para permitir que se extirpe específicamente del genoma y/o se reemplace. Alternativamente, los sitios de restricción pueden intercalar cada gen, por ejemplo, cuando hay dos transgenes, se requieren tres sitios de restricción diferentes para garantizar que los genes puedan ser extirpados y/o reemplazados selectivamente. En una realización, uno o más, por ejemplo, todos los transgenes están en forma de casete de transgenes. En una realización, B_x comprende la SEQ ID NO: 39. En una realización, la SEQ ID NO: 39 es interrumpida, por ejemplo, por un transgén. En la realización, la SEQ ID NO: 39 es ininterrumpida. En una realización, B_x no comprende un sitio de restricción. En una realización, B_x es un enlace. En una realización, B_x comprende o consiste en uno o más transgenes.

20 En una realización, B_y comprende un sitio de restricción, por ejemplo 1, 2, 3 o 4 sitios de restricción, tal como 1 o 2. En una realización, B_y comprende al menos un transgén, por ejemplo, 1 o 2 transgenes. En una realización, B_y comprende al menos un transgén, por ejemplo 1 o 2 transgenes y uno o más sitios de restricción, por ejemplo, 2 o 3 sitios de restricción, en particular cuando los sitios de restricción intercalan un gen o la secuencia de ADN que comprende los genes para permitir que se extirpe específicamente del genoma y/o se reemplace. Alternativamente, los sitios de restricción pueden intercalar cada gen, por ejemplo, cuando hay dos transgenes, se requieren tres sitios de restricción diferentes para garantizar que los genes puedan ser extirpados y/o reemplazados selectivamente. En una realización, uno o más, por ejemplo, todos los transgenes están en forma de casete de transgenes. En una realización B_y comprende la SEQ ID NO: 40. En una realización, la SEQ ID NO: 40 es interrumpida, por ejemplo, por un transgén. En una realización, B_y no comprende un sitio de restricción. En una realización, B_y comprende o consiste en uno o más transgenes.

30 En una realización, B_x y B_y comprenden cada uno un sitio de restricción, por ejemplo 1, 2, 3 o 4 sitios de restricción, tal como 1 o 2. En una realización, B_x y B_y comprenden cada uno al menos un transgén, por ejemplo, 1 o 2 transgenes. En una realización, B_x y B_y comprenden cada uno al menos un transgén, por ejemplo 1 o 2 transgenes y uno o más sitios de restricción, por ejemplo 2 o 3 sitios de restricción, en particular cuando los sitios de restricción intercalan un gen o la secuencia de ADN que comprende los genes para permitir que sea específicamente extirpado del genoma y/o reemplazado. Alternativamente, los sitios de restricción pueden intercalar cada gen, por ejemplo, cuando hay dos transgenes, se requieren tres sitios de restricción diferentes para garantizar que los genes puedan ser extirpados y/o reemplazados selectivamente. En una realización, uno o más, por ejemplo, todos los transgenes están en forma de casete de transgenes. En una realización, B_x y B_y comprenden la SEQ ID NO: 39 y SEQ ID NO: 40 respectivamente. En una realización, B_x y B_y no comprenden un sitio de restricción. En una realización, B_x es un enlace y B_y no es un enlace.

45 B_B, como se emplea en el presente documento, se refiere a la secuencia de ADN que codifica la región L5. Como se emplea en el presente documento, la región L5 se refiere a la secuencia de ADN que contiene el gen que codifica el polipéptido/proteína de la fibra, según corresponda en el contexto El gen/región de la fibra codifica la proteína de la fibra, que es un componente principal de la cápside de los adenovirus. La fibra funciona en el reconocimiento de receptores y contribuye a la capacidad del adenovirus para unirse e infectar selectivamente las células.

50 En los virus de la presente divulgación, la fibra puede provenir de cualquier cepa de adenovirus del serotipo 11, tal como Ad11p. En una realización, B_B tiene la secuencia de 28367 bp a 29344 bp de la SEQ ID NO: 38.

55 La secuencia de ADN en relación con B_y, como se emplea en el presente documento, se refiere a la secuencia de ADN en la vecindad del extremo 3' del gen L5 de B_B. En la vecindad o proximal al extremo 3' del gen L5, como se emplea en el presente documento, se refiere a: adyacente (contiguo) al extremo 3' del gen L5 o una región no codificante inherentemente asociada con él, es decir, colindante o contigua al extremo 3' primario del gen L5 o una región no codificante inherentemente asociada con él (es decir, toda o parte de una secuencia no codificante endógena a L5). Alternativamente, en la vecindad o proximal a se puede referir a estar cerca del gen L5, de tal manera que no hay secuencias codificantes entre la región B_y y el extremo 3' del gen L5.

60 Por lo tanto, en una realización, B_y se une directamente a una base de L5 que representa el "extremo" de una secuencia codificante.

65 Por lo tanto, en una realización, B_y se une directamente a una base de L5 que representa el "extremo" de una secuencia no codificante, o se une directamente a una región no codificante naturalmente asociada con L5.

Inherente y naturalmente se utilizan indistintamente en el presente documento. En una realización By comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 40. Esta secuencia es una secuencia no codificante en la que se puede insertar una secuencia de ADN, por ejemplo que comprende un transgén (o un casete de transgenes), un sitio de restricción o una combinación de los mismos. Esta secuencia es ventajosa porque actúa como un

El(los) inserto(s) puede(n) aparecer en cualquier lugar dentro de la SEQ ID NO: 40 desde el extremo 5', el extremo 3' o en cualquier punto entre bp 1 a 35, por ejemplo entre los pares base 1/2, 2/3, 3/4, 4/5, 5/6, 6/7, 7/8, 8/9, 9/10, 10/11, 11/12, 12/13, 13/14, 14/15, 15/16, 16/17, 17/18, 18/19, 19/20, 20/21, 21/22, 22/23, 23/24, 24/25, 25/26, 26/27, 27/28, 28/29, 29/30, 30/31, 31/32, 32/33, 33/34, o 34/35.

En una realización, By comprende la SEQ ID NO: 40 con una secuencia de ADN insertada entre las posiciones bp 12 y 13 o un lugar correspondiente a 29356 bp y 29357 bp en la SEQ ID NO: 38. En una realización, el inserto es un inserto de sitio de restricción; en una realización, el inserto de sitio de restricción comprende uno o dos sitios de restricción. En una realización, el sitio de restricción es un inserto de sitio de restricción de 19 bp que comprende 2 sitios de restricción. En una realización, el inserto del sitio de restricción es un inserto del sitio de restricción de 9 bp que comprende 1 sitio de restricción. En una realización, el inserto de sitio de restricción comprende uno o dos sitios de restricción y al menos un transgén, por ejemplo, uno o dos o tres transgenes, tal como uno o dos transgenes. En una realización, el sitio de restricción es un inserto de sitio de restricción de 19 bp que comprende 2 sitios de restricción y al menos un transgén, por ejemplo, uno o dos transgenes. En una realización, el inserto de sitio de restricción es un inserto de sitio de restricción de 9 bp que comprende 1 sitio de restricción y al menos un transgén, por ejemplo, uno o dos transgenes. En una realización, dos sitios de restricción intercalan uno o más, tal como dos transgenes (por ejemplo, en un casete de transgenes). En una realización, cuando By comprende dos sitios de restricción, dichos sitios de restricción son diferentes entre sí. En una realización mencionada, uno o más sitios de restricción en By no son de ocurrencia natural (como únicos) en el genoma particular del adenovirus en el que se han insertado. En una realización, uno o más sitios de restricción en By son diferentes a otros sitios de restricción ubicados en otras partes del genoma del adenovirus, por ejemplo, diferentes a los sitios de restricciones que ocurren naturalmente o a los sitios de restricción introducidos en otras partes del genoma, tal como B_x. Por lo tanto, en una realización, el sitio o sitios de restricción permiten que el ADN en la sección se corte específicamente.

En una realización, el inserto del sitio de restricción es la SEQ ID NO: 51.

En una realización, By tiene la secuencia de 29345 bp a 29379 bp de la SEQ ID NO: 38.

En una realización, el inserto está después de bp 12 en la SEQ ID NO: 40.

En una realización, el inserto se encuentra aproximadamente en la posición 29356 bp de la SEQ ID NO: 38.

En una realización, el inserto es un casete de transgenes que comprende uno o más transgenes, por ejemplo 1, 2 o 3, tal como 1 o 2.

E4, como se emplea en el presente documento, se refiere a la secuencia de ADN que codifica parte o la totalidad de una región E4 del adenovirus (es decir, la región de polipéptido/proteína), que puede estar mutada de tal manera que la proteína codificada por el gen E4 tiene cambios de aminoácidos conservadores o no conservadores, y tiene la misma función que el tipo silvestre (la proteína no mutada correspondiente); aumento de la función en comparación con la proteína de tipo silvestre; disminución de la función, tal como la ausencia de función en comparación con la proteína de tipo silvestre o tiene una nueva función en comparación con la proteína de tipo silvestre o una combinación de la misma, según corresponda. En una realización, la región E4 tiene E4orf4 suprimido.

En una realización, la región E4 se suprime parcialmente, por ejemplo, se suprime el 95 %, 90 %, 85 %, 80 %, 75 %, 70 %, 65 %, 60 %, 55 %, 50 %, 45 %, 40 %, 35 %, 30 %, 25 %, 20 %, 15 %, 10 % o 5 %. En una realización, la región E4 tiene la secuencia de 32188 bp a 29380 bp de la SEQ ID NO: 38.

En una realización, B₃ es un enlace, es decir, en el que E4 está ausente.

En una realización, B₃ tiene la secuencia que consiste en 32188 bp a 29380 bp de la SEQ ID NO: 38.

Como se emplea en el presente documento, los rangos de números incluyen los puntos finales.

El experto apreciará que los elementos de las fórmulas en el presente documento contenidas, tal como la fórmula (I), (Ia), (Ib), (Ic), (Id) e (Ie) son contiguos y pueden incorporar secuencias de ADN no codificantes, así como los genes y secuencias de ADN codificantes (características estructurales) mencionados en el presente documento. En una o más realizaciones, las fórmulas de la presente divulgación intentan describir una

secuencia que ocurre naturalmente en el genoma del adenovirus. En este contexto, quedará claro para el experto que la fórmula se refiere a los elementos principales que caracterizan la sección relevante del genoma y no pretende ser una descripción exhaustiva del tramo genómico del ADN.

E1A, E1B, E3 y E4, como se emplean en el presente documento, se refieren de forma independiente al tipo silvestre y equivalentes de los mismos, formas mutadas o parcialmente suprimidas de cada región tal y como se describe en el presente documento, en particular una secuencia de tipo silvestre de un adenovirus conocido.

"Inserto", como se emplea en el presente documento, se refiere a una secuencia de ADN que se incorpora ya sea en el extremo 5', el extremo 3' o dentro de un segmento de referencia de secuencia de ADN dado, de tal manera que interrumpe la secuencia de referencia. Esta última es una secuencia de referencia empleada como punto de referencia en relación con el cual se ubica el inserto. En el contexto de la presente divulgación, los insertos generalmente ocurren dentro de la SEQ ID NO: 10 o SEQ ID NO: 11. Un inserto puede ser un inserto de sitio de restricción, un casete de transgén o ambos. Cuando se interrumpe la secuencia, el virus seguirá comprendiendo la secuencia original, pero generalmente será como dos fragmentos intercalados en el inserto.

En una realización, el transgén o casete de transgén no comprende un transposón de inserción no sesgado, como un transposón TN7 o parte del mismo. El transposón Tn7, como se emplea en el presente documento, se refiere a un transposón de inserción no sesgado, tal como se describe en el documento WO2008/080003.

En una realización, uno o más sitios de restricción en B_x y B_y se seleccionan independientemente de un sitio de restricción específico para una enzima descrita en el presente documento, por ejemplo, NotI, FseI, AsiSI, SgfI y SbfI, en particular, los sitios de restricción insertados son todos diferentes, como los sitios específicos para NotI y los sitios específicos para FseI ubicados en B_x y SgfI y SbfI ubicados en B_y.

Como se discutió anteriormente en una realización, la región B_x y/o B_y no comprenden un sitio de restricción. Ventajosamente, los virus y las construcciones de la presente divulgación se pueden preparar sin sitios de restricción, por ejemplo, utilizando técnicas sintéticas. Estas técnicas permiten una gran flexibilidad en la creación de los virus y construcciones. Además, los inventores actuales han establecido que las propiedades de los virus y construcciones no disminuyen cuando se preparan por técnicas sintéticas.

Promotores

Promotor, como se emplea en el presente documento, significa una región de ADN que inicia la transcripción de un gen o genes en particular. Los promotores generalmente se encuentran proximales a los genes que transcriben, en la misma hebra y en dirección ascendente (es decir, 5') en el ADN. Proximal, como se emplea en este contexto, significa lo suficientemente cercano como para funcionar como promotor. En una realización, el promotor se encuentra a menos de 100 bp del sitio de inicio de la transcripción. Por lo tanto, el promotor endógeno, como se emplea en el presente documento, se refiere a un promotor que se encuentra naturalmente en (es decir, es nativo de) el adenovirus (o construcción) en el que se inserta el transgén. En una o más realizaciones, el promotor endógeno empleado es el promotor natural del virus en su ubicación original en el genoma del virus, en particular este es el promotor primario o único empleado en la expresión del transgén o transgenes. En una realización, el promotor endógeno utilizado para promover la traducción y, opcionalmente, la transcripción del transgén es un residente, es decir, es uno integrado en el genoma del adenovirus y no introducido previamente por técnicas recombinantes.

Bajo el control de un promotor endógeno, como se emplea en el presente documento, se refiere a donde el transgén/casete de transgén se inserta en la orientación apropiada para estar bajo el control de dicho promotor endógeno. Es decir, donde el promotor está generalmente en la hebra antisentido, el casete se inserta, por ejemplo, en la orientación antisentido.

Dicho esto, los genes se pueden expresar en una de dos orientaciones. Sin embargo, generalmente una orientación proporciona mayores niveles de expresión sobre la otra orientación, para un transgén dado (particular).

En una realización, el casete está en la orientación de sentido. Es decir, se transcribe en una dirección de 5' a 3'. En una realización, el casete está en la orientación antisentido. Es decir, transcrito en la orientación de 3' a 5'.

Los promotores endógenos del virus pueden, por ejemplo, utilizarse al emplear un gen que codifica un transgén y una secuencia aceptora de empalme. Por lo tanto, en una realización, el casete comprenderá una secuencia aceptora de empalme cuando esté bajo el control de un promotor endógeno. Por lo tanto, en una realización, la secuencia codificante, por ejemplo, la secuencia que codifica el anticuerpo o el fragmento de unión al anticuerpo, comprende además una secuencia aceptora de empalme.

En una realización, el transgén, los transgenes o el casete de transgenes están bajo el control de un promotor E4 o de un promotor tardío importante, tal como el promotor tardío principal (promotor ML).

5 Bajo el control de lo empleado en el presente documento significa que el transgén se activa, es decir, se transcribe, cuando lo dicta un promotor particular.

10 El Promotor tardío principal (promotor ML o MLP), como se emplea en el presente documento, se refiere al promotor de adenovirus que controla la expresión de los genes "expresados tardíamente", tal como el gen L5. El MLP es un promotor de la "cadena de sentido". Es decir, el promotor influye en los genes que están en dirección descendente del promotor en la dirección 5'-3'. El promotor tardío principal, como se emplea en el presente documento, se refiere al promotor tardío principal original ubicado en el genoma del virus.

15 El promotor E4, como se emplea en el presente documento, se refiere al promotor de adenovirus de la región E4. La región E4 es una región antisentido; Por lo tanto, el promotor es un promotor antisentido. Es decir, el promotor está en dirección ascendente de la región E4 en la dirección 3'-5'. Por lo tanto, cualquier casete de transgén bajo el control del promotor E4 puede necesitar ser orientado adecuadamente. En una realización, el casete bajo el control del promotor E4 está en la orientación antisentido. En una realización, el casete está bajo el control del promotor E4 en la orientación de sentido. El promotor E4, como se emplea en el presente documento, se refiere al promotor E4 original ubicado en el genoma del virus.

20 Por lo tanto, en una realización se proporciona un adenovirus oncolítico competente para replicación del serotipo 11 (tal como Ad11p) o un derivado del virus del mismo en el que la fibra, el hexón y la cápside son el serotipo 11 (tal como el Ad11p), en el que el genoma del virus comprende una secuencia de ADN que codifica un anticuerpo terapéutico o un fragmento de unión al anticuerpo (tal como un acoplador de célula T Biespecífica), en el que dicha secuencia de ADN bajo el control de un promotor endógeno al promotor tardío principal, de tal manera que el transgén no interfiere con la replicación del virus, por ejemplo, se asocia con la región L5 (es decir, antes o después de dicha región), tal como la que se ubica después de L5 en el genoma del virus, en particular entre la L5 y la región E4.

30 En una realización, un promotor endógeno se introduce en el genoma viral en una ubicación deseada mediante técnicas recombinantes, por ejemplo, se introduce en el casete de transgenes. Sin embargo, en el contexto de la presente especificación, esta disposición se denominará generalmente promotor exógeno.

35 En una realización, el casete de transgén comprende un promotor exógeno. El promotor exógeno, como se emplea en el presente documento, se refiere a un promotor que no es de ocurrencia natural en el adenovirus en el que se inserta el transgén. Normalmente, los promotores exógenos provienen de otros virus o son promotores de mamíferos. El promotor exógeno, como se emplea en el presente documento, significa un elemento de ADN, generalmente ubicado en dirección ascendente del gen de interés, que regula la transcripción del gen.

40 En una realización, el regulador de la expresión génica es un promotor exógeno, por ejemplo, CMV (promotor de citomegalovirus), CBA (promotor de actina beta de pollo) o PGK (promotor de fosfoglicerato quinasa 1), tal como el promotor de CMV.

45 En una realización, el promotor exógeno de CMV empleado tiene la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 52. En una realización, el promotor exógeno PGK empleado tiene la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 53. En una realización, el promotor exógeno CBA empleado tiene la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 54.

50 En una realización, el promotor exógeno es un promotor de célula presentadora de antígeno. El promotor de células presentadoras de antígenos, como se emplea en el presente documento, se refiere a un promotor de un gen que se expresa selectivamente por células presentadoras de antígenos, como las células dendríticas o los macrófagos. Dichos genes incluyen, pero no se limitan a: FLT-3, ligando FLT-3, TLRs, CD1a, CD1c, CD11b, CD11c, CD80, CD83, CD86, CD123, CD172a, CD205, CD207, CD209, CD273, CD281, CD283, CD286, CD289, CD287, CXCR4, Ligando GITR, IFN- α 2, IL-12, IL-23, ILT1, ILT2, ILT3, ILT4, ILT5, ILT7, Receptor TSLP, CD141, CD303, CADM1, CLEC9a, XCR1 o CD304; mediadores de procesamiento y presentación de antígenos como CTIIA o GILT. Por lo tanto, en una realización, el promotor exógeno es adecuado para la expresión selectiva de transgenes en dichas células presentadoras de antígenos.

60 Otras secuencias reguladoras

65 "Regulador de la expresión génica" (o elemento regulador/regulador) como se emplea en el presente documento se refiere a una característica genética, como un promotor, potenciador o una secuencia aceptora de empalme que desempeña un papel en la expresión génica, normalmente al iniciar o mejorar la transcripción o traducción.

La "secuencia aceptora de empalme", "aceptor de empalme" o "sitio de empalme", como se emplea en el presente documento, se refiere a una secuencia reguladora que determina cuándo una molécula de ARNm será reconocida por pequeñas ribonucleoproteínas nucleares del complejo de espliceosoma. Una vez ensamblado, el espliceosoma cataliza el empalme entre el sitio aceptor del empalme de la molécula de ARNm y un sitio donante de empalme en dirección ascendente, produciendo una molécula de ARNm madura que se puede traducir para producir un solo polipéptido o proteína.

En la presente invención se pueden emplear secuencias de aceptores de empalme de diferentes tamaños y estas se pueden describir como aceptor de empalme corto (pequeño), aceptor de empalme (medio) y aceptor de empalme ramificado (grande).

SSA, como se emplea en el presente documento, significa un aceptor de empalme corto, que normalmente comprende solo el sitio de empalme, por ejemplo, 4 pares base. El SA, como se emplea en el presente documento, significa un aceptor de empalme, normalmente comprende el aceptor de empalme corto y el tracto de polipirimidina, por ejemplo, 16 bp. bSA, como se emplea en el presente documento, significa un aceptor de empalme ramificado, normalmente comprende el aceptor de empalme corto, el tracto de polipirimidina y el punto de ramificación, por ejemplo, 26 pares base.

En una realización, el aceptor de empalme empleado en las construcciones de la divulgación se muestra en la SEQ ID NO: 55 a 57. En una realización, el SSA tiene la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 55. En una realización, el SA tiene la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 56. En una realización, el bSA tiene la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 57. En una realización, la secuencia del aceptor de empalme se selecciona independientemente del grupo que comprende TGCTAATCTT CCTTTCTCTC TTCAGG (SEQ ID NO: 57), CCTTTCTCTCTT CAGG (SEQ ID NO: 56), y CAGG (SEQ ID NO: 55).

En una realización, el sitio de empalme es procedido inmediatamente (es decir, seguido en una dirección de 5' a 3') por una secuencia de Kozak de consenso que comprende CCACC. En una realización, el sitio de empalme y la secuencia de Kozak están intercalados por hasta 100 pares base o menos. En una realización, la secuencia de Kozak tiene la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 58.

Normalmente, cuando está bajo el control de un promotor endógeno o exógeno (tal como un promotor endógeno), la secuencia codificante será precedida inmediatamente por una secuencia de Kozak. El inicio de la región de codificación se indica mediante el codón de iniciación (AUG), por ejemplo, en el contexto de la secuencia (gcc)gccRccAUGg [SEQ ID NO: 59] el inicio del "inicio" de las secuencias codificantes se indica con las bases en negrita. Una letra minúscula denota bases comunes en esta posición (que, no obstante, pueden variar) y las letras mayúsculas indican bases muy conservadas, es decir, la secuencia 'AUGG' es constante o rara vez, o nunca, cambia; 'R' indica que una purina (adenina o guanina) se observa usualmente en esta posición y la secuencia entre paréntesis (gcc) es de significado incierto. Por lo tanto, en una realización, el codón de iniciación AUG se incorpora a una secuencia de Kozak.

La secuencia de ADN de Entrada Interna del Ribosoma, como se emplea en el presente documento, se refiere a una secuencia de ADN que codifica una secuencia de Entrada Interna del Ribosoma (IRES). IRES, como se emplea en el presente documento, significa una secuencia de nucleótidos que permite el inicio de la traducción de una secuencia de ARN mensajero (ARNm), que incluye la iniciación que comienza dentro de una secuencia de ARNm. Esto es particularmente útil cuando el casete codifica ARNm policistrónico. El uso de un IRES da como resultado un ARNm policistrónico que se traduce en múltiples proteínas o péptidos individuales. En una realización, la secuencia de ADN de Entrada Interna del Ribosoma tiene la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 60. En una realización, un IRES particular solo se utiliza una vez en el genoma. Esto puede tener beneficios con respecto a la estabilidad del genoma.

"Péptido 2A de alta eficiencia de autoescisión" o "péptido 2A", como se emplea en el presente documento, se refiere a un péptido que se escinde eficientemente después de la traducción. Los péptidos 2A adecuados incluyen P2A, F2A, E2A y T2A. Los inventores actuales han observado que una vez que una secuencia específica de ADN que codifica un péptido 2A determinado se utiliza una vez, la misma secuencia específica de ADN no se puede utilizar por segunda vez. Sin embargo, la redundancia en el código de ADN se puede utilizar para generar una secuencia de ADN que se traduzca en el mismo péptido 2A. El uso de péptidos 2A es particularmente útil cuando el casete codifica ARNm policistrónico. El uso de péptidos 2A da como resultado la traducción de una sola cadena polipeptídica que se modifica después de la traducción para generar múltiples proteínas o péptidos individuales.

En una realización, el péptido P2A codificado empleado tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 61. En una realización, el péptido F2A codificado empleado tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 62. En una realización, el péptido E2A codificado empleado tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 63. En una realización, el péptido T2A codificado empleado tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 64.

En una realización, un ARNm o cada ARNm codificado por un transgén(s) comprende una secuencia de señal de poliadenilación, tal como normalmente en el extremo de una secuencia de ARNm, por ejemplo, como se muestra en la SEQ ID NO: 65. Por lo tanto en una realización, el transgén o el casete de transgén, comprende al menos una secuencia que codifica una secuencia de señal de poliadenilación.

“PoliA”, “señal de poliadenilación” o “secuencia de poliadenilación”, como se emplea en el presente documento, significa una secuencia de ADN, que generalmente contiene un sitio AATAAA, que una vez transcrita puede ser reconocida por un complejo multiproteico que escinde y poliadenila la molécula de ARNm naciente. En una realización, la secuencia de poliadenilación tiene la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 65.

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

En una realización, la secuencia que codifica una proteína/polipéptido/péptido, tal como un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo (tal como un acoplador de célula T Biespecífica de acuerdo con la presente divulgación) comprende además una señal de poliadenilación.

Moléculas codificadas por transgén

Como se describe en el presente documento, al menos un transgén en el virus codifica un acoplador de célula T Biespecífica, de acuerdo con la presente divulgación.

Los antígenos del cáncer (también conocidos como antígenos tumorales) son una categoría de particular interés e incluyen, por ejemplo, seleccionados de CEA, MUC-1, EpCAM, receptores HER HER1, HER2, HER3, HER4, PEM, A33, G250, antígenos de carbohidratos Le^y, Le^x, Le^p, PSMA, TAG-72, STEAP1, CD166, CD24, CD44, E-caderina, SPARC, ErbB2, ErbB3, WT1, MUC1, LMP2, idioma, HPV E6yE7, EGFRvIII, HER-2/neu, MAGE A3, p53 no mutante, p53 mutante, NY-ESO-1, GD2, PSMA, PCSA, PSA, MelanA/MART1, Ras mutante, proteinasa3 (PR1), bcr-abl, tirosinasa, survivina, PSA, hTERT, particularmente WT1, MUC1, HER-2/neu, NY-ESO-1, survivina y hTERT.

Los antígenos estromales incluyen antígenos de fibroblastos, por ejemplo, los descritos en el presente documento, como FAP, antígenos de macrófagos asociados a tumores y antígenos de células supresoras derivadas mieloides, que incluyen CD163, CD206, CD68, CD11c, CD11b, CD14, receptor de CSF1, CD15, CD33 y CD66b.

Los objetivos enumerados a continuación se pueden, si es apropiado, codificar en un acoplador de célula T Biespecífica de acuerdo con la presente divulgación o, alternativamente, se pueden proporcionar como un transgén terapéutico adicional, o ambos.

En una realización, el transgén o los transgenes codifican independientemente una proteína, péptido, molécula de ARN, tal como una molécula de ARN. Ventajosamente, el transgén se puede suministrar intracelularmente y posteriormente se puede transcribir y, si es apropiado, traducir. Ejemplos de material genético codificado por un transgén incluyen, por ejemplo, anticuerpos o fragmentos de unión a los mismos, quimiocinas, citocinas, inmunomoduladores, enzimas (por ejemplo, capaces de convertir profármacos en el agente activo) y una molécula de ARNi.

El péptido, como se emplea en el presente documento, se refiere a una secuencia de aminoácidos de 2 a 50 residuos, por ejemplo, de 5 a 20 residuos. El polipéptido como se emplea en el presente documento se refiere a una secuencia de aminoácidos de más de 50 residuos sin estructura terciaria, en particular sin estructura secundaria y terciaria. La proteína se refiere a una secuencia de aminoácidos de más de 50 residuos, con estructura secundaria y/o terciaria, en particular con estructura segunda y terciaria.

En una realización, la secuencia codificante codifica un ARN terapéutico, péptido terapéutico, polipéptido terapéutico o proteína terapéutica (es decir, es un gen terapéutico).

El gen inmunomodulador o transgén, como se emplea en el presente documento, significa un gen que codifica un péptido o molécula de proteína que puede modificar cualitativa o cuantitativamente una actividad o actividades de las células del sistema inmunitario.

El gen terapéutico, como se emplea en el presente documento, significa un gen que codifica una entidad que puede ser útil en el tratamiento, la mejora o la prevención de una enfermedad, por ejemplo, el gen expresa una proteína terapéutica, polipéptido, péptido o ARN, que al menos ralentiza, detiene o revierte la progresión de una enfermedad, tal como el cáncer.

En una realización, la entidad codificada por el transgén cuando se transcribe o traduce en una célula, como una célula cancerosa, aumenta la producción de señales de peligro por parte de la célula. Las “señales de

peligro", como se emplean en el presente documento, se refieren a una variedad de moléculas producidas por células que sufren lesiones, estrés o muerte no apoptótica y que actúan como señales de alarma, por ejemplo, estimulando las células del sistema inmunitario innato para que respondan directamente, así como sirviendo para potenciar la activación de las células del sistema inmunitario adaptativo.

5

Se sabe que el microambiente de los tumores a menudo cambia de tal manera que las respuestas inmunitarias humanas naturales están reguladas a la baja. Por lo tanto, la capacidad de reiniciar las respuestas inmunitarias desde el interior del tumor es potencialmente muy interesante en el tratamiento del cáncer.

10

En una realización, el péptido o proteína terapéutica codificada está diseñado para ser secretado en el entorno extracelular. En una realización, el ARN funcional, péptido, polipéptido o proteína, tal como el anticuerpo, se libera en el microambiente externo de la célula, por ejemplo, en el sobrenadante de cultivo, o in vivo: tejido, estroma, circulación, sangre y/o sistema linfático.

15

En una realización, el péptido, polipéptido o proteína (que incluye un acoplador de célula T Biespecífica de acuerdo con la presente divulgación), codificado por el transgén, comprende una secuencia de señal. El péptido señal, como se emplea en el presente documento, se refiere a una secuencia corta de péptidos de residuo 13-36 ubicados en el terminal N de las proteínas que ayudan a la entrada de la proteína en la ruta de secreción o expresión de membrana. En una realización, la secuencia líder (péptido señal) tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 66 o 67.

20

En otra realización, el péptido terapéutico o proteína codificada, como un anticuerpo, está diseñado para expresarse como una forma anclada a la membrana en la membrana superficial de la célula, por ejemplo, al incluir la codificación de un dominio transmembrana en la proteína o un sitio para la adhesión de un anclaje de membrana lipídica. Por lo general, el acoplador de célula T Biespecífica o los acopladores de célula T Biespecífica de la presente divulgación no se expresan como un formato de anclaje de superficie celular

25

En una realización, el ARN funcional, péptido, polipéptido o proteína, tal como un anticuerpo, se libera de la célula infectada por el adenovirus, por ejemplo, por secreción activa o como resultado de la lisis celular. Por lo tanto, en una realización, el adenovirus lisa la célula, liberando de esta manera el ARN funcional, péptido, polipéptido o proteína, tal como el anticuerpo.

30

En otra realización, el péptido o proteína terapéutica adicional codificada, tal como un anticuerpo, está diseñado para ser retenido dentro de la célula intacta.

35

Ventajosamente, el ARN funcional, péptido, polipéptido o proteína, tal como los anticuerpos expresados por los adenovirus de la presente divulgación, se pueden detectar en el tejido in vivo como ARNm y proteína de anticuerpo. Además, el ARN funcional, péptido o proteína expresado, tal como el anticuerpo, se puede unir a su ligando en un ELISA. Todavía además, el ARN funcional, el péptido, el polipéptido o la proteína, tal como el anticuerpo, son detectables tempranamente (por ejemplo, dentro de los 3 días posteriores a la infección) y la expresión se mantiene durante varias semanas.

40

En una realización, los adenovirus de la presente divulgación expresan ARN funcional, péptido, polipéptido o proteína, tales como anticuerpos, dentro de aproximadamente 3 días o más después de la infección, tal como dentro de aproximadamente 36, 48, 60 o 72 horas, o tal como 2, 3, 4, 5 o 6 días.

45

En una realización, los adenovirus de la presente divulgación expresan ARN funcional, péptido, polipéptido o proteína, como anticuerpos, durante varias semanas, como aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5 o 6 semanas. Tales como 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41 o 42 días.

50

Ventajosamente, la expresión de ARN funcional, péptido o proteína, tal como la expresión de anticuerpos, es lo suficientemente alta como para poder detectar el ARN funcional, péptido, polipéptido o proteína, tal como el anticuerpo en la sangre.

55

En una realización, el ARN funcional, péptido o proteína, tal como los anticuerpos expresados por el adenovirus de la presente divulgación, entran en el torrente sanguíneo y/o en el sistema linfático.

60

En una realización, el adenovirus de la presente divulgación es un virus oncolítico que tiene un índice terapéutico potenciado para las células cancerosas.

En una realización, la secuencia codificante codifica aún más el ARN funcional, por ejemplo, el ARN terapéutico.

65

El ARN funcional, como se emplea en el presente documento, se refiere al ARN que tiene una función distinta a la de codificar una proteína o péptido e incluye construcciones de ARN adecuadas para inhibir o reducir la actividad de los genes, por ejemplo, el ARNi, como el ARNhc y el ARNmi. El ARNhc, como se emplea en el

presente documento, se refiere al ARN de horquilla corta, que es una secuencia de ARN que hace un giro de horquilla cerrada que se puede utilizar para silenciar la expresión génica objetivo a través de la interferencia de ARN (ARNi). El ARNm_i (ARNmicro), como se emplea en el presente documento, se refiere a una pequeña molécula de ARN no codificante (que contiene aproximadamente 22 nucleótidos) que funciona, a través del emparejamiento de bases con secuencias complementarias dentro de las moléculas de ARNm, para regular la expresión génica a nivel transcripcional o postranscripcional. Las hebras de ARNm unidas por ARNm_i se silencian porque ya no pueden ser traducidas en proteínas por los ribosomas, y tales complejos a menudo son desensamblados activamente por la célula.

En una realización, el transgén codifica una proteína. La proteína, como se emplea en el presente documento, incluye un ligando de proteína, un receptor de proteína o una molécula de anticuerpo.

El ligando de proteína, como se emplea en el presente documento, se refiere a la membrana de la superficie celular o a las proteínas secretadas que se unen a fragmentos de la misma, que se unen a o de otra forma se acoplan con los receptores celulares para influir en la función de la célula, por ejemplo, al estimular la señalización intracelular y modular la transcripción génica dentro de la célula. En una realización, la proteína expresada está diseñada por ingeniería para expresarse en la superficie de la célula y/o secretarse desde la célula.

En una realización, la proteína codificada es un anticuerpo biespecífico, tal como un acoplador de célula T Biespecífica.

En una realización, el transgén codifica adicionalmente una enzima, por ejemplo, una enzima que ayuda a degradar la matriz extracelular del tumor, por ejemplo, una ADNasa, una collagenasa, una metaloproteinasa de matriz (tal como MMP2 o 14) o similar.

Los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos adecuados pueden ser agonísticos o antagónicos e incluyen aquellos con actividad anticancerosa y aquellos que modifican las respuestas de la célula huésped al cáncer, por ejemplo: un anticuerpo o fragmento de anticuerpo agonista o antagonista puede disminuir la vascularización o normalizar la vascularización del tumor. En una realización, los anticuerpos agonísticos u otras proteínas codificadas pueden hacer que la célula huésped sea más visible a las respuestas inmunitarias innatas y adaptativas del huésped, por ejemplo, al expresar antígenos, señales de peligro, citocinas o quimiocinas para atraer y activar las mismas, o al unirse a moléculas coestimuladoras o de la ruta de punto de control para mejorar las respuestas inmunitarias adaptativas.

El anticuerpo terapéutico o el fragmento de unión al anticuerpo, como se emplea en el presente documento, se refiere al anticuerpo o al fragmento de unión al anticuerpo que, cuando se inserta en el virus oncolítico, tiene un impacto beneficioso en una patología del paciente, por ejemplo, en el cáncer que se está tratando.

El impacto beneficioso, como se emplea en el presente documento, se refiere a un efecto deseable y/o ventajoso del anticuerpo que se expresa in vivo.

Las clases de anticuerpos terapéuticos y fragmentos de unión a anticuerpos incluyen: anticuerpos anti-EGF, anticuerpos anti-VEGF, anticuerpos anti-PDGF, anticuerpos anti-CTLA, anticuerpos anti-PD1, anticuerpos anti-PDL1 y anticuerpos anti-FGF.

Los anticuerpos terapéuticos registrados adecuados para incorporación a los virus de la presente divulgación incluyen: abciximab, adalimumab, alemtzumab, basiliximab, belimumab, bevacizumab, brentuximab vedotina, canakinumab, cetuximab, certolzumab, daclizumab, denosumab, eculizumab, efalizumab, gemtuzumab, golimumab, ibritumomab tiuxetan, infliximab, ipilimumab, muromonab-CD3, ofatumumab, palivizumab, panitumumab, ranibizumab, rituximab, tocilizumab, tositumomab y trastuzumab.

En una realización, las secuencias de regiones variables de anticuerpos de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo empleado son entre un 95 y un 100 % similares o idénticas a las regiones variables de bevacizumab (también conocido como Avastin®), tal como un 96, 97, 98 o 99 % similares o idénticas.

También son adecuadas para incorporación en los virus de la presente divulgación las secuencias codificantes para aquellos anticuerpos y fragmentos de unión de los mismos que están aprobados para indicaciones de cáncer, por ejemplo, trastuzumab, tositumomab, rituximab, panitumumab, ofatumumab, ipilimumab, ibritumomab tiuxetan, gemtuzumab, denosumab, cetuximab, brentuximab vedotina, avastina y adalimumab.

En una realización, las secuencias de la región variable del anticuerpo de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo empleado son entre el 95 y el 100 % similares o idénticas a las regiones variables de un anticuerpo conocido o de un anticuerpo divulgado en el presente documento.

Como se utiliza en el presente documento, la "molécula de anticuerpo" incluye los anticuerpos y los fragmentos de unión de los mismos.

El anticuerpo, como se emplea en el presente documento, generalmente se refiere a un anticuerpo de longitud completa y a formatos biespecíficos o multiespecíficos que comprenden el mismo.

Los fragmentos de unión a anticuerpos incluyen un fragmento de anticuerpo capaz de dirigirse al antígeno con la misma o mejor especificidad que el "anticuerpo" original del que se deriva. Los fragmentos de anticuerpos incluyen: Fab, Fab modificado, Fab', Fab' modificado, F(ab')₂, Fv, anticuerpos de dominio único (por ejemplo, VH o VL o VHH), scFv, anticuerpos bi, tri o tetravalentes, Bis-scFv, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos y fragmentos de unión a epítomos de cualquiera de los anteriores (véase, por ejemplo, Holliger and Hudson, 2005, Nature Biotech. 23(9):1126-1136; Adair and Lawson, 2005, Drug Design Reviews - Online 2(3), 209-217). Los métodos para crear y fabricar estos fragmentos de anticuerpos son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Verma et al., 1998, Journal of Immunological Methods, 216, 165-181). Otros fragmentos de anticuerpos para uso en la presente invención incluyen los fragmentos Fab y Fab' descritos en las solicitudes internacionales de patente WO2005/003169, WO2005/003170 y WO2005/003171. Los anticuerpos polivalentes pueden comprender múltiples especificidades, por ejemplo, biespecíficos o pueden ser monoespecíficos (véase, por ejemplo, documentos WO92/22853, WO05/113605, WO2009/040562 y WO2010/035012).

Específico, como se emplea en el presente documento, se refiere a un anticuerpo o fragmento que solo reconoce el antígeno del que es específico o a un anticuerpo o fragmento que tiene una afinidad de unión significativamente mayor al antígeno del que es específico en comparación con su afinidad de unión a antígenos del que no es específico. por ejemplo, 5, 6, 7, 8, 9, 10 veces mayor afinidad de enlace.

Los anticuerpos conocidos o fragmentos de unión a anticuerpos se pueden emplear para generar formatos de anticuerpos alternativos con las mismas CDR o las mismas regiones variables, por ejemplo, un anticuerpo de longitud completa se puede convertir fácilmente en un fragmento Fab, Fab' o scFv.

Una amplia gama de diferentes formas de anticuerpos pueden ser empleadas en las construcciones de la presente divulgación, que incluyen moléculas de anticuerpos de animales no humanos, moléculas de anticuerpos humanos, moléculas de anticuerpos humanizados y moléculas de anticuerpos quiméricos.

En una realización, el anticuerpo o fragmento de unión es monoclonal. Los anticuerpos monoclonales se pueden preparar por cualquier método conocido en la técnica, como la técnica del hibridoma (Kohler y Milstein, 1975, Nature, 256:495-497), la técnica del trioma, la técnica del hibridoma de células B humanas (Kozbor et al., 1983, Immunology Today, 4:72) y la técnica del hibridomas EBV (Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, pp77-96, Alan R Liss, Inc., 1985).

En una realización, el anticuerpo o fragmento de unión es no humano, es decir, completamente de origen no humano. Esto es posible porque los anticuerpos y fragmentos se pueden suministrar dentro de la célula cancerosa por el virus.

En una realización, el anticuerpo es quimérico, por ejemplo, tiene región(es) constante(s) humana(s) y regiones variables no humanas.

En una realización, el anticuerpo o fragmento de unión es humano, es decir, de origen completamente humano.

En una realización, el anticuerpo o fragmento de unión se humaniza. Los anticuerpos humanizados (que incluyen los anticuerpos injertados en CDR) son moléculas de anticuerpos que tienen una o más regiones determinantes de complementariedad (CDR) de una especie no humana y una región marco de una molécula de inmunoglobulina humana (véase, por ejemplo, los documentos US5,585,089; WO91/09967). Se apreciará que puede ser necesario transferir sólo los residuos determinantes de la especificidad de las CDR en lugar de la totalidad de las CDR (véase, por ejemplo, Kashmiri et al., 2005, Methods, 36, 25-34). Opcionalmente, los anticuerpos humanizados pueden comprender adicionalmente uno o más residuos marco derivados de la especie no humana, por ejemplo, de la que se derivaron las CDR.

En una realización, la secuencia codificante codifica una cadena pesada de anticuerpo, una cadena ligera de anticuerpo o un fragmento de anticuerpo. La cadena pesada (HC), como se emplea en el presente documento, se refiere a la subunidad de polipéptido grande de un anticuerpo. La cadena ligera (LC), como se emplea en el presente documento, se refiere a la pequeña subunidad de polipéptido de un anticuerpo. En una realización, la cadena ligera del anticuerpo comprende un dominio CL, ya sea kappa o lambda.

Los anticuerpos para uso en la presente divulgación se pueden obtener utilizando cualquier método adecuado conocido en la técnica. El antígeno polipéptido/proteína, que incluye las proteínas de fusión, que incluyen las células (recombinantes o naturales) que expresan el polipéptido (tal como las células T activadas), se puede

utilizar para producir anticuerpos que reconozcan específicamente el antígeno. El polipéptido puede ser el polipéptido 'maduro' o un fragmento biológicamente activo o un derivado del mismo.

5 El cribado de anticuerpos se puede realizar utilizando ensayos para medir la unión al antígeno y/o ensayos para medir la capacidad de antagonizar el receptor. Un ejemplo de un ensayo de unión es un ELISA, en particular, que utiliza una proteína de fusión (opcionalmente que comprende un indicador), que se inmoviliza en placas, y emplea un anticuerpo secundario conjugado para detectar el anticuerpo antiantígeno unido a la proteína de fusión.

10 Los dominios de región constante de la molécula de anticuerpo de la presente invención, si están presentes, se pueden seleccionar teniendo en cuenta la función propuesta de la molécula de anticuerpo y, en particular, las funciones efectoras que pueden ser necesarias. Por ejemplo, los dominios de región constante pueden ser dominios IgA, IgD, IgE, IgG o IgM humanos. En particular, se pueden utilizar dominios de región constante de IgG humana, especialmente de los isotipos IgG1 e IgG3 cuando la molécula de anticuerpo está destinada a
15 usos terapéuticos y se requieren funciones efectoras de anticuerpos. Alternativamente, los isotipos IgG2 e IgG4 se pueden utilizar cuando la molécula de anticuerpo está destinada a fines terapéuticos y no se requieren funciones efectoras de anticuerpos, por ejemplo, para una actividad simplemente agonizante o para la neutralización del objetivo. Se apreciará que también se pueden utilizar variantes de secuencia de estos dominios de región constante. Por ejemplo, se pueden utilizar moléculas de IgG4 en las que la serina en la
20 posición 241 se ha cambiado a prolina como se describe en Angal et al., Molecular Immunology, 1993, 30 (1), 105-108.

Para ciertas funciones de los anticuerpos, por ejemplo, para suministrar señales de activación a las células que llevan la molécula objetivo del anticuerpo, como las células del sistema inmunitario, puede ser ventajoso utilizar
25 versiones ancladas a la membrana del anticuerpo de tal manera que el anticuerpo se exprese en la superficie de la célula que lo expresa. Dichas moléculas de unión expresadas en la superficie celular permiten interacciones multiméricas eficientes entre la molécula de señalización objetivo y la superficie de otra célula, lo que potencia el suministro de señales de activación de la molécula objetivo a la célula receptora.

30 Ventajosamente, los adenovirus de la presente divulgación pueden expresar anticuerpos de longitud completa, fragmentos de anticuerpos tales como scFvs, anticuerpos multiespecíficos, en particular anticuerpos biespecíficos como los acopladores de célula T Biespecífica como se describe en el presente documento.

35 En una realización, la secuencia que codifica el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo (tal como un acoplador de célula T Biespecífica de acuerdo con la presente divulgación) comprende o comprende aún más una secuencia de entrada de ribosoma interna. La secuencia de entrada de ribosoma interno (IRES), como se emplea en el presente documento, significa una secuencia de nucleótidos que permite el inicio de la traducción en medio de una secuencia de ARN mensajero (ARNm).

40 En una realización, las proteínas terapéuticas codificadas o péptidos son proteínas, polipéptidos o péptidos específicos del objetivo.

Las proteínas o péptidos específicos del objetivo, como se emplean en el presente documento, se refieren a
45 las proteínas objetivo en sí mismas, o a diferentes proteínas o péptidos que se unen directamente (por ejemplo, son específicos del objetivo) o modifican de otro modo los niveles de las proteínas o péptidos objetivo. Un ejemplo de lo primero sería una citocina, mientras que un ejemplo de lo segundo sería un anticuerpo contra esa citocina.

50 Los objetivos de interés generalmente se relacionan con células particulares, productos celulares, antígenos o rutas de señalización asociadas con enfermedades, particularmente cáncer. El objetivo, dependiendo del contexto, también se relaciona con el ARNm o similar transcrito del gen que codifica la proteína o el polipéptido, que por ejemplo puede inhibirse mediante la tecnología de tipo ARNi. Por lo tanto, en el contexto del ARN, como la tecnología de ARNi, el objetivo es el ARNm que está codificado por el gen del objetivo.

55 Ejemplos de objetivos de interés incluyen, pero no se limitan a, correceptores estimuladores de células T y ligandos de los mismos, moléculas de correceptores de células T inhibitoras de puntos de control y ligandos a las mismas, receptores y ligandos de las mismas expresados por células T reguladoras, células supresoras derivadas de mieloides y células inmunitarias inmunosupresoras, receptores de células dendríticas y células presentadoras de antígenos y ligandos de las mismas, mediadores de procesamiento y presentación de
60 antígenos, citocinas y receptores de citocinas, quimiocinas y receptores de quimiocinas, factores de transcripción y reguladores de la transcripción, moléculas de tráfico intracelular y reguladores de la función celular, receptores y productos de células tumorales y microambientales tumorales, enzimas de células tumorales intracelulares tal como IDO, antígenos para el reconocimiento por parte de las células inmunitarias.

65 Por lo tanto, en una realización, el objetivo empleado en el presente documento se refiere a una proteína o polipéptido que puede, por ejemplo, ser inhibido, neutralizado o activado por, por ejemplo, un anticuerpo o un

fragmento de unión del mismo, según corresponda. El objetivo en el contexto de las citocinas se refiere a una citocina per se o a un anticuerpo o fragmento de unión de la misma específico para la citocina. Por lo tanto, el virus puede codificar y expresar la citocina por sí mismo, ya que la liberación de la misma puede estimular las respuestas inmunitarias del "huésped". En el contexto de los ligandos, el virus puede codificar formas mutadas del ligando que compiten con el ligando natural para unirse al receptor. El ligando mutado puede tener una mayor afinidad de unión al receptor, por ejemplo, de tal manera que tenga una tasa de apagado lenta, ocupando de esta manera el receptor y aumentando o disminuyendo la señalización del mismo. Alternativamente, la actividad del ligando mutado se puede reducir en comparación con el ligando de tipo silvestre, reduciendo de esta manera la unión y la actividad general a través del receptor del ligando natural.

En una realización, el virus o construcción de acuerdo con la presente divulgación codifica un profármaco, un inmunomodulador y/o una enzima.

Profármaco, como se emplea en el presente documento, significa una molécula que se administra como un derivado inactivo (o menos que completamente activo) que posteriormente se convierte en un agente farmacológico activo en el cuerpo, a menudo a través de procesos metabólicos normales. Un profármaco sirve como un tipo de precursor del fármaco previsto. Una enzima convertidora de profármacos sirve como la enzima que convierte un profármaco a su forma farmacológicamente activa.

Inmunomodulador, como se emplea en el presente documento, significa un modulador de la respuesta inmunitaria. Los inmunomoduladores funcionan en el ajuste de la respuesta inmunitaria a un nivel deseado, como en la inmunopotenciación, la inmunosupresión o la inducción de tolerancia inmunológica.

Las células T requieren dos señales para activarse completamente. Una primera señal, que es específica del antígeno, se proporciona a través del receptor de células T que interactúa con las moléculas de péptido-MHC en la membrana de las células presentadoras de antígenos (APC). Una segunda señal, la señal coestimuladora, es inespecífica del antígeno y es proporcionada por la interacción entre las moléculas coestimuladoras expresadas en la membrana de APC y la célula T. Por lo tanto, la molécula coestimuladora, como se emplea en el presente documento, significa una molécula que proporciona una señal complementaria a la señal específica del antígeno requerida por las células T para la activación, proliferación y supervivencia. Ejemplos de moléculas coestimuladoras incluyen, pero no se limitan a, CD28, CD80, CD86, CD83 y 4-1BB.

Enzima, como se emplea en el presente documento, significa una sustancia que actúa como catalizador en los organismos vivos, regulando la tasa a la que se desarrollan las reacciones químicas sin que ella misma se altere en el proceso.

Lo que sigue es una discusión no exhaustiva de ejemplares de péptidos/polipéptidos objetivo y proteínas.

En una realización, el objetivo es una proteína de punto de control, como una proteína de punto de control inmunitario o una proteína de punto de control del ciclo celular. Ejemplos de proteínas de punto de control incluyen, pero no se limitan a: CTLA-4, PD-1, PD-L1, PD-L2, VISTA, B7-H3, B7-H4, HVEM, ILT-2, ILT-3, ILT-4, TIM-3, LAG-3, BTLA, LIGHT o CD160, por ejemplo, CTLA-4, PD-1, PD-L1 y PD-L2. En una realización se proporciona un anticuerpo o fragmento de unión del mismo que es específico de uno de los mismos. Por lo tanto, en una realización, un transgén o casete de transgén codifica un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo específico para CTLA-4, PD-1, PD-L1 o PD-L2. En una realización, el adenovirus expresa un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo específico para CTLA-4, PD-1, PD-L1 o PD-L2.

En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo inhibidor de puntos de control, por ejemplo anti-PD-L1. En una realización, el adenovirus expresa un anticuerpo PD-L1 humano de longitud completa. En una realización, la expresión del anticuerpo PD-L1 humano de longitud completa está bajo el control de un promotor endógeno, como el promotor tardío principal (MLP), en particular en posición By. En una realización, el adenovirus expresa la forma scFv del anticuerpo PD-L1 humano. En una realización, la expresión de una forma scFv del anticuerpo PD-L1 humano está bajo el control de un promotor endógeno, como el promotor tardío Principal, en particular en la posición By.

En una realización, se proporciona un virus o construcción de acuerdo con la presente divulgación que codifica un anticuerpo o un fragmento de unión del mismo, para un anticuerpo de longitud completa o scFv específico de CTLA-4, por ejemplo como se ejemplifica en el presente documento.

En una realización, el objetivo es uno o más seleccionados independientemente del grupo que comprende CD16, CD25, CD33, CD332, CD127, CD31, CD43, CD44, CD162, CD301a, CD301b y Galectina-3. En una realización, se proporciona un anticuerpo o un fragmento de unión del mismo específico al mismo, por ejemplo, un anticuerpo de longitud completa o un scFv.

En una realización, el objetivo, por ejemplo, que se puede dirigir por un anticuerpo o un fragmento de unión, es uno o más seleccionados independientemente del grupo que comprende: FLT-3, ligando FLT-3, TLRs, ligandos

TLR, CCR7, CD1a, CD1c, CD11b, CD11c, CD80, CD83, CD86, CD123, CD172a, CD205, CD207, CD209, CD273, CD281, CD283, CD286, CD289, CD287, CXCR4, Ligando GTR, IFN- α 2, IL-12, IL-23, ILT1, ILT2, ILT3, ILT4, ILT5, ILT7, Receptor TSLP, CD141, CD303, CADM1, CLEC9a, XCR1 y CD304.

5 En una realización, el objetivo de un acoplador de célula T Biespecífica empleado en la presente divulgación es un antígeno de células tumorales.

En una realización, el objetivo es uno o más seleccionados independientemente del grupo que comprende: CEA, MUC- 1, EpCAM, receptores HER HER1, HER2, HER3, HER4, PEM, A33, G250, antígenos de
10 carbohidratos Le^y, Le^x, Le^b, PSMA, TAG-72, STEAP1, CD166, CD24, CD44, E-caderina, SPARC, ErbB2, ErbB3.

En una realización, el objetivo de un acoplador de célula T Biespecífica empleado en la presente divulgación es un antígeno del estroma tumoral.

15 En una realización, el objetivo de un acoplador de célula T Biespecífica empleado en la presente divulgación es uno o más seleccionados independientemente del grupo que comprende: FAP, TREM1, IGFBP7, FSP-1, receptor del factor- α de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR- α), receptor del factor- β de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR- β) y vimentina.

20 En una realización, el objetivo, por ejemplo, que se puede dirigir por un anticuerpo o un fragmento de unión (tal como un acoplador de célula T Biespecífica), es un objetivo de cáncer

25 En una realización, el objetivo es uno o más seleccionados independientemente del grupo que comprende: OX40, ligando OX40, CD27, CD28, CD30, CD40, ligando CD40, TL1A, CD70, CD137, GTR, 4-1BB, ICOS o ligando ICOS, por ejemplo el ligando CD40 y CD40.

30 En una realización, el casete de transgén codifica un ligando que comprende el ligando CD40 o CD40, o un anticuerpo, fragmento de anticuerpo o ARNhc dirigido a CD40 o al ligando CD40. En una realización, el adenovirus expresa un ligando que comprende CD40 o el ligando CD40, o un anticuerpo, fragmento de anticuerpo o ARNhc dirigido a (específico a) CD40 o el ligando CD40.

35 En una realización, el objetivo es una o más citocinas seleccionadas independientemente del grupo que comprende: IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-9, IL-12, IL-13, IL-17, IL-18, IL-22, IL-23, IL-24, IL-25, IL-26, IL-27, IL-33, IL-35. Interleucina-2 (IL-2), IL-4, IL-5, IL-7, IL-10, IL-15, IL-21, IL-25, IL-1RA, IFN α , IFN β , IFN γ , TNF α , TGF β , linfotóxina α (LTA) y GM-CSF.

40 En una realización, el casete de transgén codifica un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo específico para IL-12, IL-18, IL-22, IL-7, IL-15, IL-21, IFN α , IFN γ , TNF α , TGF β o linfotóxina α d (LTA). En una realización, el adenovirus expresa IL-12, IL-18, IL-22, IL-7, IL-15, IL-21, IFN α , IFN γ , TNF α , TGF β o linfotóxina α (LTA).

45 En una realización, la secuencia de aminoácidos de IFN γ es la SEQ ID NO: 68. En una realización, la secuencia de aminoácidos de IFN α es la SEQ ID NO: 69. En una realización, la secuencia de aminoácidos de TNF α es la SEQ ID NO: 70.

50 En una realización, el objetivo es una quimiocina, por ejemplo una o más seleccionadas independientemente del grupo que comprende: IL-8, CCL3, CCL5, CCL17, CCL20, CCL22, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL13, CXCL12, CCL2, CCL19, CCL21, CXCR2, CCR2, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CCR8, CXCR3, CXCR4, CXCR5 y CRTH2.

55 En una realización, el casete de transgén codifica un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo específico para CCL5, CXCL9, CXCL12, CCL2, CCL19, CCL21, CXCR2, CCR2, CCR4 o CXCR4. En el contexto de las quimiocinas, el objetivo incluye el lugar donde el virus codifica y expresa la quimiocina, por ejemplo, para inducir o aumentar las respuestas inmunitarias del huésped al cáncer.

60 En una realización, el adenovirus expresa un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo específico para CCL5, CXCL9, CXCL12, CCL2, CCL19, CCL21, CXCR2, CCR2, CCR4 o CXCR4.

En una realización, el objetivo es uno o más seleccionados independientemente del grupo que comprende: STAT3, STAT1, STAT4, STAT6, CTIIA, MyD88 y miembros de la familia NF κ B, por ejemplo, la proteína se dirige con un inhibidor, por ejemplo, un anticuerpo o un fragmento de unión del mismo, o el ARNm transcrito del gen relevante se inhibe por un mecanismo, como el ARNi.

En una realización, el objetivo es HSp70 o un regulador de la supervivencia y muerte celular tal como la survivina, por ejemplo, la proteína se dirige con un inhibidor, por ejemplo, un anticuerpo o un fragmento de unión de la misma, o el ARNm transcrito del gen relevante es inhibido por un mecanismo, como el ARNi.

- 5 En una realización, el objetivo es uno o más seleccionados independientemente del grupo que comprende: anfiregulina, BTC, NRG1a, NRG1b, NRG3, TGF α , LRIG1, LRIG3, EGF, EGF-L6, Epigen, HB-EGF, EGFR, Her2, Her3 y Her4, por ejemplo, la proteína se dirige con un inhibidor, por ejemplo, un anticuerpo o un fragmento de unión del mismo, o el ARNm transcrito del gen relevante se inhibe por un mecanismo, tal como el ARNi.

- 10 En una realización, el objetivo es un ligando o receptor para uno o más seleccionados independientemente del grupo que comprende: hedgehog, FGF, IGF, Wnt, VEGF, TNF, TGF β , PDGF y Notch.

En una realización, el adenovirus expresa un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo específico para el VEGF.

- 15 En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo anti-VEGF. Por ejemplo, tal como un anticuerpo que tiene la secuencia de aminoácidos del anticuerpo bevacizumab o equivalente del mismo. En una realización, el adenovirus expresa un anticuerpo VEGF anti-humano de longitud completa. En una realización, la expresión del anticuerpo VEGF anti-humano de longitud completa está bajo el control de un promotor endógeno, tal como el promotor tardío Principal (MLP), en particular en la posición By. En una realización, el adenovirus expresa la forma scFv del anticuerpo anti-VEGF humano. En una realización, la expresión de la forma scFv del anticuerpo VEGF anti-humano está bajo el control de un promotor endógeno, como el promotor tardío Principal, en particular en posición By.

En una realización, el objetivo es IDO.

- 25 En una realización, el objetivo es un antígeno para el reconocimiento por parte de las células inmunitarias (tal como una célula T acoplada por un acoplador de célula T Biespecífica) es una o más proteínas o péptidos seleccionados independientemente del grupo que comprende: proteínas inmunogénicas de organismos infecciosos, tales como antígenos de citomegalovirus, antígenos de gripe, antígenos de superficie y núcleo de hepatitis B, toxoide diftérico, Crm197, toxoide tetánico; péptidos derivados de dichos antígenos que son conocidos como células T o epítopos de anticuerpos, o compuestos modificados genéticamente o multímeros de dichos antígenos; proteínas derivadas de tumores como antígenos; péptidos derivados de dichos antígenos que se conocen como epítopos de células T o anticuerpos; y compuestos modificados genéticamente o multímeros de dichos antígenos, por ejemplo, WT1, MUC1, LMP2, idiotipo, HPV E6 y E7, EGFRvIII, HER-2/neu, MAGE A3, p53 no mutante, p53 mutante, NY-ESO-1, GD2, PSMA, PCSA, PSA, gp100, CEA, MelanA/MART1, Ras mutante, proteinasa3 (PR1), bcr-abl, tirosinasa, survivina, PSA, hTERT, particularmente WT1, MUC1, HER-2/neu, NY-ESO-1, survivina o hTERT.

- 40 El experto apreciará que existen muchas posibilidades para las secuencias de ácidos nucleicos que codifican una secuencia de aminoácidos dada debido a la redundancia de codones, que se toleran mutaciones silenciosas del par de bases de ácidos nucleicos y que todas las secuencias de ácidos nucleicos que codifican una secuencia de aminoácidos dada como se define en cualquiera de las SEQ ID NO se visualizan en la presente divulgación.

- 45 En una realización, el péptido, polipéptido o proteína codificada por un transgén es un mimótopo. Como se emplea en el presente documento, un mimótopo es una molécula, a menudo un péptido, que imita la estructura de un epítipo. Esta última propiedad provoca una respuesta de anticuerpos similar a la provocada por el epítipo. Un anticuerpo para un antígeno de epítipo determinado reconocerá un mimótopo que imite ese epítipo. Los mimótopos se obtienen comúnmente de bibliotecas de visualización de fagos a través de ciclos de selección. Se están desarrollando vacunas que utilizan mimótopos. Por lo tanto, los anticuerpos de especificidad conocida se pueden utilizar para cribar bibliotecas (por ejemplo, bibliotecas de péptidos en la visualización de fagos, por ejemplo, bibliotecas de secuencias Ab o bibliotecas de péptidos sin anticuerpos, particularmente aquellas optimizadas para producir péptidos con conformaciones 3D más estables) - La generación de mimótopos está bien descrita en la técnica (véase Tribbick G, Rodda S. Combinatorial methods for discovery of peptide ligands which bind to antibody-like molecules. J Mol Recognit 2002 15(5):306-10; Masuko T, Ohno Y, Masuko K, Yagi H, Uejima S, Takechi M, Hashimoto Y. Hacia anticuerpos terapéuticos contra oncoproteínas de membrana mediante una estrategia robusta utilizando ratas inmunizadas con transfectantes que expresan moléculas objetivo fusionadas con proteínas fluorescentes verdes. Cancer Sci. 2011 102(1):25-35).

- 60 En una realización, un mimótopo u otros antígenos de vacuna diseñados son codificados por un transgén y expresados con el fin de inducir una respuesta de anticuerpos en el paciente receptor, en la que los anticuerpos inducidos tienen el efecto terapéutico deseado. En una realización, las proteínas de fusión de péptidos GFP, con secuencias de péptidos del ligando humano deseado, se utilizan para inducir respuestas de anticuerpos anti-autoobjetivo, por ejemplo, una región peptídica de PD-L1 que se sabe que es importante para unirse a la molécula objetivo PD-1 puede estar genéticamente ligada con GFP u otras proteínas transportadoras extrañas altamente inmunogénicas, de tal manera que una respuesta de anticuerpos inmunes al péptido incluye

anticuerpos que reaccionan de forma cruzada con la molécula PDL1 nativa y, por lo tanto, sirven para bloquear las interacciones PD-L1:PD-1 de la misma manera que lo haría la codificación directa de un anticuerpo anti-PDL1. Los conceptos de las vacunas que inducen respuestas de anticuerpos autoterapéuticos están bien descritos en la técnica (véase Spohn G, Bachmann MF. Therapeutic vaccination to block receptor-ligand interactions. *Expert Opin Biol Ther.* 2003 3(3):469-76; Link A, Bachmann MF. Immunodrugs: breaking B- but not T-cell tolerance with therapeutic anticytokine vaccines. *Immunotherapy* 2010 2(4):561-74; Delavallée L, Assier E, Semerano L, Bessis N, Boissier MC. Emerging applications of anticytokine vaccines. *Expert Rev Vaccines.* 2008 7(10):1507-17).

En una o más realizaciones, el transgén empleado codifica una secuencia mostrada en cualquiera de una de las SEQ ID NOs: 2, 4, 7, 11 o 16.

En otra realización, el transgén empleado codifica una secuencia que excluye la etiqueta de afinidad deca-His en el extremo de terminal C, por ejemplo, como se muestra en un virus establecido en cualquiera de una de las SEQ ID NOs: 72 a 78.

Ventajosamente, los adenovirus de la presente divulgación expresan y liberan formas de anticuerpos (tal como un acoplador de célula T Biespecífica) y otras proteínas, tales como las citocinas, codificadas por un transgén en el sobrenadante de cultivo in vitro o en el estroma del tejido tumoral in vivo. Las secuencias líder pueden ayudar a las proteínas codificadas/polipéptidos o péptidos a salir de la célula cancerosa. Por lo tanto, en una realización, la "proteína" codificada comprende una secuencia líder. La secuencia líder, como se emplea en el presente documento, se refiere a una secuencia de polinucleótidos ubicada entre la secuencia promotora y la región codificante que puede regular la expresión génica a nivel de transcripción o traducción.

En una realización, la secuencia codificante codifica un péptido. El péptido, como se emplea en el presente documento, se refiere a una cadena de aminoácidos que no es una proteína funcional completa. Normalmente, un fragmento que conserva parte o la totalidad de la función de la proteína de la que es un fragmento, o que puede ser reconocido por el sistema inmunitario, por ejemplo, péptidos de 8 o más aminoácidos que pueden ser reconocidos por las células T.

En una realización, el transgén es un gen indicador que codifica, por ejemplo, un agente de formación de imágenes que incluye agentes de formación de imágenes bioluminiscentes, fluorescentes (que incluyen agentes de formación de imágenes fluorescentes activables), tales como luciferasa, GFP o eGFP o proteína fluorescente roja.

El gen indicador o la secuencia indicadora, como se emplea en el presente documento, significa un gen o secuencia de ADN que produce un producto fácilmente detectable en las células eucariotas y se puede utilizar como marcador para determinar la actividad de otro gen con el que su ADN ha sido estrechamente ligado o combinado. Los genes indicadores confieren características a las células u organismos que las expresan que se identifican y miden fácilmente, o son marcadores seleccionables. Los genes indicadores se utilizan a menudo como una indicación de si un determinado gen ha sido absorbido o expresado en la población de células u organismos. Ejemplos de genes indicadores comunes incluyen, pero no se limitan a, LacZ, luciferasa, GFP, eGFP, neomicina fosfotransferasa, cloranfenicol acetiltransferasa, simportador de yoduro de sodio (NIS), nitroreductasa (por ejemplo, NfsA, NfsB), metaloproteínas intracelulares, HSV1-tk o receptor de estrógeno.

En una realización, el material genético (en particular el transgén) no codifica ni expresa un gen indicador como un agente de formación de imágenes, luciferasa, GFP o eGFP.

De acuerdo con la presente divulgación, los virus pueden ser investigados por su preferencia hacia un tipo de tumor específico mediante el examen de su potencial lítico en un panel de células tumorales, por ejemplo, las estirpes celulares de tumores de colon incluyen HT-29, DLD-1, LS174T, LS1034, SW403, HCT116, SW48 y Colo320DM. Cualquier estirpe celular de tumor de colon disponible sería igualmente útil para dicha evaluación.

Las estirpes celulares de próstata incluyen células DU145 y PC-3. Las estirpes celulares pancreáticas incluyen células Panc-1. Las estirpes celulares de tumores de mama incluyen la estirpe celular MDA231 y las estirpes celulares de ovario incluyen la estirpe celular OVCAR-3. Las estirpes celulares hemopoyéticas incluyen, pero no se limitan a, las células linfoides B Raji y Daudi, las células eritroblastoides K562, las células mieloides U937 y las células linfoides HSB2. Otras estirpes celulares tumorales disponibles son igualmente útiles.

La presente divulgación también se extiende a las secuencias novedosas divulgadas en el presente documento. En una realización, el virus se muestra en cualquiera de las secuencias divulgadas en el presente documento, por ejemplo, SEQ ID NO: 37 o una secuencia al menos 95 % idéntica a la misma, por ejemplo, como se establece en la SEQ ID NO: 82.

Formulaciones

La presente divulgación también se refiere a una formulación farmacéutica de un virus tal como se describe en el presente documento.

5 En una realización se proporciona una formulación parenteral líquida, por ejemplo para infusión o inyección, de un oncolítico capaz de replicación de acuerdo con la presente divulgación, en la que la formulación proporciona una dosis en el rango de 1×10^{10} a 1×10^{14} partículas virales por volumen de dosis.

10 Formulación parenteral significa una formulación diseñada para no ser suministrada a través del tracto GI. Las rutas típicas de suministro parenteral incluyen inyección, implantación o infusión. En una realización, la formulación se proporciona en una forma para el suministro de bolos.

15 En una realización, la formulación parenteral está en la forma de inyección. La inyección incluye inyección intravenosa, subcutánea, intratumoral o intramuscular. La inyección, como se emplea en el presente documento, significa la inserción de líquido en el cuerpo a través de una jeringa. En una realización, el método de la presente divulgación no implica inyección intratumoral.

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

20 La infusión, como se emplea en el presente documento, significa la administración de fluidos a un ritmo más lento por goteo, bomba de infusión, controlador de jeringa o dispositivo equivalente. En una realización, la infusión se administra durante un período en el rango de 1.5 minutos a 120 minutos, como aproximadamente 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 65, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110 o 115 minutos.

25 En una realización, una dosis de la formulación es menor de 100 ml, por ejemplo 30 ml, tal como la administrada por un conductor de jeringa. En una 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 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.

30 En una realización, la inyección se administra como una inyección lenta, por ejemplo durante un período de 1.5 a 30 minutos.

35 En una realización, la formulación es para administración intravenosa (i.v.). Esta ruta es particularmente eficaz para la administración de virus oncolíticos porque permite un acceso rápido a la mayoría 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.

40 Las formulaciones terapéuticas normalmente son estériles y estables bajo las condiciones de fabricación y almacenamiento. La composición se puede formular como una solución, microemulsión, liposoma u otra formulación parenteral adecuada para la administración a un humano y se puede formular como un dispositivo precargado, como una jeringa o un vial, en particular como una dosis única.

45 La formulación generalmente comprenderá un diluyente o portador farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, un portador isotónico no tóxico que sea compatible con el virus, y en el que el virus sea estable durante el período de tiempo requerido.

50 El portador puede ser un solvente o medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares) y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez adecuada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un dispersante o tensioactivo tal como la lecitina o un tensioactivo no iónico tal como el polisorbato 80 o 40. En las dispersiones, el mantenimiento del tamaño de partícula requerido puede verse favorecido por la presencia de un tensioactivo. Ejemplos de agentes isotónicos incluyen azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol o cloruro de sodio en la composición.

55 En una realización, las formulaciones parenterales empleadas pueden comprender uno o más de los siguientes: un tampón, por ejemplo ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfónico, un tampón fosfato y/o un tampón 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 el brij, PS-80, PS-40 o similar. La formulación también puede comprender un conservante como EDTA o etanol o una combinación de EDTA y etanol, que se considera que previenen una o más rutas de posible degradación.

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

65 En una realización, la formulación parenteral comprende glicerol.

En una realización, la formulación comprende adenovirus oncolítico como se describe en el presente documento, HEPES (ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfónico), glicerol y tampón.

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

10 En una realización, 0.7 ml de virus de la divulgación a una concentración de 2×10^{12} vp/ml se formula en HEPES 5 mM, 20 % de glicerol con un pH final de 7.8.

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

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

20 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, generalmente contendrán un virus como se describe en el presente documento con un excipiente fisiológicamente aceptable

25 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 utilizan adecuadamente los monosacáridos o disacáridos, el uso de la lactosa o la glucosa, en particular, pero no exclusivamente, en forma de sus hidratos.

30 Las partículas para depositar en el pulmón requieren un tamaño de partícula menor de 10 micrones, tal como 1-9 micrones, por ejemplo, de 0.1 a 5 μ m, en particular de 1 a 5 μ m. El tamaño de partícula del portador del virus es de importancia primordial y, por lo tanto, en una realización, el virus, de acuerdo con la presente divulgación, puede ser adsorbido o absorbido en una partícula, como una partícula de lactosa del tamaño dado.

35 Los gases propulsores que se pueden utilizar para preparar los aerosoles inhalables son conocidos en la técnica. Los gases propulsores adecuados se seleccionan entre hidrocarburos tales como n-propano, n-butano o isobutano y halohidrocarburos tales como derivados clorados y/o fluorados de metano, etano, propano, butano, ciclopropano o ciclobutano. Los gases propulsores mencionados anteriormente se pueden utilizar solos o en mezclas de los mismos.

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

45 Los aerosoles inhalables que contienen gas propulsor también pueden contener otros ingredientes, tales como cosolventes, estabilizadores, agentes de superficie activa (tensioactivos), antioxidantes, lubricantes y medios para ajustar el pH. Todos estos ingredientes son conocidos en el arte

50 Los aerosoles inhalables que contienen gas propelente de acuerdo con la invención pueden contener hasta un 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

55 Alternativamente, las administraciones tópicas al pulmón también pueden ser mediante la administración de una solución líquida o una formulación en suspensión, por ejemplo, empleando un dispositivo tal como un nebulizador, por ejemplo, un nebulizador conectado a un compresor (por ejemplo, el nebulizador Pari LC-Jet Plus(R) conectado a un compresor Pari Master(R) fabricado por Pari Respiratory Equipment, Inc., Richmond, Va.).

60 El virus de la invención se puede suministrar disperso en un solvente, por ejemplo, en forma de solución o suspensión, por ejemplo, como ya se ha descrito anteriormente para formulaciones parenterales. Se puede suspender en una solución fisiológica adecuada, por ejemplo, solución salina u otro solvente farmacológicamente aceptable o una solución tamponada. Las soluciones tamponadas conocidas en la técnica pueden contener de 0.05 mg 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 aproximadamente 4.0 a 5.0.

- Las suspensiones terapéuticas o formulaciones en solución también pueden contener uno o más excipientes. Los excipientes son bien conocidos en la técnica e incluyen tampones (por ejemplo, tampón citrato, tampón fosfato, tampón acetato y tampón bicarbonato), aminoácidos, urea, alcoholes, ácido ascórbico, fosfolípidos, proteínas (por ejemplo, albúmina sérica), 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 proporcionará en una forma sustancialmente estéril empleando procesos de fabricación estériles.
- Esto puede incluir la producción y esterilización por filtración del solvente/solución tamponada utilizada para la formulación, la suspensión aséptica del anticuerpo en la solución estéril de solvente tamponado y la dispensación de la formulación en recipientes estériles por métodos familiares a los expertos con conocimientos básicos en la técnica
- La formulación nebulizable de acuerdo con la presente divulgación se puede proporcionar, por ejemplo, como unidades de dosis única (por ejemplo, recipientes o viales de plástico sellados) empaquetadas en sobres de aluminio. Cada vial contiene una dosis unitaria en un volumen, por ejemplo, 2 ml, de solvente/tampón de solución.
- Tratamiento
- En un aspecto adicional, la presente divulgación se extiende a un virus o a una formulación del mismo, tal como se describe en el presente documento, para uso en el tratamiento, en particular para el tratamiento del cáncer.
- En una realización, el método de tratamiento es para uso en el tratamiento de un tumor, en particular un tumor sólido.
- El término tumor, como se emplea en el presente documento, se refiere a una masa anormal de tejido que resulta de una división celular excesiva que es incontrolada y progresiva, también llamada neoplasia. Los tumores pueden ser benignos (no cancerosos) o malignos que abarcan todas las formas de cáncer y metástasis.
- En una realización, el tumor es un tumor sólido. El tumor sólido puede ser localizado o metastásico.
- En una realización, el tumor es de origen epitelial.
- En una realización, el tumor es una neoplasia maligna, tal como el cáncer colorrectal, hepatoma, cáncer de próstata, cáncer de páncreas, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de tiroides, cáncer renal, cáncer de vejiga, cáncer de cabeza y cuello o cáncer de pulmón.
- En una realización, el tumor es una neoplasia maligna colorrectal.
- La neoplasia maligna, como se emplea en el presente documento, significa células cancerosas.
- En una realización, el adenovirus oncolítico se emplea en el tratamiento o prevención de la metástasis.
- En una realización, el método o formulación en el presente documento se emplea en el tratamiento de cánceres resistentes a fármacos.
- En una realización, el virus se administra en combinación con la administración de un tratamiento o terapia adicional contra el cáncer.
- En una realización, se proporciona un virus o formulación de acuerdo con la presente divulgación para uso en la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer, por ejemplo, un cáncer descrito anteriormente.
- En un aspecto adicional, se proporciona un método para tratar el cáncer que consiste en administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un virus o formulación de acuerdo con la presente divulgación a un paciente que lo necesite, por ejemplo, un paciente humano.
- En una realización, el virus oncolítico o la formulación en el presente documento contenida se administra en combinación con otra terapia.
- “En combinación”, como se emplea en el presente documento, tiene la intención de abarcar dónde se administra el virus oncolítico antes, simultáneamente y/o después del tratamiento o terapia contra el cáncer.

La terapia del cáncer incluye cirugía, radioterapia, terapia dirigida o quimioterapia. El tratamiento del cáncer, como se emplea en el presente documento, se refiere al tratamiento con un compuesto terapéutico o agente biológico, por ejemplo, un anticuerpo destinado a tratar el cáncer y/o la terapia de mantenimiento del mismo.

- 5 En una realización, el tratamiento contra el cáncer se selecciona de cualquier otra terapia contra el cáncer, que incluye un agente quimioterapéutico, un agente anticancerígeno dirigido, radioterapia, terapia con radioisótopos o cualquier combinación de los mismos.

- 10 En una realización, el virus de la presente divulgación, tal como un adenovirus oncolítico, se puede utilizar como tratamiento previo a la terapia, tal como una cirugía (terapia neoadyuvante), para reducir el tumor, para tratar la metástasis y/o prevenir la metástasis o la metástasis adicional. El adenovirus oncolítico se puede utilizar después de la terapia, tal como una cirugía (terapia adyuvante), para tratar la metástasis y/o prevenir la metástasis o la metástasis más avanzada.

- 15 Al mismo tiempo, como se emplea en el presente documento, se administra el tratamiento adicional contra el cáncer al mismo tiempo o aproximadamente al mismo tiempo que la formulación del adenovirus oncolítico. El tratamiento puede estar contenido dentro de la misma formulación o administrado como una formulación separada.

- 20 En una realización, el virus se administra en combinación con la administración de un agente quimioterapéutico

- 25 El término agente quimioterapéutico, como se emplea en el presente documento, está destinado a referirse a agentes químicos antineoplásicos específicos o fármacos que son selectivamente destructivos para las 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 doxorubicina, 5-fluorouracilo (5-FU), paclitaxel, capecitabina, irinotecán y platinos como cisplatino y oxaliplatino. La dosis preferida puede ser elegida por el médico en base a la naturaleza del cáncer que se está tratando.

- 30 En una realización, el agente terapéutico es ganciclovir, que puede ayudar a controlar las respuestas inmunitarias y/o la vascularización tumoral.

- 35 En una realización, una o más terapias empleadas en el método en el presente documento descrito son metronómicas, es decir, un tratamiento continuo o frecuente con dosis bajas de fármacos contra el cáncer, a menudo administradas concomitantemente con otros métodos de terapia.

- 40 Los adenovirus oncolíticos del subgrupo B, en particular el Ad11 y los derivados de ellos, tal como el EnAd, pueden ser particularmente sinérgicos con los quimioterapéuticos porque parecen tener un mecanismo de acción que es en gran medida independiente de la apoptosis, destruyendo las células cancerosas mediante un mecanismo predominantemente necrótico. Más aún, la inmunosupresión que se produce durante la quimioterapia puede permitir que el virus oncolítico funcione con mayor eficiencia.

- 45 La dosis terapéutica empleada en el presente documento se refiere a la cantidad de virus, tal como el adenovirus oncolítico, que es adecuada para lograr el efecto terapéutico deseado cuando se emplea en un régimen de tratamiento adecuado, por ejemplo, mejora los síntomas o las condiciones de una enfermedad. Una dosis puede considerarse una dosis terapéutica en el tratamiento del cáncer o de las metástasis cuando el número de partículas virales puede ser suficiente para dar lugar a lo siguiente: se ralentiza o se detiene el crecimiento tumoral o metastásico, o se comprueba que el tumor o la metástasis disminuyen de tamaño y/o se prolonga la vida útil del paciente. Las dosis terapéuticas adecuadas generalmente son un equilibrio entre el efecto terapéutico y la toxicidad tolerable, por ejemplo, cuando el efecto secundario y la toxicidad son tolerables dado el beneficio obtenido por la terapia.

- 50 En una realización, un virus o construcción terapéutica de acuerdo con la presente divulgación (que incluye una formulación que lo comprende) se administra semanalmente, por ejemplo una semana 1 la dosis se administra en el día 1, 3, 5, seguido de una dosis cada semana subsiguiente.

- 55 En una realización, un virus o construcción terapéutica de acuerdo con la presente divulgación (que incluye una formulación que lo comprende) se administra quincenalmente o tres veces por semana, por ejemplo, se administra en la semana 1 uno 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 la misma. Este régimen de dosificación se puede repetir tantas veces como sea apropiado.

- 60 En una realización, se administra mensualmente un virus o construcción terapéutica de acuerdo con la presente divulgación (que incluye una formulación que comprende la misma).

- 65 En una realización, los virus y construcciones de la presente divulgación se preparan mediante técnicas recombinantes. El experto apreciará que el genoma del adenovirus armado se puede fabricar por otros medios

técnicos, que incluye la síntesis completa del genoma o un plásmido que comprenda parte de todo el genoma. El experto 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 últimos son artefactos que siguen a la inserción de genes utilizando métodos de clonación.

5

En una realización, el genoma del adenovirus armado se fabrica completamente sintéticamente, por ejemplo, según SEQ ID NO: 37.

10

La divulgación en el presente documento se extiende aún más a un adenovirus de la fórmula (I) o una subfórmula del mismo, obtenido o que se puede obtener mediante la inserción de un transgén o un casete de transgenes.

“Es”, como se emplea en el presente documento, significa que comprende.

15

En el contexto de esta especificación, “que comprende” debe interpretarse como “que incluye”.

Las realizaciones de la invención que comprenden ciertas características/elementos también están destinadas a extenderse a realizaciones alternativas que “consisten” o “consisten esencialmente” en los elementos/características relevantes.

20

Cuando sea técnicamente apropiado, se pueden combinar realizaciones de la invención.

Cualquier realización específica y explícitamente citada en el presente documento puede formar la base de un descargo de responsabilidad, ya sea sola o en combinación con una o más realizaciones adicionales.

25

La presente solicitud reivindica prioridad a partir de los documentos GB1614607.8, GB1700663.6, GB1706219.1 y GB1713765.4. Estos documentos se pueden emplear para corregir errores en la presente especificación, en particular un error en la lista de secuencias.

30

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

Descripción de las figuras

35

Figura 1 (A) Representación esquemática de un anticuerpo acoplador de célula T Biespecífica de la presente divulgación que comprende o carece de una etiqueta de afinidad de decahistidina opcional. Ig SP: péptido señal; 10His: etiqueta de afinidad de decahistidina; L: Ligador GS; V_L: dominio ligero variable; V_H dominio pesado variable. (B) mapa de plásmidos para el acoplador de célula T Biespecífica a pSF-CMV-EpCAM. (C) Mapa de plásmidos para el acoplador de célula T Biespecífica a pSF-CMV-FAP. (D) mapa de plásmidos para el acoplador de célula T Biespecífica a pSF-CMV-Control.

40

Figura 2 (A) transferencia de puntos que muestra la cuantificación de los acopladores de célula T Biespecífica recombinantes. (B) muestra un gráfico que muestra los resultados de ELISA para FAP. (C) gráfico que muestra los resultados de ELISA para EpCAM.

45

La Figura 3 muestra un gráfico que muestra los niveles de expresión de CD69 (A) y CD25 (B) para células T cocultivadas solas o con células NHDF en presencia de un acoplador de célula T Biespecífica a FAP y un acoplador de célula T Biespecífica de control medido utilizando citometría de flujo.

50

Figura 4 (A) gráfico que muestra los niveles de expresión de IFN γ para las células T cocultivadas solas o con células NHDF en presencia de un acoplador de célula T Biespecífica a FAP y un acoplador de célula T Biespecífica de control medido mediante tinción de citocinas intracelulares. Los gráficos (B) y (C) muestran los niveles de expresión de CD69 y CD25 para células T cocultivadas solas o con células DLD en presencia de un acoplador de célula T Biespecífica a EpCAM y un acoplador de célula T Biespecífica de control medido utilizando citometría de flujo.

55

Figura 5 (A) gráfico que muestra los niveles de expresión de IFN γ y para las células T cocultivadas con células DLD en presencia de un acoplador de célula T Biespecífica a EpCAM y un acoplador de célula T Biespecífica de control medido mediante tinción de citocinas intracelulares. Gráficos (B) y (C) que muestran los niveles de CD69 y CD25 para PBMC cocultivadas con células DLD en presencia de un acoplador de célula T Biespecífica a EpCAM y un acoplador de célula T Biespecífica de control medido por citometría de flujo.

60

Figura 6 (A) gráfico que muestra los resultados de un ensayo de LDH que muestra la citotoxicidad de las células NHDF que se han cocultivado con células T y el acoplador de célula T Biespecífica a FAP o el acoplador de célula T Biespecífica 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 células T y el acoplador de célula T Biespecífica

65

a FAP o el acoplador de célula T Biespecífica de control. (C) Imágenes de células NHDF después del cocultivo con células T y acoplador de célula T Biespecífica a FAP frente a un acoplador de célula T Biespecífica de control.

5 Figura 7 (A) diagramas de dispersión que muestran la expresión de FAP en múltiples células derivadas de pacientes. (B) gráfico que muestra el % de células que expresan EpCAM y FAP en múltiples células y estirpes celulares.

10 Figura 8 (A) gráfico que muestra la respuesta a la dosis de NHDF para el acoplador de célula T Biespecífica a FAP con un aumento de la concentración del acoplador de célula T Biespecífica. Gráfico (B) y (C) que muestra los resultados de un ensayo de LDH que muestra la citotoxicidad de las células DLD que han sido cocultivadas con células T y el acoplador de célula T Biespecífica a EpCAM o el acoplador de célula T Biespecífica de control.

15 Figura 9 (A) gráfico que muestra los resultados de un ensayo de LDH que muestra la citotoxicidad de las células SKOV que se han cocultivado con células T y un acoplador de célula T Biespecífica a EpCAM o un acoplador de célula T Biespecífica de control. (B) gráfico que muestra los resultados de un ensayo de LDH que muestra la citotoxicidad de las células MCF7 que se han cocultivado con células T y el acoplador de célula T Biespecífica a EpCAM o el acoplador de célula T Biespecífica de control.

20 La Figura 10 muestra un gráfico que muestra la respuesta a la dosis de NHDF para el acoplador de célula T Biespecífica a EpCAM con un aumento de la concentración de acoplador de célula T Biespecífica.

25 Figura 11 (A) gráfico que muestra la expresión de FAP en células CHO determinada por FAP o anticuerpo de control de isótopos y analizada por 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 células T y un acoplador de célula T Biespecífica a FAP o un acoplador de célula T Biespecífica de control.

30 La Figura 12 muestra un gráfico que muestra la activación de las células T (en base a los niveles de expresión de CD69 y CD25) por parte de las células CHO frente a las CHO-FAP, analizadas utilizando citometría de flujo.

35 Figura 13 (A) gráficos que muestran la expresión de EpCAM de las estirpes celulares parentales frente a la variante transfectada estable determinada por tinción con EpCAM o anticuerpo de control de isótopos y analizada utilizando citometría de flujo. (B) gráfico que muestra los resultados de un ensayo de LDH que muestra la citotoxicidad de las células CHO o CHO-EpCAM que se han cocultivado con células T y acoplador de célula T Biespecífica a EpCAM o acoplador de célula T Biespecífica de control.

La Figura 14 muestra el gráfico que muestra la activación de las células T (en base a los niveles de expresión de CD69 y CD25) por las células CHO frente a las CHO-EpCAM, analizadas utilizando citometría de flujo.

40 Figura 15 (A) gráfico que muestra la capacidad del acoplador de célula T Biespecífica a FAP para activar las células T CD4+ o CD8+ (en base a los niveles de expresión de CD69 y CD25), analizado utilizando 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 células T CD4+ o CD8+ y un acoplador de célula T Biespecífica a FAP o un acoplador de célula T Biespecífica de control.

45 Figura 16 (A) gráfico que muestra la activación de las células T CD4+ y CD8+ (en base a los niveles de expresión de CD69 y CD25) por parte de las células DLD en presencia de EpCAM o de un acoplador de célula T Biespecífica de control analizado utilizando citometría de flujo. (B) gráfico que muestra los resultados de un ensayo de LDH que muestra la citotoxicidad de las células DLD que se han cocultivado con células T CD4+ o CD8+ y un acoplador de célula T Biespecífica a EpCAM o un acoplador de célula T Biespecífica de control.

50 Figura 17 (A) gráfico que muestra el número de células T CD3+ procedentes de ascitis cultivados con un acoplador de célula T Biespecífica a FAP o de control. (B) gráfico que muestra los niveles de expresión de CD25 de las células T de ascitis cultivadas con un acoplador de célula T Biespecífica a FAP o de control. (C) gráfico que muestra el número de células FAP+ procedentes de ascitis cultivadas con un acoplador de célula T Biespecífica a FAP o de control.

55 Figura 18 (A) Representación esquemática del genoma de los adenovirus de la presente divulgación. (B) gráficos que comparan la cinética de la expresión impulsada por el promotor de CMV frente a la de SA.

60 Figura 19 (A) gráfico que muestra la cuantificación del número 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 muestren la actividad oncolítica de NG-601, NG-602, NG-603, NG-604, NG-605, NG-606 o EnAd evaluada por infección de células A549.

65 Figura 20 (A) gráficos que muestran la activación de las células T (en base a los niveles de expresión de CD69 y CD25) por NG-601, NG-602, NG-605 y NG-606 cuando se cocultivan con CHO-FAP, analizadas utilizando

citometría de flujo. (B) gráficos que muestran la activación de las células T (en base a los niveles de expresión de CD69 y CD25) por NG-601, NG-602, NG-605 y NG-606 cuando se cocultivan con CHO-EpCAM, analizadas utilizando citometría de flujo.

5 La Figura 21 muestra gráficos que muestran los resultados de los experimentos para determinar la cantidad de acoplador de célula T Biespecífica a FAP producido a partir de NG-605 y NG-606.

La Figura 22 muestra gráficos que muestran los resultados de los experimentos para determinar la cantidad de acoplador de célula T Biespecífica a EpCAM producido a partir de NG-601 y NG-602.

10 La Figura 23 muestra imágenes de microscopía de células Ad293 infectadas con NG-607, NG-608, NG-609 y NG-610.

15 Figura 24 (A) gráfico que indica la citotoxicidad de las células DLD infectadas con EnAd, analizadas utilizando XCELLigence. (B) gráfico que indica la citotoxicidad de las células SKOV infectadas con EnAd, analizadas utilizando XCELLigence. (C) gráfico que indica la citotoxicidad de las células NHDF infectadas con EnAd, analizadas utilizando XCELLigence.

20 Figura 25 (A) gráfico que indica la capacidad de NG-603, NG-604, NG-605, NG-606 y EnAd para destruir células NHDF, analizadas utilizando XCELLigence. (B) gráfico que indica la capacidad de NG-603, NG-604, NG-605, NG-606 y EnAd para destruir células NHDF, analizadas utilizando un ensayo de LDH.

25 La Figura 26 muestra gráficos que muestran la activación de las células T (en base a los niveles de expresión de CD69 y CD25) por NG-603, NG-604, NG-605, NG-606 cocultivadas con células NHDF, SKOV y células T, analizadas utilizando citometría de flujo.

30 Figura 27 (A) gráfico que muestra la activación de las células T (en base a los niveles de expresión de CD69 y CD25) por NG-603, NG-604, NG-605, NG-606 cocultivadas con células NHDF y SKOV frente a SKOV solas, analizadas utilizando citometría de flujo. (B) gráfico que indica la citotoxicidad de las células NHDF infectadas con NG-605 y NG-606, analizadas utilizando un ensayo de LDH

La Figura 28 muestra imágenes fijas de vídeos de lapso de tiempo de lisis de células NHDF mediante un acoplador de célula T Biespecífica a FAP recombinante, EnAd, NG-603 o NG-605.

35 La Figura 29 muestra imágenes fijas de vídeos de lapso de tiempo de lisis de células NHDF mediante NG-607, NG-608, NG-609 o NG-610.

La Figura 30 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 o ausencia de células T, analizadas utilizando XCELLigence.

40 La 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 o ausencia de células T, analizadas utilizando un ensayo de LDH.

45 La Figura 32 muestra un gráfico que muestra la activación de las células T (en base a los niveles de expresión de CD69 y CD25) por EnAd, NG-601, NG-602, NG-603 y NG-604, analizadas por citometría de flujo.

La Figura 33 muestra los resultados de los experimentos para determinar la capacidad de NG-601 para destruir células tumorales DLD con diversa multiplicidad de infección (MOI) en presencia o ausencia de células T CD3+, evaluadas utilizando xCELLigence.

50 La Figura 34 muestra gráficos que indican la capacidad de EnAd y NG-601, NG-602, NG-603 y NG-604 para destruir células tumorales SKOV en presencia o ausencia de células T CD3+, evaluadas utilizando xCELLigence.

55 La Figura 35 muestra gráficos que indican la capacidad de EnAd y NG-601, NG-602, NG-603 y NG-604 para destruir células tumorales SKOV en presencia o ausencia de células T CD3+, evaluadas utilizando un ensayo de LDH.

60 La Figura 36 muestra un gráfico que muestra la activación de las células T (en base a los niveles de expresión de CD69 y CD25) por EnAd, NG-601, NG-602, NG-603 y NG-604 cocultivadas con células tumorales SKOV, analizadas utilizando citometría de flujo.

65 La Figura 37 muestra un gráfico que muestra la activación de las células T (en base a los niveles de expresión de CD69 y CD25) por EnAd, NG-601, NG-602, NG-603 y NG-604 cocultivadas con células de ascitis, analizadas utilizando citometría de flujo.

La Figura 38 muestra imágenes fijas de videos de lapso de tiempo de lisis de células NHDF mediante acoplador de célula T Biespecífica a EpCAM, EnAd, NG-601 o NG-603.

La Figura 39 muestra imágenes de microscopía de células de ascitis obtenidas de un paciente, infectadas con virus de la presente divulgación y teñidas con EnAd-CMV-GFP y EnAd-SA-GFP como indicadores para determinar la infección y la expresión génica viral en etapa tardía.

Figura 40 (A) gráfico que indica los niveles de expresión de CD25 en las células T CD3+ en muestras de ascitis infectadas con los virus de la presente divulgación. (B) gráfico que indica el número de células FAP+ en muestras de ascitis que fueron infectadas con virus de la presente divulgación.

La Figura 41 muestra imágenes de microscopía de células de ascitis obtenidas de un paciente oncológico, infectadas con virus de la presente divulgación y teñidas con EnAd-CMV-GFP y EnAd-SA-GFP como indicadores para determinar la infección y la expresión génica viral en estadio tardío.

La Figura 42 muestra un gráfico que indica el número de células T CD3+ en muestras de ascitis obtenidas de un paciente con cáncer e infectadas con los virus de la presente divulgación.

La Figura 43 se muestra un gráfico que indica los niveles de expresión de CD25 en las células T CD3+ en muestras de ascitis obtenidas de un paciente con cáncer e infectadas con los virus de la presente divulgación.

La Figura 44 muestra un gráfico que indica el número de células FAP+ en muestras de ascitis obtenidas de un paciente con cáncer e infectadas con los virus de la presente divulgación.

Figura 45 Caracterización del acoplador de célula T Biespecífica a EpCAM y sus efectos en las células T derivadas de PBMC

(A) Esquema de la estructura del acoplador de célula T Biespecífica dirigida a EpCAM y del acoplador de célula T Biespecífica de control no específico. Los dominios VL y VH están conectados con ligadores peptídicos flexibles (L) ricos en serina y glicina para mayor flexibilidad y solubilidad. Ig SP: Péptido señal de inmunoglobulina de cadena ligera; 10His, etiqueta de afinidad de decahistidina. (B) Inducción de los marcadores de activación CD69 y (C) CD25 en PBMC purificadas con CD3 cultivadas solas o con células DLD (5:1) en presencia de sobrenadantes que contienen acoplador de célula T Biespecífica. CD69 y CD25 se midieron por citometría de flujo después de 24 h de cocultivo. Se evaluó la significación frente al isotipo IgG (D) porcentaje de células T positivas a IFN γ después de 6 h en cocultivo con células DLD (5:1) y sobrenadantes que contenían acoplador de célula T Biespecífica. (E) Proliferación, representada por el índice de división y el porcentaje de la población de células T parentales que entran en proliferación, de células T teñidas con CFSE en cocultivo con células DLD (5:1) y sobrenadantes que contienen acoplador de célula T Biespecífica. La fluorescencia se midió por citometría de flujo 5 días después del cocultivo. El índice de división se modeló utilizando la herramienta de proliferación Flowjo. (F) Degranulación de células T, medida por externalización de CD107a, en cocultivo con células DLD (5:1) y sobrenadantes que contienen acoplador de célula T Biespecífica. La externalización se evaluó mediante cocultivo con un anticuerpo específico CD107a durante 6 h seguido de análisis por citometría de flujo. (G) Los niveles de citocinas se midieron mediante el panel de citocinas Th humano LEGENDplex utilizando sobrenadantes de cocultivos de células T con células DLD (5:1) en presencia de sobrenadantes que contienen acoplador de célula T Biespecífica durante 48 h. Cada condición se midió en triplicado biológico y los datos se representaron como la media \pm DE. La significación se evaluó frente a no tratada, a menos que se indique lo contrario, utilizando una prueba de ANOVA de una vía con análisis Post Hoc de Tukey, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

Figura 46 Caracterización del acoplador de célula T Biespecífica a EpCAM recombinante

(A) Transferencia de puntos para estimar la cantidad de acoplador de célula T Biespecífica a EpCAM producido por las células HEK293A transfectadas. (B) ELISA que mide el nivel de unión a EpCAM por controles o EpCAM recombinante o acoplador de célula T Biespecífica no específico. La significación se evaluó mediante comparación con una muestra de control de vector vacía utilizando una prueba de ANOVA de una vía con análisis Post Hoc de Tukey, ***p<0.001

Figura 47 Evaluación de la especificidad del antígeno de la citotoxicidad de células T mediadas por el acoplador de célula T Biespecífica a EpCAM

(A) Inducción del marcador de activación CD25 en células T CD3+ en cocultivo con células CHO o CHO-EpCAM (5:1) y sobrenadantes que contienen acoplador de célula T Biespecífica, medida por análisis FACS después de 24 h de cocultivo. (B) Citotoxicidad de células CHO o CHO-EpCAM cultivadas con sobrenadantes que contienen acoplador de célula T Biespecífica solos o en cocultivo con células T. La citotoxicidad se evaluó mediante la liberación de LDH en los sobrenadantes del cultivo después de 24 h de incubación. (C) Citotoxicidad de múltiples células de carcinoma positivas a EpCAM después de 24 h en cocultivo con células T

(1:5) y sobrenadantes que contienen acoplador de célula T Biespecífica. La viabilidad se midió mediante el ensayo MTS después de 24 h de cocultivo. (D) Niveles de expresión de EpCAM (N = 1) evaluados por el análisis FACS de estirpes celulares positivas a EpCAM en (C), en comparación con la fluorescencia de fondo medida al utilizar un anticuerpo de control de isotipo. (AC) Cada condición se midió en triplicado biológico y se representó como la media \pm DE. La significación se evaluó frente a los controles sin tratar o solo con células T utilizando una prueba de ANOVA de una vía con análisis Post Hoc de Tukey, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Figura 48 Citotoxicidad del acoplador de célula T Biespecífica a EpCAM que expresa EnAd en células SKOV3

Las células SKOV3 se incubaron con virus EnAd o recombinantes en ausencia (A) o presencia (B) de células T y la citotoxicidad se midió mediante la liberación de LDH en los puntos temporales especificados. La significación se evaluó en comparación con los pocillos de control no infectados utilizando una prueba de ANOVA de una vía con análisis Post Hoc de Tukey, *** $p < 0.001$

Figura 49 Identificación de qué células T son responsables de la citotoxicidad mediada por el acoplador de célula T Biespecífica

(A) Activación de célula T mediada por el acoplador de célula T Biespecífica de células CD4 y CD8 24 h después del cocultivo de células T CD3 con células DLD (5:1) y sobrenadante que contiene acoplador de célula T Biespecífica. La activación se evaluó mediante la expresión superficial de CD69 y CD25 y se midió por citometría de flujo. (B) Respuesta proliferativa de células T CD4 y CD8 teñidas con CFSE en cocultivo con células DLD e incubadas con sobrenadantes que contienen acoplador de célula T Biespecífica. La fluorescencia se midió después de 5 días de incubación, mediante análisis FACS. (C) Degranulación de células CD4 y CD8 después de 6 h de cocultivo con células DLD y sobrenadantes que contienen acoplador de célula T Biespecífica. Se agrega un anticuerpo específico de CD107a al medio de cultivo durante el cocultivo y la degranulación se evalúa utilizando citometría de flujo. (D) La citotoxicidad por el subconjunto de células T CD4 o CD8 se evalúa mediante la liberación de LDH en el sobrenadante, después de 24 h de incubación de células DLD con células T purificadas con CD4 o CD8 purificadas (1:5) y un sobrenadante que contiene acoplador de célula T Biespecífica. Cada condición se midió en triplicado biológico y se representó como la media \pm DE. El tratamiento con el acoplador de célula T Biespecífica a EpCAM se comparó con el acoplador de célula T Biespecífica de control, a menos que se indique lo contrario, y la significación se evaluó utilizando una prueba de ANOVA de una vía con análisis Post Hoc de Tukey, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Figura 50 Citotoxicidad y activación de células T por el acoplador de célula T Biespecífica a EpCAM que expresa EnAd en células DLD

Citotoxicidad para células DLD infectadas en ausencia (A) o presencia de células T (B). Las células DLD se infectaron y se cocultivaron con células T y la citotoxicidad se midió mediante la liberación de LDH en los puntos temporales especificados. (C-D) Las células T de (B) se cosecharon y tiñeron para los marcadores de activación CD69 (C) o CD25 (D) y se analizaron utilizando citometría de flujo. (E-F) Cuantificación de acoplador de célula T Biespecífica a EpCAM producido a partir de células DLD infectadas con virus recombinantes. Curva estándar de LDH liberada (Abs) de DLD en cocultivo con células CD3+ y cantidades conocidas variables acoplador de célula T Biespecífica a EpCAM recombinante (E). Paralelamente, se incubaron cocultivos con sobrenadantes diluidos (10,000 veces) de células DLD infectadas de 3 días (F). La curva estándar permitió la determinación aproximada del acoplador de célula T Biespecífica a EpCAM producido a 165 μ g y 50 μ g por millón de células DLD para el acoplador de célula T Biespecífica a EnAd-CMV-EpCAM y el acoplador de célula T Biespecífica a EnAd-SA-EpCAM, respectivamente. La significación se evaluó mediante la comparación con pocillos de control no infectados utilizando una prueba de ANOVA de una vía con análisis Post Hoc de Tukey, *** $p < 0.001$

Figura 51 Caracterización de virus oncolíticos EnAd que expresan Acoplador de célula T Biespecífica a EpCAM utilizando estirpes celulares y células T derivadas de PBMC

(A) las células DLD se infectaron con EnAd parental o virus recombinante (100 vp/célula) y los pocillos se recogieron a las 24 o 72 h. La replicación se evaluó al medir los genomas mediante qPCR frente a hexones virales. (B) Citotoxicidad de las células DLD infectadas con EnAd o virus recombinante a concentraciones crecientes de virus. La citotoxicidad se midió mediante el ensayo MTS después de 5 días de infección. (C) Se evaluó la expresión de transgenes de los sobrenadantes del día 3 de células HEK293A no infectadas o infectadas por virus mediante un análisis de inmunotransferencia y se probaron con un anticuerpo anti-His. (D) Inducción del marcador de activación CD25 de células T positivas a CD3 cultivadas con CHO o CHO-EpCAM (E:T 5:1) y diluidos HEK293A sobrenadantes de (D). La activación se midió por la expresión superficial de CD25 utilizando citometría de flujo. (E) Citotoxicidad de células CHO o CHO-EpCAM incubadas con sobrenadantes de HEK293A de (D) solas o en cocultivo con PBMC purificada con CD3 (E:T 5:1). Los sobrenadantes de HEK293A se diluyeron 300 veces. La citotoxicidad se evaluó mediante la liberación de LDH en el sobrenadante después de 24 h de incubación. Cada condición se midió en triplicado biológico y se representó como la media \pm DE. La significación se evaluó utilizando una prueba de ANOVA de una vía con el análisis Post Hoc de Tukey con cada condición comparada con las sin tratar, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Figura 52 Composición celular de los exudados malignos

(A) Imagen representativa (muestra de derrame pleural, Paciente 3 de la Figura 57) que demuestra el cribado de la ascitis y los fluidos exudados para la composición celular, evaluada por citometría de flujo. (B) El número absoluto de cada tipo de célula (en un tamaño de muestra de 10,000 células) se documenta en la tabla.

Figura 53 Potencia superior del acoplador de célula T Biespecífica a EpCAM que expresa EnAd en una estirpe celular cancerosa parcialmente resistente a EnAd

(A-B) La viabilidad de las células SKOV3 se monitorizó en tiempo real durante 160 h mediante el ensayo de citotoxicidad basado en xCELLigence. Las células SKOV3 se sembraron e infectaron con virus EnAd o EnAd armado con acoplador de célula T Biespecífica a las 0 h, y las células no infectadas actuaron como control negativo. En (B) se agregaron PBMC purificadas con CD3 (5:1) 2 h después de la infección y se midió la impedancia a intervalos de 15 min. (C-D) Las PBMC purificadas con CD3 se cultivaron con células SKOV3 (5:1) infectadas con EnAd parental o virus armados recombinantes. En cada punto de tiempo, se cosecharon células T y se analizaron para determinar la expresión superficial de CD69 (C) o CD25 (D) mediante citometría de flujo. (E) Secuencias de lapso de tiempo que muestran cocultivos de células de carcinoma SKOV3 (sin teñir), fibroblastos NHDF (rojo) y PBMC purificadas con CD3 (azul), infectadas con EnAd, acoplador de célula T Biespecífica a EnAd-CMVEpCAM o no infectadas. La apoptosis se visualizó utilizando el reactivo de detección CellEvent Caspasa 3/7 (verde). Las imágenes se tomaron con un microscopio invertido Nikon TE 2000-E Eclipse a intervalos de 15 min, cubriendo un período de 96 h. Se registraron imágenes representativas en los horarios mostrados; aumento original X 10; barra de escala 100 μ m. (A-D) Cada condición se midió en triplicado biológico y se representó como la media \pm DE. La significación se evaluó en comparación con el control no infectado utilizando una prueba de ANOVA de una vía con análisis Post Hoc de Tukey, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Figura 54 Expresión de PD1 y el efecto de los anticuerpos PD1 en la activación células T mediada por el acoplador de célula T Biespecífica

(A) La expresión de PD1 por parte de las células T endógenas tras su aislamiento inicial de derrames pleurales se evaluó utilizando citometría de flujo. (B-D) Las células totales no purificadas de derrames pleurales (de tres pacientes diferentes) se incubaron en 100 % de fluido del mismo exudado pleural en presencia de acoplador de célula T Biespecífica libre, EnAd o virus recombinante. Después de 5 días, se recogió la población total de células y se cuantificaron el número de (B) células T CD3+ y las que eran (C) CD25+. (D) El número de células EpCAM+ se midió utilizando citometría de flujo. La significación se evaluó mediante la comparación con los pocillos de control sin tratar utilizando una prueba de ANOVA de una vía con análisis Post Hoc de Tukey, *** $p < 0.001$

Figura 55 El acoplador de célula T Biespecífica a EpCAM que expresa EnAd puede destruir selectivamente células tumorales humanas primarias de pacientes tratados previamente con quimioterapia

(A) Citotoxicidad de células EpCAM+ o (B) fibroblastos FAP+, aislados por primera vez de la ascitis de tres pacientes y expandidos ex vivo, luego se incuban con un acoplador de célula T Biespecífica recombinante o se infectan con EnAd o virus recombinante. La citotoxicidad se midió utilizando citometría de flujo después de 5 días. (C) Inducción del marcador de activación CD25 en células T positivas a CD3 cultivadas con células EpCAM+ y FAP+ derivadas de ascitis de (A+B). Cada condición se midió en triplicado biológico y se representó como la media \pm DE. La significación se evaluó por comparación con los sin tratar utilizando una prueba de ANOVA de una vía con análisis Post Hoc de Tukey, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Figura 56 El acoplador de célula T Biespecífica a EpCAM puede superar los efectos inmunosupresores del fluido ascítico y activar las células T endógenas

(A-B) Las células T derivadas de PBMC se incubaron con anticuerpos anti-CD3 en un medio de cultivo RPMI o la presencia de 100 % de fluido ascítico peritoneal de cinco pacientes con cáncer de ovario. (A) A las 24 h se analizaron la inducción de los marcadores de activación de células T CD69 y CD25, y (B) la degranulación de células T medida por externalización de CD107a, utilizando citometría de flujo. (C) La viabilidad de las células MCF7 se monitorizó en tiempo real durante 60 h mediante un ensayo de citotoxicidad basado en xCELLigence. Las células MCF7 se sembraron e incubaron con un acoplador de célula T Biespecífica a EpCAM o de control a las 25 h, en presencia de medio RPMI o 100 % de fluido ascítico #1 o #2. Las células sin tratar sirvieron como control negativo. Al mismo tiempo, se agregaron PBMC purificadas con CD3 (5:1) y se midió la impedancia a intervalos de 15 minutos. (D) Las células totales endógenas no purificadas de la ascitis peritoneal se incubaron en 100 % de fluido ascítico en presencia de acoplador de célula T Biespecífica a EpCAM o de control. Después de 24 h, se recogió la población celular total y se midió el número de células CD3+/CD69+ y CD3+/CD25+ utilizando citometría de flujo. Cada condición se midió en triplicado biológico y se representó como la media \pm DE. La significación se evaluó mediante comparación con RPMI (A + B), no tratado (D) o acoplador de célula

T Biespecífica de control (E) utilizando una prueba de ANOVA de una vía con análisis Post Hoc de Tukey, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Figura 57 El acoplador de célula T Biespecífica a EpCAM que expresa EnAd puede activar las células T endógenas para destruir las células tumorales endógenas dentro de los exudados pleurales malignos.

Las células totales no purificadas de derrames pleurales (de cuatro pacientes diferentes) se incubaron en un 100 % de fluido del mismo exudado pleural en presencia de un acoplador de célula T Biespecífica libre, EnAd o virus recombinante. Después de 5 días, se recogió la población total de células y se cuantificó el número de (A) células T CD3+ y los que eran (B) CD25+. (C) El número de células EpCAM+ se midió utilizando citometría de flujo. (D) Imágenes representativas (aumento de X 10; barra de escala de 100 μm) y análisis de citometría de flujo de células de derrame pleural del paciente 3 (células cancerosas y linfocitos) después del tratamiento con EnAd o acoplador de célula T Biespecífica a EnAd-CMVEp-CAM. (E) A los 5 días, los niveles de citocinas se midieron mediante un panel de citocinas Th humano LEGENDplex utilizando cultivos de derrame pleural después de la incubación con un acoplador de célula T Biespecífica recombinante libre o la infección con EnAd o virus recombinante. Cada condición se midió en triplicado biológico y se representó como la media \pm DE. La significación se evaluó mediante comparación con muestras de control sin tratar utilizando una prueba de ANOVA de una vía con análisis Post Hoc de Tukey, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

La Figura 58 muestra la cantidad de IL-10 medida en suero normal (NS) o en fluidos de exudado maligno del paciente (A: ascitis peritoneal, P: derrames pleurales) utilizando el kit ELISA MAX de IL-10 humana (Biolegend, 430604).

La Figura 59 muestra la activación de las células T de PBMC mediadas por perlas CD3/28 (basada en los niveles de CD69/CD25) en los fluidos del paciente en comparación con el suero normal medido por citometría de flujo. A: fluido exudado del paciente, P: fluido pleural.

La Figura 60 muestra la degranulación de las células T de PBMC mediada por perlas CD3/28 (basada en la expresión de CD107a) en los fluidos del paciente. A: ascitis, P: fluido pleural.

La Figura 61 muestra la correlación entre los niveles de IL-10 en los fluidos del paciente y la degranulación de células T mediada por perlas CD3/CD28.

La Figura 62 muestra la activación de las células T de PBMC mediadas por perlas de acoplador de célula T Biespecífica a EpCAM (basada en la expresión de CD69/CD25) en los fluidos del paciente. A: ascitis, P: fluido pleural.

La Figura 63 muestra la degranulación de células T de PBMC mediada por perlas del acoplador de célula T Biespecífica a EpCAM (basada en la expresión de CD107a) en fluidos del paciente. A: ascitis, P: fluido pleural.

La Figura 64 muestra la citotoxicidad mediada por perlas del acoplador de célula T Biespecífica a EpCAM de SKOV3 en los fluidos de los pacientes. A: ascitis, P: fluidos pleurales.

La Figura 65 muestra la activación células T mediada por el acoplador de célula T Biespecífica a EpCAM (basada en la expresión de CD25/CD69) en medios RPMI frente a fluido ascítico.

La Figura 66 muestra la capacidad del acoplador de célula T Biespecífica a EnAd-SA-EpCAM y el acoplador de célula T Biespecífica a EnAd-SA-Control para inducir la lisis de células objetivo mediada por células T en medios RPMI frente a fluido ascítico. ((A) número de CD3+. (B) Expresión de CD25 de células T. (C) número de células EpCAM+ determinado por citometría de flujo.

La Figura 67 muestra la capacidad del acoplador de célula T Biespecífica a EnAd-SA-EpCAM y el acoplador de célula T Biespecífica a EnAd-SA-Control para inducir la lisis de células objetivo mediada por células T en fluido ascítico (7 muestras de pacientes).

(A) número de CD3+. (B) Expresión de CD25 de células T. (C) número de células EpCAM+ determinado por citometría de flujo. Véase la leyenda de la Figura 67A.

La Figura 68 muestra una comparación de la activación de la producción de citocinas de células T por la proteína recombinante del acoplador célula T Biespecífica a FAP en presencia de fibroblastos humanos y por la activación policlonal con perlas anti-CD3/CD28. (A) Niveles de IFN γ medidos por ELISA. (B) Niveles de citocinas medidos por una matriz de perlas de citocinas.

Figura 69: El acoplador de célula T Biespecífica dirigido a FAP induce la degranulación de las células T y la citotoxicidad específica de las células FAP+.

(A) Degranulación de las células T en cultivo con células NHDF (5:1) y (B) Sobrenadantes que contienen acoplador de célula T Biespecífica. La degranulación se evaluó mediante externalización de CD107a tras un cultivo de 6 h con un anticuerpo específico de CD107a y se midió mediante citometría de flujo. Se utilizaron dinasperlas CD3/CD28 como control positivo. (C) Citotoxicidad de las células NHDF después de 24 h en cocultivo con células T (1:5) y diluciones en serie de 10 veces de sobrenadantes que contienen acoplador de célula T Biespecífica. La citotoxicidad se evaluó mediante la liberación de LDH en sobrenadantes de cultivo. (D) Se evaluó la lisis de NHDF por liberación de LDH (izquierda) e inducción de CD25 en células T (derecha) después de 24 h de cocultivo con células T derivadas de PBMC (1:5) de seis donantes sanos y sobrenadantes que contienen acoplador de célula T Biespecífica.

Figura 70 El acoplador de célula T Biespecífica a FAP que expresa EnAd destruye selectivamente los fibroblastos FAP+ y disminuye el TGFb en muestras de ascitis peritoneal

(A,B) Número de fibroblastos FAP+ (A) y células tumorales EpCAM+ (B) después de 72 h de cultivo con células T derivadas de PBMC y virus EnAd o recombinantes. Las células de ascitis se aislaron primero de tres pacientes con ascitis y se expandieron ex vivo. El número de células se midió a las 72 h después de infección utilizando citometría de flujo. (C) Se midió la inducción del marcador de activación CD25 en células CD3 derivadas de PBMC de (A) a las 72 h después de la infección. (D) Los niveles de TGFb se midieron mediante ELISA utilizando los sobrenadantes recogidos de (A).

La Figura 71 muestra la activación de las células T asociadas a tumores endógenos y la destrucción asociada de las células FAP+ en muestras de biopsia de ascitis maligna de pacientes por la proteína del acoplador de célula T Biespecífica a FAP y los virus del acoplador de célula T Biespecífica a EnAd-FAP. (A) Activación de células T medida por la expresión de CD25. (B) número residual de células FAP+ medido por citometría de flujo.

Figura 72 Efecto de los anticuerpos bloqueadores de PD-L1 en la activación de células T mediadas por el acoplador de célula T Biespecífica en una muestra de paciente

(A) La expresión de PD1 por células T endógenas y PD-L1 en células FAP+ tras su aislamiento inicial de la ascitis peritoneal se evaluó utilizando citometría de flujo. (B) Las células totales no purificadas de ascitis peritoneal se incubaron en un 50 % de fluido del mismo exudado en presencia de un acoplador de célula T Biespecífica libre, EnAd o virus recombinante, con o sin anticuerpo bloqueador anti-PD-L1. Después de 2 días, se recogió la población total de células y se cuantificó el número de células T CD25+ mediante citometría de flujo. (C) Cantidad de interferón gamma en sobrenadantes de cultivo de (B, D) medida por ELISA. (D) El número de células FAP+ residuales en (B) se midió utilizando citometría de flujo.

Figura 73 Los acopladores de célula T Biespecífica que expresan EnAd activan y redirigen las células T de las muestras de biopsia del paciente para lisar fibroblastos NHDF

(A) La expresión de PD-1 por las células T endógenas tras el aislamiento de donantes sanos o muestras de biopsia de cáncer con exudado maligno. La expresión de PD-1 se midió utilizando citometría de flujo. (B) La proporción de células CD3+ dentro de la población celular no purificada de PBMC y muestras de biopsia de cáncer medida por citometría de flujo. (C) Niveles de interferón gamma medidos por ELISA en sobrenadantes de cultivo recogidos de (B) a las 120 h después de tratamiento. (D) La viabilidad de los fibroblastos de NHDF se monitorizó en tiempo real durante 130 h mediante el ensayo de citotoxicidad xCELLigence en cocultivo con PBMC o células de biopsia de cáncer total (1:5) y un sobrenadante que contiene el acoplador de célula T Biespecífica.

La Figura 74 muestra el efecto de las muestras de fluido inmunosupresor de ascitis en la activación mediada por el acoplador de célula T Biespecífica a FAP y perlas anti-CD3/CD28. (A) Células T PBMC activadas con Dinaperlas anti-CD3/Cd28. (B) Células T de PBMC activadas con acopladores de célula T Biespecífica a FAP o de control en presencia de células NHDF. NS: suero normal, A: ascitis peritoneal.

Figura 75 El acoplador de célula T Biespecífica a FAP que expresa EnAd polariza el macrófago CD11b+ en la ascitis del paciente a un fenotipo más inflamatorio

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

Figura 76 Caracterización de la arquitectura y composición celular del tumor sólido de próstata

(A) Tinción con EpCAM, (B) tinción con CD8, (C) tinción con FAP. (D) Imágenes inmunohistoquímicas representativas de la inducción de CD25 dentro de cortes de tumor de próstata después del tratamiento con virus que expresan el acoplador de célula T Biespecífica. Los núcleos tumorales se cortaron a 300 μ M de grosor con un vibratomo Leica, se cultivaron e infectaron en insertos y se cosecharon después de 7 días de tratamiento. (E) Niveles de IFN γ en el medio de cultivo de tejido medidos por ELISA. Los sobrenadantes se cosecharon de cortes de cultivos de tejido maligno y benigno en el momento especificado. (F) Niveles de IL-2 en el medio de cultivo de tejidos malignos y benignos medidos por ELISA.

La Figura 77A-C muestra una representación esquemática de los casetes de transgenes utilizados en el Ejemplo 33.

La Figura 77D muestra un gráfico que indica el número de genomas virales detectados por célula en las células tumorales tratadas con NG-611, NG-612 y NG-617.

La Figura 78 muestra el porcentaje de células T que expresan CD69 (a), CD25 (b), HLA-DR (c), CD40L (d) o CD107a (e) de la superficie celular después del cocultivo con células SKOV que expresan EpCam y sobrenadantes recogidos de células A549 a las 24, 48 o 72 horas después del tratamiento con partículas de virus NG-611 en comparación con NG-612, enadenotucirev o sobrenadantes de control sin tratar.

La Figura 79 muestra el porcentaje de células T que expresan CD69 (a), CD25 (b), HLA-DR (c), CD40L (d) o CD107a (e) de la superficie celular después del cocultivo con células MRC-5 que expresan FAP y sobrenadantes recogidos de células A549 a las 24, 48 o 72 horas después del tratamiento con partículas del virus NG-612 en comparación con NG-611, enadenotucirev o sobrenadantes de control sin tratar.

La Figura 80 muestra el porcentaje de células MRC-5 que expresan EpCAM y FAP

La Figura 81 muestra la expresión de IFN γ en los sobrenadantes de los cocultivos de células T con células SKOV (A) o células MRC-5 (B) incubadas con sobrenadantes recogidos de células A549 a las 24, 48 o 72 horas después del tratamiento con partículas de virus NG-611, NG-612 o enadenotucirev, o sobrenadantes de control sin tratar.

La Figura 82 muestra la eficacia antitumoral y la activación inmunitaria de los virus que expresan el acoplador de célula T Biespecífica in vivo. (a) Volumen tumoral en ratones tratados con solución salina, enadenotucirev o NG-611. (b) Relación de células T CD8 y CD4 en tumores tratados con NG-611 en comparación con controles tratados o sin tratar con enadenotucirev.

La Figura 83 muestra la representación esquemática de los casetes de transgenes. (a) NG-615, (b) NG-640, (c) NG-641.

La Figura 84 se muestra un gráfico que indica el número de genomas virales detectados por célula en las células tumorales tratadas con NG-612 y NG-615

La Figura 85 muestra la expresión de IFN α , MIP1 α y Flt3L en el sobrenadante celular de NG-615 frente al sobrenadante de enadenotucirev y las células tumorales de control sin tratar.

La Figura 86 muestra el número de células T que expresan CD69 (a), CD25 (b), HLA-DR (c), CD40L (d) o CD107a de la superficie celular (e) después del cocultivo con células MRC-5 que expresan FAP y sobrenadantes recogidos de células A549 a las 24, 48 o 72 horas después del tratamiento con partículas de virus NG-615 en comparación con NG-612, enadenotucirev o sobrenadantes de control sin tratar.

La Figura 87 muestra la expresión de IFN γ en los sobrenadantes de los cocultivos de células T con células MRC-5 incubadas con sobrenadantes recogidos de células A549 a las 24, 48 o 72 horas después del tratamiento con partículas de virus NG-612, NG-615 o enadenotucirev, o sobrenadantes de control sin tratar.

La Figura 88 muestra la representación esquemática del casete del transgén NG-618

La Figura 89 muestra la detección de la expresión de FAP en superficie en células MRC-5 (a) o la expresión de EpCam en células SKOV (b) después de la incubación con sobrenadantes recogidos de células A549 a las 72 horas después del tratamiento con partículas de virus NG-611, NG-612, NG-615 o enadenotucirev.

La Figura 90 muestra el porcentaje de células T que expresan CD24 (a), CD40L (b) o CD107a de la superficie celular (c) después del cocultivo con células MRC-5 que expresan FAP y sobrenadantes recogidos de células A549 a las 72 horas después del tratamiento con partículas de virus NG-618 en comparación con enadenotucirev o controles sin tratar.

La Figura 91 muestra el porcentaje de células T que expresan CD24 (a), CD40L (b) o CD107a de la superficie celular (c) después del cocultivo con células SKOV que expresan EpCam y sobrenadantes recogidos de células A549 a las 72 horas después del tratamiento con partículas de virus NG-618 en comparación con enadenotucirev o controles sin tratar.

La Figura 92 muestra el porcentaje de células MRC-5 (a) o SKOV (b) muertas después del cocultivo con células T y sobrenadantes recogidos de células A549 a las 72 horas después del tratamiento con partículas del virus NG-618 en comparación con enadenotucirev o controles sin tratar.

Secuencias

SEQ ID NO: 1 Secuencia codificante de ADN del acoplador de célula T Biespecífica a anti-EpCAM, con secuencia de señal de terminal N y etiqueta de afinidad deca-His de terminal C

SEQ ID NO: 2 Secuencia de proteínas de ADN del acoplador de célula T Biespecífica a anti-EpCAM, con secuencia de señal de terminal N y etiqueta de afinidad deca-His de terminal C

SEQ ID NO: 3 Secuencia codificante de ADN del acoplador de célula T Biespecífica a anti-FAP, con secuencia de señal de terminal N y etiqueta de afinidad deca-His de terminal C

SEQ ID NO: 4 Secuencia de aminoácidos del acoplador de célula T Biespecífica a anti-FAP, con secuencia de señal de terminal N y etiqueta de afinidad deca-His de terminal C

SEQ ID NO: 5: Secuencia codificante de ADN del acoplador de célula T Biespecífica a (anti-FHA) de control, con secuencia de señal de terminal N y etiqueta de afinidad deca-His de terminal C

SEQ ID NO: 6: Secuencia de aminoácidos del acoplador de célula T Biespecífica a (anti-FHA) de control con secuencia de señal de terminal N y etiqueta de afinidad deca-His de terminal C

SEQ ID NO: 7: secuencia de aminoácidos ScFv anti-CD3

SEQ ID NO: 8: VH Anti-CD3

SEQ ID NO: 9: VL Anti-CD3

SEQ ID NO: 10: secuencia ligadora de ScFv Anti-CD3

SEQ ID NO: 11: ScFv Anti-FAP

SEQ ID NO: 12: domino VL Anti-FAP

SEQ ID NO: 13: dominio VH Anti-FAP

SEQ ID NO: 14: secuencia ligadora Anti-FAP y Anti-EpCAM

SEQ ID NO: 15: Secuencia líder del acoplador de célula T Biespecífica

SEQ ID NO: 16: ScFv Anti-EpCAM

SEQ ID NO: 17: VL Anti-EpCAM

SEQ ID NO: 18: VH Anti-EpCAM

SEQ ID NO: 19: Acoplador de célula T Biespecífica (Anti-FHA) de Control

SEQ ID NO: 20: ScFv (Anti-FHA) de control

SEQ ID NO: 21: VL (Anti-FHA) de control

SEQ ID NO: 22: VH (Anti-FHA) de control

SEQ ID NO: 23: secuencia ligadora de ScFv (Anti-FHA) de control

SEQ ID NO: 24: Secuencia de etiqueta Deca-His

SEQ ID NO: 25: acoplador de célula T Biespecífica a FAP-P2A-RFP (*CURSIVA* = líder, **NEGRILLA** = sitio de escisión de furina, SUBRAYADO = secuencia P2A, minúscula = RFP)

SEQ ID NO: 26: Acoplador de célula T Biespecífica (Anti-FHA) de control -P2A-RFP (*CURSIVA* = líder, **NEGRILLA** = sitio de escisión de furina, SUBRAYADO = secuencia P2A, minúscula = RFP)

SEQ ID NO: 27: Secuencia codificante de ADN de EpCAM humana

SEQ ID NO: 28: Secuencia de aminoácidos de EpCAM humana

SEQ ID NO: 29: secuencia codificante de ADN de FAP humana

SEQ ID NO: 30: secuencia de aminoácidos de FAP humana

SEQ ID NO: 31: Secuencia del promotor CMV

SEQ ID NO: 32: secuencia de poliadenilación tardía de SV40

SEQ ID NO: 33: Secuencia nula

SEQ ID NO: 34: NG-601 (acoplador de célula T Biespecífica a EnAd-CMV-EpCAM)

SEQ ID NO: 35: NG-602 (acoplador de célula T Biespecífica a EnAd-SA-EpCAM)

SEQ ID NO: 36: NG-605 (acoplador de célula T Biespecífica a EnAd-CMV-FAP)

SEQ ID NO: 37: NG-606 (acoplador de célula T Biespecífica a EnAd-SA-FAP)

SEQ ID NO: 38 genoma EnAd

SEQ ID NO: 39 By secuencia de ADN que corresponde a y que incluye bp 28166-28366 del genoma EnAd

SEQ ID NO: 40 By secuencia de ADN que corresponde a y que incluye bp 29345-29379 del genoma EnAd

SEQ ID NO: 41 etiqueta HIS

SEQ ID NO: 42 Secuencia aceptora de empalme.

SEQ ID NO: 43 Secuencia de poliadenilación SV40

SEQ ID NO: 44 Secuencia de ácidos nucleicos del acoplador de célula T Biespecífica a EpCAM (OKT3)

SEQ ID NO: 45 secuencia de ácidos nucleicos del acoplador de célula T Biespecífica a FAP (OKT3)

(continuación)

- SEQ ID NO: 46 secuencia de ácidos nucleicos del acoplador de célula T Biespecífica a FAP (aCD3)
- SEQ ID NO: 47 Casete de transgén NG-611
- SEQ ID NO: 48 Casete de transgén NG-612
- 5 SEQ ID NO: 49 Casete de transgén NG-613
- SEQ ID NO: 50 Inserto de sitio de restricción (B_x)
- SEQ ID NO: 51 Inserto de sitio de restricción (B_y)
- SEQ ID NO: 52 Secuencia del promotor CMV
- SEQ ID NO: 53 Secuencia del promotor PGK
- 10 SEQ ID NO: 54 Secuencia del promotor CBA
- SEQ ID NO: 55 secuencia de ADN del aceptor de empalme corto (SSA)
- SEQ ID NO: 56 secuencia de ADN del aceptor de empalme (SA)
- SEQ ID NO: 57 secuencia de ADN del aceptor de empalme ramificado (bSA)
- SEQ ID NO: 58 secuencia de Kozak (secuencia nula)
- 15 SEQ ID NO: 59 Ejemplo de codón de parada
- SEQ ID NO: 60 Secuencia de entrada interna al ribosoma (IRES)
- SEQ ID NO: 61 Péptido P2A
- SEQ ID NO: 62 Péptido F2A
- SEQ ID NO: 63 Péptido E2A
- 20 SEQ ID NO: 64 Péptido T2A
- SEQ ID NO: 65 secuencia de poliadenilación (poliA)
- SEQ ID NO: 66 Secuencia líder
- SEQ ID NO: 67 Secuencia líder
- SEQ ID NO: 68 secuencia de aminoácidos IFN γ
- 25 SEQ ID NO: 69 secuencia de aminoácidos IFN α
- SEQ ID NO: 70 secuencia de aminoácidos TNF α
- SEQ ID NO: 71 secuencia de ADN que corresponde a la región E2B del genoma EnAd (bp 10355-5068)
- SEQ ID NO: 72: Secuencia codificante de ADN del acoplador de célula T Biespecífica a anti-EpCAM, con secuencia de señal de terminal N y etiqueta de afinidad deca-His de terminal C
- 30 SEQ ID NO: 73: Secuencia de proteínas de ADN del acoplador de célula T Biespecífica a anti-EpCAM, con secuencia de señal de terminal N sin etiqueta de afinidad deca-His de terminal C
- SEQ ID NO: 74: Secuencia codificante de ADN del acoplador de célula T Biespecífica a anti-FAP, con secuencia de señal de terminal N sin etiqueta de afinidad deca-His de terminal C
- SEQ ID NO: 75: Secuencia de aminoácidos del acoplador de célula T Biespecífica a anti-FAP, con secuencia de señal de terminal N sin etiqueta de afinidad deca-His de terminal C
- 35 SEQ ID NO: 76: Secuencia codificante de ADN del acoplador de célula T Biespecífica a (anti-FHA) de control, con secuencia de señal de terminal N sin etiqueta de afinidad deca-His de terminal C
- SEQ ID NO: 77: Secuencia de aminoácidos del acoplador de célula T Biespecífica a (anti-FHA) de control con secuencia de señal de terminal N sin etiqueta de afinidad deca-His de terminal C
- 40 SEQ ID NO: 78: Acoplador de célula T Biespecífica (Anti-FHA) de control sin etiqueta de afinidad deca-His de terminal C
- SEQ ID NO: 79: NG-601 (Acoplador de célula T Biespecífica a EnAd-CMV-EpCAM) sin etiqueta de afinidad deca-His
- SEQ ID NO: 80: NG-602 (Acoplador de célula T Biespecífica a EnAd-SA-EpCAM) sin etiqueta de afinidad deca-His
- 45 SEQ ID NO: 81: NG-605 (Acoplador de célula T Biespecífica a EnAd-CMV-FAP) sin etiqueta de afinidad deca-His
- SEQ ID NO: 82: NG-606 (Acoplador de célula T Biespecífica a EnAd-SA-FAP) sin etiqueta de afinidad deca-His
- 50 SEQ ID NO: 83: Secuencia de ácidos nucleicos del acoplador de célula T Biespecífica a EpCAM (OKT3)
- SEQ ID NO: 84: Secuencia nula
- SEQ ID NO: 85: secuencia de ácidos nucleicos del acoplador de célula T Biespecífica a FAP (OKT3)
- SEQ ID NO: 86: Secuencia nula
- 55 SEQ ID NO: 87: secuencia de ácidos nucleicos del acoplador de célula T Biespecífica a FAP (aCD3)
- SEQ ID NO: 88: Casete de transgén NG-611
- SEQ ID NO: 89: Casete de transgén NG-612
- SEQ ID NO: 90: Casete de transgén NG-613
- SEQ ID NO: 91: Casete de transgén NG-614
- SEQ ID NO: 92: Casete de transgén NG-617
- 60 SEQ ID NO: 93: secuencia de aminoácidos del acoplador de célula T Biespecífica a EpCAM (OKT3)
- SEQ ID NO: 94: secuencia de aminoácidos del acoplador de célula T Biespecífica a FAP (OKT3)
- SEQ ID NO: 95: secuencia de aminoácidos del acoplador de célula T Biespecífica a FAP (aCD3)
- SEQ ID NO: 96: Genoma NG-611
- SEQ ID NO: 97: Genoma NG-612
- 65 SEQ ID NO: 98: Genoma NG-613

(continuación)

SEQ ID NO: 99: Genoma NG-614
 SEQ ID NO: 100: Genoma NG-617
 SEQ ID NO: 101: Genoma NG-615
 5 SEQ ID NO: 102: Genoma NG-640
 SEQ ID NO: 103: Genoma NG-641
 SEQ ID NO: 104: Secuencia nula
 SEQ ID NO: 105: secuencia de ácidos nucleicos Flt3L
 SEQ ID NO: 106: Secuencia nula
 10 SEQ ID NO: 107: secuencia de ácidos nucleicos MIP1 α
 SEQ ID NO: 108: secuencia ligadora flexible
 SEQ ID NO: 109: secuencia de ácidos nucleicos IFN α
 SEQ ID NO: 110: secuencia de ácidos nucleicos CXCL10
 SEQ ID NO: 111: secuencia de ácidos nucleicos CXCL9
 15 SEQ ID NO: 112: Casete de transgén NG-615
 SEQ ID NO: 113: Casete de transgén NG-640
 SEQ ID NO: 114: Casete de transgén NG-641
 SEQ ID NO: 115: secuencia de aminoácidos FLT3L
 SEQ ID NO: 116: secuencia de aminoácidos MIP1 α
 20 SEQ ID NO: 117: secuencia de aminoácidos IFN α
 SEQ ID NO: 118: secuencia de aminoácidos CXCL9
 SEQ ID NO: 119: secuencia de aminoácidos CXCL10
 SEQ ID NO: 120: Genoma NG-618
 SEQ ID NO: 121: secuencia de aminoácidos del acoplador de célula T Biespecífica a EpCam NG-618
 25 SEQ ID NO: 122: secuencia de aminoácidos del acoplador de célula T Biespecífica a FAP NG-618
 SEQ ID NO: 123: NG-618 Casete de transgén
 SEQ ID NO: 124 a 297: son secuencias ligadoras
 SEQ ID NO: 298: Genoma NG-616

30 Ejemplos

Ejemplo 1

Se diseñaron acopladores de célula T Biespecífica recombinantes y se produjeron proteínas como se describe en este ejemplo.

Ingeniería de acopladores de célula T Biespecífica

Los acopladores de célula T Biespecífica se generan al unir dos fragmentos de anticuerpos de cadena simple (ScFv) de diferentes especificidades con un ligador flexible Gly₄Ser. Los ScFv se crean mediante la unión de dominios V_H y V_L de anticuerpos monoclonales parentales mediante un ligador. Cada acoplador de célula T Biespecífica se diseñó con una secuencia de señal de terminal N para la secreción de mamíferos y una etiqueta de afinidad de decahistidina de terminal C para la detección y purificación. Los acopladores de célula T Biespecífica se diseñaron mediante técnicas estándar de clonación de ADN y se insertaron en vectores de expresión de proteínas (Figura 1). El acoplador de célula T Biespecífica a anti-EpCAM es el de la patente WO2005/040220 (SEQ ID NO: 63 en la misma), con una secuencia de señal y una etiqueta de afinidad agregadas. El acoplador de célula T Biespecífica a anti-FAP se creó de novo utilizando el ScFv anti-FAP de la patente WO2010/037835A2 y el ScFv anti-CD3 de la patente WO2005/040220 (SEQ ID NO: 63 en la misma), con una secuencia de señal y una etiqueta de afinidad agregadas. Un acoplador de célula T Biespecífica de control utilizó el ScFv anti-FHA (hemaglutinina filamentosa de Bordetella pertussis) 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 ScFv anti-CD3 de la patente WO 2005040220 (SEQ ID NO: 63 en la misma), con una secuencia de señal y una etiqueta de afinidad agregadas. La codificación del ADN y las secuencias de aminoácidos para estos acopladores de célula T Biespecífica son de la SEQ ID NO: 1-6.

Producción del acoplador de célula T Biespecífica recombinante

Las proteínas recombinantes del acoplador de célula T Biespecífica se produjeron al clonar las secuencias respectivas en el vector pSF-CMV utilizando un promotor de CVM (SEQ ID NO: 31) para impulsar la expresión de proteínas (Figura 1). La concentración de ADN plasmídico para plásmidos, acoplador de células T Biespecífica a pSF-CMV-EpCAM, acoplador de células T Biespecífica a pSF-CMV-FAP y acoplador de células T Biespecífica a pSF-CMV-Control (Tabla 2), se midieron mediante NanoDrop. El vector pSF-CMV vacío se incluye como control negativo. 54.7 μ g de cada uno se diluyeron con 4 ml de OptiMEM. Se diluyeron 109.2 μ g 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 compleja se rellenó hasta 18 ml con OptiMEM y esta mezcla de transfección se agregó a un matraz T175 que contenía células Ad293 con una confluencia del 90 %. Después de la incubación de las células con la mezcla de transfección durante 4 horas a 37 °C, se agregó a las células 5 % de CO₂, 30 ml de medio celular (DMEM alto en glucosa con glutamina, sin fenol rojo) y los matrazes se incubaron a 37 °C, 5 % de CO₂ durante 48 horas. Otro matraz de células se transfectó en paralelo con pSF-CMV-GFP para garantizar una eficiencia de transfección eficiente. Con el fin de cosechar la proteína secretada, se recogió 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 10k unidades de filtro centrífugo Amicon Ultra-15 MWCO (Millipore). Después de centrifugar a 4750 rpm y 4 °C, el volumen del retenido se ajustó con el flujo para obtener una concentración 50 veces mayor. Las alícuotas de proteína concentrada se almacenaron a -80 °C.

Tabla 2

“p” se emplea como un prefijo al nombrar construcciones indica que la construcción es un plásmido.		
ID de plásmido	Secuencia codificante SEQ ID NO:	[ADN de plásmido] ng/ml
Acoplador de célula T Biespecífica a pSF-CMV-EpCAM	SEQ ID NO: 1	3717
Acoplador de célula T Biespecífica a pSF-CMV-FAP	SEQ ID NO: 3	6700
Acoplador de célula T Biespecífica a pSF-CMV-Control	SEQ ID NO: 5	5300
pSF-Lenti-EpCAM	SEQ ID NO: 27	2529.3
pSF-Lenti-FAP	SEQ ID NO: 29	659.6

15 Detección de acoplador de célula T Biespecífica recombinante

Para detectar el acoplador de célula T Biespecífica, la etiqueta de afinidad de decahistidina de terminal C se puede sondear con un anticuerpo anti-His utilizando la técnica de transferencia western. Las muestras de proteínas se ajustaron con tampón de lisis a un volumen final de 15 µl, incluyendo 2.5 µl de 6x de Tampón de Muestra Laemmli SDS 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 prefabricados al 10 % de 15 pocillos (Mini-PROTEAN TGX Precast Gels, BioRad, Reino Unido). Los geles se hicieron funcionar a 180 V durante 45 minutos en 1 X tampón de funcionamiento dentro de un sistema Tetra Mini-PROTEAN (BioRad, Reino Unido). Las proteínas de los geles SDS se transfirieron a membranas de nitrocelulosa mediante electrotransferencia húmeda a 300 mA y 4 °C durante 90 minutos en 1 X tampón 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. A continuación, la membrana de nitrocelulosa se bloqueó con 5 % de leche en PBS-T en un agitador durante 1 hora a temperatura ambiente, y se probó con anticuerpo anti-His (C-term) (ratón α-6xHis, clon 3D5, Invitrogen, UK, #46-0693), diluido 1:5000 en PBS/5 % de leche. Después de la incubación en un agitador durante la noche a 4 °C, la membrana se lavó y sondeó con un anticuerpo policlonal secundario de inmunoglobulina de ratón α marcado con HRP (1:10.000 en PBS/5 % de leche, Dako, #P0161) durante 1 hora a temperatura ambiente. Para la visualización, se aplicó el Sustrato de Larga Duración SuperSignal West Dura (Thermo Fisher Scientific, Reino Unido), siguiendo las instrucciones del fabricante, y se expuso a una película de rayos X y se desarrolló en un procesador automático de película. Los resultados demostraron la expresión y secreción de la proteína del acoplador de célula T Biespecífica de células Ad293 transfectadas con los plásmidos de expresión del acoplador de célula T Biespecífica, pero no con el vector parental.

Cuantificación del acoplador de célula T Biespecífica recombinante

Para medir la cantidad de proteína del acoplador de célula T Biespecífica recombinante, se utilizó la técnica de transferencia de puntos para comparar la señal del acoplador de célula T Biespecífica con un estándar de proteína marcada con His (C-term 10His) (10 x Cathepsina D humana marcada con His, Biolegend, #556704). Se prepararon diluciones en serie dobles de muestras del acoplador de célula T Biespecífica y estándar de proteína, y se aplicaron 1.5 µL de cada una directamente a una membrana de nitrocelulosa y se secaron al aire durante 20 minutos. A continuación, se llevó a cabo el protocolo de bloqueo y tinción descrito anteriormente para la transferencia western. La concentración molar del estándar de proteína se ajustó para representar una concentración de acoplador de célula T Biespecífica de 250 µg/ml. Los resultados (Figura 2A) demostraron la expresión y secreción de la proteína del acoplador de célula T Biespecífica de células Ad293 transfectadas con los plásmidos de expresión del acoplador de célula T Biespecífica.

ELISA de unión a FAP

La actividad de unión a FAP del acoplador de célula T Biespecífica a FAP y acoplador de célula T Biespecífica (anti-FHA) de control (SEQ ID NOs: 4 y 6) secretado por células transfectadas con el acoplador de célula T Biespecífica a pSF-CMV-FAP o el acoplador de célula T Biespecífica a pSF-CMV-Control se evaluó mediante un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). Los sobrenadantes vectoriales pSF-CMV vacíos se incluyeron como control negativo. Las placas ELISA (microplaca de 96 pocillos Nunc Immuno MaxiSorp) se prepararon al recubrir durante la noche a 4 °C con proteína FAP/seprasa humana (100 ng/pocillo, Sino Biological Inc, 10464-H07H-10) en tampón PBS. Las placas se lavaron entre todas las etapas de unión posteriores con PBS 0.05 % de Tween 20. Las placas se bloquearon durante 1 hora a temperatura ambiente con 5 % de BSA en PBS, 0.05 % de Tween 20. Las alícuotas de la proteína del acoplador de célula T Biespecífica, o proteína recogida de pocillos vacíos transfectados con vectores de pSF-CMV, se diluyeron 10 veces en PBS/5 % de BSA/0.05 % de Tween 20. Todas las muestras se agregaron a las placas recubiertas de FAP y se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente. El anticuerpo de detección, anticuerpo anti-His (C-term) (ratón anti-6xHis, clon 3D5, Invitrogen, UK, #46-0693), se diluyó 1:1000 y se aplicó durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, se aplicó HRP conjugado anti-Fc de ratón (1:1000 en PBS/5 % de leche, Dako) durante 1 h a temperatura ambiente antes de que se realizara la detección de HRP con la solución de sustrato HRP 3.3.5.5'-terametilendiamina (TMB, Thermo-Fisher). Se utilizó la solución de parada para terminar la reacción y el color desarrollado se midió a 450 nm en un lector de placas. Se trazó la absorbancia a 450 nm para el acoplador de célula T Biespecífica a FAP, el acoplador de célula T Biespecífica de control y los sobrenadantes de vector vacío, lo que demuestra la unión específica del acoplador de célula T Biespecífica a FAP a la proteína FAP. Los resultados (Figura 2B) muestran la unión específica del acoplador de célula T Biespecífica a FAP y no el acoplador de célula T Biespecífica de control a la proteína FAP recombinante.

ELISA de unión a EpCAM

La actividad de unión a EpCAM del acoplador de célula T Biespecífica a EpCAM y el acoplador de célula T Biespecífica de control (SEQ ID NOs: 2 y 6) secretados por células transfectadas con el acoplador de célula T Biespecífica a pSF-CMV-EpCAM o el acoplador de célula T Biespecífica a pSF-CMV-Control se evaluó mediante un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). Los sobrenadantes vectoriales pSF-CMV vacíos se incluyen como control negativo. Las placas ELISA (una microplaca de 96 pocillos Nunc Immuno MaxiSorp) se prepararon al recubrir durante la noche a 4 °C con proteína humana EpCAM/TROP-1 (50 ng/pocillo, Sino Biological Inc, #10694-H02H-50) en tampón PBS. Las placas se lavaron entre todas las etapas de unión posteriores con PBS 0.05 % de Tween 20. Las placas se bloquearon durante 1 hora a temperatura ambiente con 5 % de BSA en PBS, 0.05 % de Tween 20. Las alícuotas de la proteína del acoplador de célula T Biespecífica, o proteína recogida de pocillos vacíos transfectados con vectores de pSF-CMV, se diluyeron 10 veces en PBS/5 % de BSA/0.05 % de Tween 20. Todas las muestras se agregaron a las placas recubiertas de EpCAM y se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente. El anticuerpo de detección anti-His (C-term) (ratón anti-6xHis, clon 3D5, Invitrogen, UK, #46-0693) se diluyó 1:5000 y se aplicó durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, se aplicó HRP conjugado anti-ratón-Fc (1:1000 en PBS/5 % leche, Dako) durante 1 h a temperatura ambiente antes de que se realizara la detección de HRP con la solución de sustrato HRP 3.3.5.5'-terametilendiamina (TMB, Thermo-Fisher). Se utilizó una solución de parada para terminar la reacción y el color desarrollado se midió a 450 nm en un lector de placas. Se graficó la absorbancia a 450 nm para el acoplador de célula T Biespecífica a EpCAM, el acoplador de célula T Biespecífica de control y los sobrenadantes de vectores vacíos, lo que demuestra la unión específica del acoplador de célula T Biespecífica a EpCAM a la EpCAM recombinante. Los resultados (Figura 2C) muestran la unión específica del acoplador de célula T Biespecífica a EpCAM y no el acoplador de célula T Biespecífica de control a la proteína EpCAM recombinante.

Ejemplo 2

Las actividades funcionales de las proteínas recombinantes del acoplador de célula T Biespecífica se evaluaron en una serie de ensayos diferentes antes de construir el virus EnAd que porta transgenes del acoplador de célula T Biespecífica.

Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC)

Las PBMC humanas se aislaron mediante centrifugación en gradiente de densidad, ya sea a partir de muestras de sangre humana fresca de donantes sanos o de conos de leucocitos de sangre completa, obtenidas del NHS Blood and Transplant UK en Oxford. En cualquier caso, las muestras se diluyeron 1:2 con PBS y 25 ml de esta mezcla se colocaron en capas sobre 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 preservar 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 recogieron 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 suplementado con 10 % de FBS.

Aislamiento de células T positivas a CD3

5

Se extrajeron células T positivas a CD3 (CD3+) de PBMC mediante el agotamiento de células CD3 utilizando un Kit de Aislamiento de Células Pan T (Miltenyi Biotec, #130-096-535), de acuerdo con el protocolo del fabricante.

10 Procesamiento de muestras primarias de ascitis

Se recibieron muestras primarias de ascitis humana de la sala de oncología del Churchill Hospital (Oxford University Hospitals) de pacientes con múltiples indicaciones, que incluyen pero no se limitan a causas el cáncer de ovario, páncreas, mama y gástrico. Una vez recibidas, se separaron las fracciones celulares y de fluidos, y se congelaron alícuotas de fluido a -20 °C para almacenamiento y análisis futuros. La fracción celular se trató con tampón de lisis de glóbulos rojos (Roche, #11814389001) para eliminar los glóbulos rojos, siguiendo las instrucciones del fabricante. Los tipos celulares presentes en cada muestra se determinaron mediante tinción para EpCAM, EGFR, FAP, CD45, CD11b, CD56, CD3, CD4, CD8, PD1 y CTLA4 y se analizaron utilizando citometría de flujo. A continuación, se utilizaron células frescas para la activación ex vivo de células T y experimentos de lisis de células objetivo. En algunos casos, las células se introdujeron en DMEM suplementado con un 10 % de FBS para uso en experimentos posteriores.

Mantenimiento de estirpes celulares

25 Todas las estirpes celulares se mantuvieron en DMEM (Sigma-Aldrich, Reino Unido) o en medio RPMI (Sigma-Aldrich, Reino Unido) como se especifica en la Tabla 3, suplementadas con 10 % (v/v) de suero fetal bovino (FBS, Gibco™) y 1 % (v/v) de penicilina/estreptomicina (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.

30 Las células se dividieron cada 2 o 3 días antes de alcanzar la confluencia por disociación enzimática con tripsina/EDTA (0.05 % de tripsina, 0.02 % de EDTA, Sigma-Aldrich, Reino Unido). En este proceso, se aspiró el medio de cultivo y se lavaron las células 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 un 10 % de FBS y una porción de las células se transfirió a nuevos matraces que contenían medio fresco. Para el cultivo celular de rutina, los medios se suplementaron con un 10 % de FBS, para infecciones y transfecciones de plásmidos de virus con un 2 % de FBS y para transfecciones de plásmidos recombinantes del acoplador de célula T Biespecífica sin suplemento de FBS.

35

Tabla 3

Estirpe celular	Origen de las células	Medios de Cultivo	Fuente
Estirpes celulares derivadas de ascitis	Ascitis primaria humana	DMEM	NHS Blood y Transplant UK
BTC100	Fibroblastos asociados al cáncer de pulmón primario humano (CAF)	DMEM	Universidad de Oxford
CHO-K1	Ovario de hámster chino, adherente	RPMI	ATCC
estirpes celulares estables CHO-K1	Ovario de hámster chino, adherente	RPMI	-
DLD1	Adenocarcinoma colorrectal humano	RPMI	ATCC
HEK 293A	Riñón embrionario humano, adherente	DMEM	ATCC
Estirpes celulares estables de HEK 293A	Riñón embrionario humano, adherente	DMEM	-
HEK 293T	Riñón embrionario humano, adherente	DMEM	ATCC
MCF-7	Humano, glándula mamaria, mama, adherente	DMEM	ATCC

Fibroblastos dérmicos humanos normales (NHDF)	Fibroblastos dérmicos humanos adultos normales primarios	DMEM	ATCC
SKOV3	Adenocarcinoma de ovario humano	DMEM	ATCC

Estadística

En los casos en los que se comparaban dos condiciones, se realizaron análisis estadísticos utilizando una prueba t. En todos los demás casos, los análisis estadísticos se realizaron a utilizar un ANOVA de una vía. Caracterización de la activación de células T humanas mediante un acoplador de célula T Biespecífica a FAP recombinante. Se comparó la capacidad del acoplador de célula T Biespecífica a FAP para inducir la activación de células T en presencia o ausencia de células normales de fibroblastos dérmicos humanos (NHDF). Las células T CD3+ humanas (70,000 células por pocillo en placas de fondo U de 96 pocillos) se cocultivaron solas o con células NHDF (10:1 T:NHDF) en presencia de medios solos o 300 ng/ml de acoplador de célula T Biespecífica a FAP o de control. Las células se cocultivaron durante 24 horas a 37 °C y posteriormente se cosecharon con tampón de disociación celular libre de enzimas (Thermo, #13151014). A continuación, se analizaron los niveles de expresión de CD69 (Figura 3A) y CD25 (Figura 3B) en las células T CD45+ mediante tinción de anticuerpos y citometría de flujo, y se representaron como valores de fluorescencia media geométrica (gMFI). Se utilizó anticuerpo anti-CD3 inmovilizado en placa (7.5 µg/ml) como control positivo para la activación de las células T. El acoplador de célula T Biespecífica a FAP indujo selectivamente la expresión de los marcadores de activación CD69 y CD25 en las células T, lo que indica que fue capaz de activar las células T.

En un segundo experimento similar, las células T se evaluaron mediante tinción de citocinas intracelulares 6 h después del cocultivo con células NHDF (200,000 células CD3+ más 40,000 NHDF en pocillos de una placa de 96 pocillos) y 300 ng/ml de FAP o acoplador de célula T Biespecífica de control. Las células T CD45+ se tiñeron intracelularmente para determinar la expresión de IFN γ y se agregó Brefeldina A al medio de cultivo 5 horas antes de la cosecha. Como control positivo, las células T se estimularon con PMA soluble (10 ng/ml) e ionomicina (1 µg/ml). Los resultados que se muestran en la Figura 4A indican que el acoplador de célula T Biespecífica a FAP en presencia de NHDF dio lugar a un número significativamente mayor de células T que expresan IFN γ en comparación con el acoplador de célula T Biespecífica de control.

Ejemplo 3

Se llevó a cabo un conjunto de experimentos similares a los del ejemplo 2 para caracterizar la proteína recombinante del acoplador de célula T Biespecífica a EpCAM.

Caracterización de la activación de células T humanas mediante un acoplador de célula T Biespecífica a EpCAM recombinante

Se comparó la capacidad del acoplador de célula T Biespecífica a EpCAM para inducir la activación de células T en presencia o ausencia de la estirpe celular DLD positiva para EpCAM. Las células T CD3+ humanas (70,000 células por pocillo en placas de fondo U de 96 pocillos) se cocultivaron solas o con células DLD (10:1 T:DLD) en presencia de medios solos o 600 ng/ml de acoplador de célula T Biespecífica a EpCAM o de control. Las células se cocultivaron durante 24 horas a 37 °C y posteriormente se cosecharon con tampón de disociación celular libre de enzimas. A continuación, se analizaron los niveles de expresión de CD69 y CD25 en las células T CD45+ mediante tinción de anticuerpos y citometría de flujo, y los datos se representaron como valores de fluorescencia media geométrica (gMFI). Se utilizó anticuerpo anti-CD3 inmovilizado en placa (7.5 µg/ml) como control positivo para la activación de las células T. El acoplador de célula T Biespecífica a EpCAM indujo selectivamente la expresión de los marcadores de activación CD69 y CD25 en las células T, lo que indica que era capaz de activar las células T (Figura 4B y C).

En un experimento similar, las células T se evaluaron mediante tinción de citocinas intracelulares 6 horas después del cocultivo con células DLD (200,000 células T CD3+ más 40,000 células DLD por pocillo de una placa de 96 pocillos) y 300 ng/ml de acoplador de célula T Biespecífica a EpCAM o de control. Las células 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 cosecha. Como control positivo, las células T se estimularon con PMA soluble (10 ng/ml) e ionomicina (1 µg/ml). Los resultados mostraron que el acoplador de célula T Biespecífica a EpCAM en presencia de DLD dio lugar a un número significativamente mayor de células T que expresan IFN γ en comparación con el acoplador de célula T Biespecífica de control (Figura 5A).

En otro experimento similar, se utilizaron PBMC de 8 donantes de sangre diferentes para evaluar las variaciones dependientes del donante en la activación de células T mediada por el acoplador de célula T Biespecífica. Las DLD (7,000 células) se cocultivaron con 100,000 PBMC en una placa de 96 pocillos con fondo en U en presencia de medios solos o 300 ng/ml de acoplador de célula T Biespecífica a EpCAM o de control. Las células

se cocultivaron durante 24 horas a 37 °C y posteriormente se cosecharon. A continuación, se analizaron los niveles de expresión de CD69 y CD25 en las células T CD45+ mediante tinción de anticuerpos y citometría de flujo, y los datos se representaron como valores de fluorescencia media geométrica (gMFI). Los resultados mostraron que el acoplador de célula T Biespecífica a EpCAM indujo la expresión de los marcadores de activación CD69 y CD25 en células T CD3+ de los 8 donantes (Figura 5B y C).

Ejemplo 4

En este ejemplo, se evaluó la capacidad de las células T activadas por el acoplador de célula T Biespecífica a FAP recombinante activadas para inducir la muerte de las células objetivo de fibroblastos.

El acoplador de célula T Biespecífica a FAP induce la lisis mediada por células T de estirpes celulares positivas a FAP y células primarias

NHDF (7,000 células) se cocultivaron con 70,000 células T en pocillos de una placa de 96 pocillos de fondo U en presencia de medios solos o 300 ng/ml de acoplador de célula T Biespecífica a FAP o de control. Después de 24 horas de cocultivo, se cosecharon los sobrenadantes y se determinó la citotoxicidad mediante el ensayo LDH siguiendo las instrucciones del fabricante. Los resultados de la Figura 6A muestran que el acoplador de célula T Biespecífica a FAP aumentó significativamente la lisis de las células NHDF.

En un experimento similar, 7,000 células primarias de fibroblastos pulmonares (BTC100) se cocultivaron con 70,000 células T CD3+ con o sin 300 ng/ml del acoplador de célula T Biespecífica a FAP o de control. Después de 24 horas de cocultivo, se cosecharon los sobrenadantes y se determinó la citotoxicidad mediante el ensayo de LDH. Los resultados de la Figura 6B y C muestran que el acoplador de célula T Biespecífica a FAP aumentó significativamente la lisis de las células de fibroblastos asociados al cáncer humano primario (CAF). La expresión de FAP por estas y otras estirpes celulares derivadas del paciente se muestra en la Figura 7.

La relación dosis-respuesta para la lisis celular mediada por el acoplador de célula T Biespecífica a FAP se evaluó mediante el cocultivo de 8,000 células NHDF con 40,000 células T y concentraciones del acoplador de célula T Biespecífica que variaban de 2×10^3 y 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 la célula objetivo. Las curvas de respuesta a la dosis se ajustaron utilizando un modelo de ajuste no lineal de cuatro parámetros integrado en GraphPad Prism, generando un valor de EC50 para el acoplador de célula T Biespecífica a FAP de 3.2 ng/ml. Los resultados (Figura 8A) muestran una relación dependiente de la dosis entre la concentración del acoplador de célula T Biespecífica a FAP y la citotoxicidad medida por el ensayo LDH (mostrado como Abs₄₉₀).

Ejemplo 5

Se evaluaron estudios similares a los del ejemplo 4 para demostrar la capacidad las células T activadas por el acoplador de célula T Biespecífica a EpCAM recombinante para inducir la muerte de las células tumorales objetivo.

El acoplador de célula T Biespecífica a EpCAM induce la lisis mediada por células T de estirpes celulares positivas a EpCAM

Las células tumorales DLD (7,000 células) se cocultivaron con 70,000 células T en pocillos de una placa de 96 pocillos con fondo en U en presencia de medios solos o 300 ng/ml de acoplador de célula T Biespecífica a EpCAM o de control. Después de 24 horas de cocultivo, se cosecharon los sobrenadantes y se determinó la citotoxicidad mediante el ensayo de LDH. Los resultados de la Figura 8B muestran que el acoplador de célula T Biespecífica a EpCAM aumentó significativamente la lisis de las células DLD (la expresión de EpCAM en las células DLD se muestra en la Figura 8C).

En un experimento similar, se cocultivaron 4,000 células SKOV con 40,000 células T CD3+ con o sin 300 ng/ml de acoplador de célula T Biespecífica a EpCAM o de control. Después de 24 horas de cocultivo, se cosecharon los sobrenadantes y se determinó la citotoxicidad mediante el ensayo de LDH. Los resultados de la Figura 9A muestran que el acoplador de célula T Biespecífica a EpCAM aumentó significativamente la lisis de las células SKOV.

En otro experimento similar, 5,000 células MCF7 fueron cocultivadas con 50,000 células T CD3+ con o sin 300 ng/ml de acoplador de célula T Biespecífica a EpCAM o de control. Después de 24 horas de cocultivo, se cosecharon los sobrenadantes y se determinó la citotoxicidad mediante el ensayo de LDH. Los resultados de la Figura 9B muestran que el acoplador de célula T Biespecífica a EpCAM también aumentó significativamente la lisis de las células MCF7.

La relación dosis-respuesta para la lisis celular mediada por el acoplador de célula T Biespecífica a EpCAM se evaluó mediante el cocultivo de 8,000 DLD con 40,000 células T y concentraciones del acoplador de célula T

Biespecífica a EpCAM o de control que variaron de 2×10^3 y 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 la célula objetivo. Las curvas de respuesta a la dosis se ajustaron utilizando un modelo de ajuste no lineal de cuatro parámetros integrado en GraphPad Prism, generando un valor de EC50 para el acoplador de célula T Biespecífica a EpCAM de 7.4 ng/ml. Los resultados de la Figura 10 muestran una relación dependiente de la dosis entre la concentración del acoplador de célula T Biespecífica a EpCAM y la citotoxicidad.

En conclusión, los resultados de este ejemplo demuestran que el acoplador de célula T Biespecífica a EpCAM fue capaz de inducir la lisis mediada por células T de múltiples estirpes de células tumorales positivas a EpCAM.

Ejemplo 6

Se generaron estirpes celulares CHO y Ad293 que expresan FAP estables como un medio para demostrar la especificidad del antígeno FAP del acoplador de célula T Biespecífica a FAP mediante la comparación con células parentales no transfectadas.

Generación de estirpes celulares transfectadas estables que expresan FAP

La secuencia de proteína del gen FAP se obtuvo de la base de datos del NCBI (SEQ ID 30), transcrita inversamente 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, produciendo el vector pSF-Lenti-FAP. Las células HEK293T se transfectaron con el vector de expresión de FAP del lentivirus junto con pSF-CMV-HIV-Gag-Pol, pSF-CMV-VSV-G, pSF-CMV-HIV-Rev. Se utilizó Lipofectamine 2000 como reactivo de transfección y se agregó al ADN del vector en una relación de ADN:lipofectamina de 1:2, y se incubó con las células a 37°C . El sobrenadante que contenía lentivirus se recogió 48 horas después y se mezcló con policereno (concentración final, 8 $\mu\text{g/ml}$). La mezcla de lentivirus/polibreno se agregó a las células Ad293 o CHO sembradas y se incubó a 37°C . El día 4, el sobrenadante se cambió por medios que contenían puomicina (2 $\mu\text{g/ml}$ para Ad293 y 7.5 $\mu\text{g/ml}$ para CHO). A continuación, se seleccionaron clonalmente las variantes estables y se determinó la expresión de FAP de las estirpes celulares parentales o de la variante transfectada estable mediante tinción con FAP o anticuerpo de control de isótopos y se analizó utilizando citometría de flujo (Figura 11A).

La lisis de células objetivo mediada por el acoplador de célula T Biespecífica a FAP es específica para las células que expresan FAP

Las células CHO o CHO-FAP (7,000 células) se cocultivaron solas o con células T humanas (70,000) en presencia de medios solos o de control de 2 $\mu\text{g/ml}$ o acoplador de célula T Biespecífica a FAP en pocillos de una placa de 96 pocillos con fondo en U. Después de 24 horas de incubación, se cosecharon los sobrenadantes y se midió la citotoxicidad de la célula objetivo mediante el ensayo de citotoxicidad de LDH como se describe en el ejemplo 4 (Figura 11B). La activación de las células T también se determinó mediante el análisis de los niveles de expresión de CD69 y CD25 utilizando citometría de flujo (Figura 12). La citotoxicidad solo se observó cuando las células CHO-FAP se cultivaron con células T y acoplador de célula T Biespecífica a FAP. Esto indica que la activación de las células T y la lisis de las células objetivo mediadas por el acoplador de célula T Biespecífica a FAP son altamente específicas y se limitan a las células que expresan FAP, y no a la estirpe de células parentales FAP negativas.

Ejemplo 7

Se generaron estirpes celulares estables de EpCAM que expresan CHO y Ad293 como un medio para demostrar la especificidad del antígeno de EpCAM del acoplador de célula T Biespecífica a EpCAM mediante la comparación con células parentales no transfectadas.

Generación de estirpes celulares transfectadas estables que expresan EpCAM

La secuencia de proteínas del gen EpCAM se obtuvo de la base de datos del NCBI (SEQ ID 28), transcrita inversamente para generar una secuencia codificante de ADN que fue sintetizada por Oxford Genetics Ltd (Oxford, Reino Unido). El gen EpCAM se clonó en el vector pSF-Lenti mediante técnicas de clonación estándar que produjeron el vector pSF-Lenti-EpCAM. Las células HEK293T se transfectaron con el vector de expresión de lentivirus EpCAM junto con pSF-CMV-HIV-Gag-Pol, pSF-CMV-VSV-G, pSFCMV-HIV-Rev. Se utilizó Lipofectamine 2000 como reactivo de transfección y se agregó al ADN del vector en una relación de ADN:lipofectamina de 1:2, y se incubó con las células a 37°C . El sobrenadante que contenía lentivirus se recogió 48 horas después y se mezcló con policereno (concentración final, 8 $\mu\text{g/ml}$). La mezcla de lentivirus/polibreno se agregó a las células Ad293 o CHO sembradas y se incubó a 37°C . El día 4, el sobrenadante se cambió por medios que contenían puomicina (2 $\mu\text{g/ml}$ para Ad293 y 7.5 $\mu\text{g/ml}$ para CHO). A continuación, se seleccionaron clonalmente las variantes estables y se determinó la expresión de EpCAM de

las estirpes celulares parentales o de la variante transfectada estable mediante tinción con EpCAM o anticuerpo de control de isótopos y se analizó utilizando citometría de flujo (Figura 13A).

La lisis de células objetivo mediada por el acoplador de célula T Biespecífica a EpCAM es específica de las células que expresan EpCAM

Las células CHO o CHO-EpCAM (7,000 células) se cocultivaron solas o con células T humanas (70,000) en presencia de medios solos o de control de 2 µg/ml o acoplador de célula T Biespecífica a EpCAM en pocillos de una placa de 96 pocillos con fondo en U. Después de 24 horas de incubación, se cosecharon los sobrenadantes y se midió la citotoxicidad de la célula objetivo mediante un ensayo de citotoxicidad de LDH (Figura 13B). La activación de las células T también se determinó mediante el análisis de los niveles de expresión de CD69 y CD25 utilizando citometría de flujo (Figura 14). La citotoxicidad solo se observó cuando las células CHO-EpCAM se cultivaron con células T y acoplador de célula T Biespecífica a EpCAM. Esto indica que la activación de las células T y la lisis de las células objetivo mediadas por el acoplador de célula T Biespecífica a EpCAM son altamente específicas y se limitan a las células que expresan EpCAM, y no a la estirpe de células parentales negativas a EpCAM.

Ejemplo 8

En un experimento adicional, se evaluó la capacidad de la proteína recombinante del acoplador de célula T Biespecífica a FAP para activar las células T CD4 o CD8 y la capacidad de cada uno de estos subconjuntos de células T para lisar células NHDF. Las células T CD3+ (35,000) se cocultivaron con 7,000 células NHDF en presencia de un grupo de control de 300 ng/ml o acoplador de célula T Biespecífica a FAP en pocillos de una placa de 96 pocillos con fondo en U, y se incubaron a 37 °C durante 24 horas. Las células se cosecharon y se tiñeron con anticuerpos contra CD4 o CD8 y CD69 y CD25, y se analizaron utilizando citometría de flujo. Los resultados (Figura 15A) demostraron que el acoplador de célula T Biespecífica a FAP indujo un aumento en los marcadores de activación CD69 y CD25 en las células T CD4+ y CD8+.

En un experimento similar, se evaluó la capacidad de cada subconjunto de células T (CD4 y CD8) para destruir células objetivo. Las células T CD4+ se extrajeron de células purificadas con CD3 por selección positiva utilizando un Kit de Aislamiento de Células T CD4 (Miltenyi Biotec, #130-045-101), de acuerdo con el protocolo del fabricante, con las células CD8 dentro de un flujo no aislado. En pocillos de una placa de 96 pocillos con fondo en U, se cocultivaron 7,000 NHDF con 35,000 células T CD4+ o CD8+ junto con 300 ng/ml del acoplador de célula T Biespecífica a FAP o de control y se incubaron a 37 °C. Después de 24 horas, se cosecharon los sobrenadantes y se midió la citotoxicidad de la célula objetivo mediante el ensayo de citotoxicidad de LDH. Los resultados (Figura 15B) muestran que el acoplador de célula T Biespecífica a FAP indujo a las células T CD4+ y CD8+ a destruir las células NHDF.

Ejemplo 9

Se evaluó la capacidad del acoplador de célula T Biespecífica a EpCAM para activar células T CD4+ o CD8+ y la capacidad de cada subconjunto para lisar células tumorales DLD. Las células T CD3+ (35,000) se cocultivaron con 7,000 células DLD en presencia de un grupo de control de 300 ng/ml o un acoplador de célula T Biespecífica a EpCAM en pocillos de una placa de 96 pocillos con fondo en U, y se incubaron a 37 °C durante 24 horas. Las células se cosecharon y se tiñeron con anticuerpos para CD4 o CD8 y CD69 y CD25, y se analizaron utilizando citometría de flujo. Los resultados (Figura 16A) demostraron que el acoplador de célula T Biespecífica a EpCAM indujo un aumento de los marcadores de activación CD69 y CD25 en las células T CD4+ y CD8+.

En un experimento similar, se evaluó la capacidad de cada subconjunto de células T (CD4 y CD8) para destruir células objetivo. Las células T CD4+ se extrajeron de las células purificadas con CD3 mediante selección positiva utilizando el Kit de Aislamiento de Células T CD4 de acuerdo con el protocolo del fabricante, con las células CD8 dentro de un flujo continuo no seleccionado. En pocillos de una placa de 96 pocillos con fondo en U, se cocultivaron 7,000 DLD con 35,000 células T CD4+ o CD8+ con 300 ng/ml de acoplador de célula T Biespecífica a EpCAM o de control y se incubaron a 37 °C. Después de 24 horas, se cosecharon los sobrenadantes y se midió la citotoxicidad de la célula objetivo mediante un ensayo de citotoxicidad de LDH (Figura 16B). Los resultados muestran que el acoplador de célula T Biespecífica a EpCAM indujo a las células T CD4+ y CD8+ a destruir las células DLD.

Ejemplo 10:

Caracterización de la activación mediada por el acoplador de célula T Biespecífica a FAB de linfocitos autólogos asociados a tumores de ascitis maligna primaria

Para evaluar la actividad de las proteínas del acoplador de célula T Biespecífica utilizando células derivadas de pacientes con cáncer, se obtuvieron muestras de fluidos ascéticos malignos primarios que contenían células

T CD3+ y células FAP+ para prueba. Las células de ascitis no purificadas (por lo tanto, sin cambios desde que se recibieron) se sembraron a 250,000 células por pocillo de una placa de 96 pocillos con fondo en U en 100 % de fluido o medio de ascitis suplementado con 1 % de suero humano en presencia de un grupo de control de 500 ng/ml o un acoplador de célula T Biespecífica a FAP. Los pocillos sin tratar sirvieron como controles negativos. Después de la incubación a 37 °C durante 5 días, se recogió la población total de células y se determinaron el número de células T CD3+ (Figura 17A) y los niveles de expresión de CD25 en las células T CD3+ (Figura 17B). El número total de células por pocillo se determinó utilizando perlas de conteo de precisión. Los resultados demuestran que el acoplador de célula T Biespecífica a FAP dio lugar a un aumento significativo en la activación de las células T asociadas al tumor de los pacientes con cáncer.

Como una extensión del experimento anterior, se cosecharon pocillos replicados y se determinó el número de células FAP + utilizando citometría de flujo (Figura 17C). El número total de células por pocillo se determinó utilizando perlas de conteo de precisión. Los resultados muestran que el acoplador de célula T Biespecífica a FAP resultó en una disminución significativa en el número de células autólogas que expresan FAP en la muestra de ascitis.

Ejemplo 11

Los virus EnAd biespecíficos recombinantes que expresan células T se diseñaron por ingeniería, produjeron y purificaron utilizando los métodos que se describen a continuación.

Generación de Enadenotucirev biespecífico que expresa el acoplador de célula T Biespecífica

EnAd es un adenovirus del grupo quimérico B competente para la replicación que contiene frecuentes sustituciones de nucleótidos no homólogos de Ad3 por Ad11p en la región E2B, una supresión E3 casi completa y una supresión E4 más pequeña mapeada a 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). En la Figura 18A se muestra una representación esquemática del genoma de los adenovirus utilizados en este estudio.

El plásmido pEnAd2.4 se utilizó para generar los plásmidos acoplador de célula T Biespecífica a pEnAd2.4-CMV-EpCAM, acoplador de célula T Biespecífica a pEnAd2.4-SA-EpCAM, acoplador de célula T Biespecífica a pEnAd2.4-CMV-FAP, acoplador de célula T Biespecífica a pEnAd2.4-SA-FAP, acoplador de célula T Biespecífica a pEnAd2.4-CMV-Control, acoplador de célula T Biespecífica a pEnAd2.4-SA-Control (Tabla 4) mediante la inserción directa de un casete que codifica el acoplador de célula T Biespecífica a EpCAM (SEQ ID NO: 1), acoplador de célula T Biespecífica a FAP (SEQ ID NO: 3) o acoplador de célula T Biespecífica de control (SEQ ID NO: 5). El casete de transgén contenía una secuencia aceptora de empalme corta de 5' (SEQ ID NO: 33) o un promotor de CVM exógeno (SEQ ID NO: 31), la secuencia de ADNc del acoplador de célula T Biespecífica a EpCAM, FAP o de control y una secuencia de poliadenilación 3' (SEQ ID NO: 32). La construcción del plásmido se confirmó mediante secuenciación de ADN. El promotor de CVM exógeno es constitutivamente activo y, por lo tanto, conduce a la expresión temprana de transgenes. La secuencia del aceptor de empalme impulsa la expresión bajo el control del principal promotor tardío viral y conduce a una expresión transgénica posterior tras el inicio de la replicación del genoma del virus. La cinética de esta expresión impulsada por el promotor se puede observar en la Figura 18B, en la que se utilizó GFP como transgén.

Tabla 4

ID del plásmido	[ADN del plásmido] ng/ml
Acoplador de célula T Biespecífica a pEnAd2.4-CMV-EpCAM	205.3
Acoplador de célula T Biespecífica a pEnAd2.4-SA-EpCAM	325.2
Acoplador de célula T Biespecífica a pEnAd2.4-CMV-FAP	1322.8
Acoplador de célula T Biespecífica a pEnAd2.4-SA-FAP	3918.3
Acoplador de célula T Biespecífica a pEnAd2.4-CMV-Control	189.1
Acoplador de célula T Biespecífica a pEnAd2.4-SA-Control	236.2
Acoplador de célula T Biespecífica a pEnAd2.4-CMV-FAP-RFP	1599
Acoplador de célula T Biespecífica a pEnAd2.4-SA-FAP-RFP	1872
Acoplador de célula T Biespecífica a pEnAd2.4-CMV-Control-RFP	1294
Acoplador de célula T Biespecífica a pEnAd2.4-SA-Control-RFP	2082

Producción y caracterización de virus

Los plásmidos acoplador de célula T Biespecífica a EnAd2.4-CMV-EpCAM, acoplador de célula T Biespecífica a pEnAd2.4-SA-EpCAM, acoplador de célula T Biespecífica a pEnAd2.4-CMV-FAP, acoplador de célula T Biespecífica a pEnAd2.4-SA-FAP, acoplador de célula T Biespecífica a pEnAd2.4-CMV-Control, acoplador de célula T Biespecífica a pEnAd2.4-SA-Control se linealizaron mediante digestión de restricción con la enzima AclI para producir el genoma del virus de revestimiento. El ADN digerido se purificó mediante extracción de isopropanol y se precipitó durante 16 h, a -20°C en 300 μl de etanol $>95\%$ de grado de biología molecular y 10 μl de acetato de sodio 3M. El ADN precipitado se sedimentó por centrifugación a 14000 rpm, 5 min y se lavó en 500 μl de etanol al 70 %, antes de centrifugar nuevamente, 14000 rpm, 5 min. El sedimento de ADN limpio se secó al aire y se resuspendió 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 min, RT. A continuación, la mezcla de transfección se agregó a un matraz T-25 que contenía células Ad293 cultivadas hasta un 80 % de confluencia. Después de la incubación de las células con la mezcla de transfección durante 4 h a 37°C , se agregaron 4 ml de 5 % de CO_2 de medio celular (DMEM glucosa alta con glutamina suplementada con 10 % de FBS) a las células y los matraces se incubaron a 37°C , 5 % de CO_2 . Las células Ad293 transfectadas se monitorizaron cada 24 horas y se suplementaron con medios adicionales cada 48-72 horas. La producción del virus se monitorizó mediante la observación de un efecto citopático significativo (CPE) en la monocapa celular. Una vez que se observó un CPE extenso, el virus se recogió de las células Ad293 mediante tres ciclos de congelación y descongelación. Los clones de un solo virus se seleccionaron al diluir en serie el lisado recogido y reinfectar las células Ad293, y cosechar pocillos que contenían placas individuales. Las infecciones en serie de las células Ad293 se realizaron una vez que la infección había alcanzado el CPE completo con el fin de amplificar las existencias de virus. La producción viable del virus durante la amplificación se confirmó mediante la observación de CPE significativo en la monocapa celular.

Purificación de virus

Una vez que se amplificaron las potentes existencias de virus, los virus se purificaron mediante centrifugación de doble gradiente de densidad de cloruro de cesio (bandas) para producir las existencias de virus NG-601, NG-602, NG-603, NG-604, NG-605 y NG-606. Estas existencias se valoraron mediante el ensayo micoBCA (Life Technologies), siguiendo las instrucciones del fabricante (Tabla 5).

Tabla 5

ID de EnAd	ID de NG NO:	Genoma del virus SEQ ID	vp/ml	TCID ₅₀ / ml
Acoplador de célula T Biespecífica a EnAd-CMV-EpCAM	NG- 601	SEQ ID NO: 34	2.2494×10^{12}	1.26×10^{11}
Acoplador de célula T Biespecífica a EnAd-SA-EpCAM	NG- 602	SEQ ID NO: 35	4.21746×10^{12}	1.58×10^{11}
Acoplador de célula T Biespecífica a EnAd-CMV-Control	NG- 603		1.42607×10^{12}	5.01×10^{10}
Acoplador de célula T Biespecífica a EnAd-SA-Control	NG- 604		3.31073×10^{12}	2.00×10^{11}
Acoplador de célula T Biespecífica a EnAd-CMV-FAP	NG- 605	SEQ ID NO: 36	1.64653×10^{12}	1.58×10^{11}
Acoplador de célula T Biespecífica a EnAd-SA-FAP	NG- 606	SEQ ID NO: 37	1.28148×10^{12}	3.98×10^{10}
Acoplador de célula T Biespecífica a EnAd-CMV-Control - P2A-RFP	NG- 607		5.963×10^{12}	1.26×10^9

Acoplador de célula T Biespecífica a EnAd-SA-Control -P2A-RFP	NG- 608		1.51848×10^{12}	6.31×10^9
Acoplador de célula T Biespecífica a EnAd-CMV-FAP-P2A-RFP	NG- 609		1.57517×10^{12}	7.94×10^9
Acoplador de célula T Biespecífica a EnAd-SA-FAP-P2A-RFP	NG- 610		7.74881×10^{11}	5.01×10^{10}

Ejemplo 12

- 5 Las actividades de los virus NG-601, NG-602, NG-603, NG-604, NG-605 y NG-606 se caracterizaron utilizando los métodos que se describen a continuación.

Caracterización de la actividad de EnAd que codifica el acoplador de célula T Biespecífica en comparación con EnAd en estirpes celulares de carcinoma

10

15

20

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. Las células A549 se sembraron en pocillos de una placa de 24 pocillos a una densidad de células de 2×10^5 células/pocillo. Las placas se incubaron durante 18 horas, a 37°C , 5 % de CO_2 , antes de que las células se infectaran con 100 partículas de virus por célula (ppc) o se dejaran sin infectar. Los pocillos se cosecharon 24, 48 o 72 horas después de la infección y el ADN se purificó utilizando el mini kit de ADN genómico PureLink (Invitrogen) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Los genomas virales totales se cuantificaron por qPCR con cada muestra extraída o estándar utilizando un conjunto de cebadores-sonda específicos del gen hexón EnAd en la mezcla de reacción detallada en la Tabla 6. La qPCR se realizó según el programa de la Tabla 7.

Tabla 6

Reactivo	Volumen/pocillo (μl)
2 X 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 pocillo	20

Tabla 7

No. Ciclos	Temperatura ($^\circ\text{C}$)	Duración (segs)
1	95	120
40	95	5
	60-65	20-30

25

La cuantificación del número de genomas de virus detectados por célula demostró que la replicación del virus NG-601, NG-602, NG-603, NG-604, NG-605, NG-606 y EnAd era comparable en la estirpe celular A549 (Figura 19A).

30

35

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 19B). Las células A549 se sembraron en una placa de 96 pocillos con una densidad celular de 1.5×10^4 células/pocillo. Las placas se incubaron durante 18 horas, a 37°C , 5 % de CO_2 , antes de que las células se infectaran con ppc crecientes del virus (dilución en serie 5 veces, 4.1×10^{-7} a 5000 ppc del virus) o se dejaran sin infectar. La citotoxicidad de A549 se midió el día 5 mediante el Ensayo de Proliferación Celular de Una Solución Acuosa (MTS) CellTiter 96® (Promega, # G3582). Las curvas de dosis-respuesta se ajustaron utilizando un modelo de ajuste no lineal de cuatro parámetros integrado en GraphPad Prism. Los

valores de 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 eran comparables para cada virus.

Confirmación de la expresión funcional del transgén del acoplador de célula T Biespecífica de NG-601, NG-602, NG-603, NG-604, NG-605, NG-606

Para determinar si los virus NG-601, NG-602, NG-605, NG-606 produjeron acopladores funcionales de célula T Biespecífica, se realizaron ensayos de activación de células T utilizando estirpes celulares CHO, CHO-EpCAM y CHO-FAP como células objetivo. Se cocultivaron 10,000 células objetivo con 50,000 células T CD3+ en pocillos de una placa de 96 pocillos con fondo en U con sobrenadantes virales Ad293 diluidos 100 veces en medio de cultivo y se incubaron durante 24 h, a 37 °C, 5 % de CO₂. Las células T se cosecharon y se tiñeron con anticuerpos específicos para CD25 y CD69 y se analizaron utilizando citometría de flujo. Los resultados (Figuras 20A y 20B) indicaron que los virus NG-601 y NG-602 expresaron un transgén acoplador de célula T Biespecífica funcional que activó las células T cuando se cocultivaron con células CHO-EpCAM, y NG-605 y NG-606 expresaron un transgén acoplador de célula T Biespecífica funcionales que activó las células T cuando se cocultivaron con células CHO-FAP, pero no cuando se cocultivaron con células CHO-FAP.

Cuantificación de la expresión del acoplador de célula T Biespecífica en una estirpe celular de carcinoma de colon

Se evaluó la cantidad de expresión de un acoplador de célula T Biespecífica por la infección NG-601, NG-602, NG-605, NG-606 de la estirpe celular de carcinoma de colon humano DLD. Las células DLD se sembraron en placas de cultivo de 6 pocillos a una densidad de 1.2×10^6 células por pocillo. 18 horas después de 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 recogieran de los pocillos y se centrifugaran durante 5 minutos, 1200 rpm para eliminar los restos celulares. A continuación, los sobrenadantes clarificados se utilizaron para un ensayo de destrucción, con citotoxicidad en comparación con una curva estándar generada con un acoplador de célula T Biespecífica recombinante de concentración conocida, lo que permitió determinar la cantidad de acoplador de célula T Biespecífica en los sobrenadantes virales.

Para determinar la cantidad de acoplador de célula T Biespecífica a FAP producido 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 células T CD3+ y sobrenadantes virales DLD diluidos 1 en 10^3 , 1 en 10^4 y 1 en 10^5 . Se generó una curva estándar al incubar células T NHDF y CD3+ con acoplador de célula T Biespecífica a FAB o de control a diluciones seriadas 10 veces mayores de 3333 a 3.33×10^{-4} ng/μl. Los sobrenadantes se cosecharon 24 horas después del tratamiento y la citotoxicidad se midió mediante el ensayo LDH. La cantidad de acoplador de célula T Biespecífica expresada se determinó al comparar la citotoxicidad de los sobrenadantes virales con la de la curva estándar del acoplador de célula T Biespecífica recombinante. Los resultados (Figura 21) indicaron que los virus NG-605 y NG-606 produjeron 9.8 y 49.2 μg de acoplador de célula T Biespecífica a FAP por millón de células DLD, respectivamente.

Para determinar la cantidad de acoplador de célula T Biespecífica a EpCAM producida a partir de NG-601 y NG-602, se realizó un ensayo de citotoxicidad en el que se cocultivaron 8,000 células DLD con 40,000 células T CD3+ y sobrenadantes virales DLD diluidos 1 en 10^3 , 1 en 10^4 y 1 en 10^5 . Se generó una curva estándar al incubar células T DLD y CD3+ con un acoplador de célula T Biespecífica a EpCAM o de control a diluciones seriadas de 10 veces de 3333 a 3.33×10^{-4} ng/μl. Los sobrenadantes se cosecharon 24 horas después del tratamiento y la citotoxicidad se midió mediante el ensayo LDH (Figura 22). La cantidad de acoplador de célula T Biespecífica expresada se determinó al comparar la citotoxicidad de los sobrenadantes virales con la de la curva estándar del acoplador de célula T Biespecífica recombinante. Los resultados indicaron que los virus NG-601 y NG-602 produjeron 165 y 50.3 μg de acoplador de célula T Biespecífica a EpCAM por millón de células DLD, respectivamente.

Ejemplo 13

Además de codificar un acoplador de célula T Biespecífica a FAP o de control, los virus NG-607, NG-608, NG-609, NG-610 también portan un transgén de proteína fluorescente roja (RFP) para la visualización de células infectadas utilizando métodos de microscopía fluorescente (SEQ ID NOS: 25 y 26, Tabla 4). Las actividades funcionales de estos virus se caracterizaron utilizando los métodos que se describen a continuación.

Confirmación de la expresión de transgenes de NG-607, NG-608, NG-609, NG-610

La capacidad de los virus NG-607, NG-608, NG-609 y NG-610 para producir su transgén de acoplador de célula T Biespecífica se evaluó mediante la infección de células Ad293. Las células Ad293 se sembraron en una placa de 6 pocillos a 1×10^6 células/pocillo. Las placas se incubaron durante 24 horas, a 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 después de la

infección, las placas se irradiaron con una lámpara fluorescente de mercurio y se fotografiaron (Figura 23). Los resultados sugirieron que los virus NG-607, NG-608, NG-609 y NG-610 expresan el transgén RFP.

Ejemplo 14

En la siguiente serie de experimentos, se evaluó la capacidad de los virus de NG-603, NG-604, NG-605, NG-606, NG-607, NG-608, NG-609, NG-610 del acoplador de célula T Biespecífica a EnAd y FAB o de control para destruir células objetivo, que incluyen las células tumorales y fibroblastos.

En el primer estudio, se evaluó la capacidad de EnAd para destruir células DLD utilizando la tecnología xCELLigence. Las células DLD se sembraron en una placa E de 48 pocillos a 1.2×10^4 células/pocillo y se incubaron durante 18 h, a 37 °C, 5 % de CO₂, antes de que las células se infectaran con 100 ppc de EnAd o se dejaran sin infectar. xCELLigence se utilizó para medir la citotoxicidad de la célula objetivo cada 15 minutos durante un período de incubación de 8 días. Los resultados (Figura 24A) sugieren que EnAd fue capaz de destruir las células DLD de manera efectiva durante el período de tiempo. En un experimento similar, se evaluó la capacidad de EnAd para destruir las células SKOV utilizando la tecnología xCELLigence. Las células SKOV se sembraron en una placa E de 48 pocillos a 1×10^4 células/pocillo y se incubaron durante 18 horas, a 37 °C, 5 % de CO₂, antes de que las células se infectaran con 100 ppc de EnAd o se dejaran sin infectar. xCELLigence se utilizó para medir la citotoxicidad de las células objetivo cada 15 minutos durante un período de 8 días. Los resultados (Figura 24B) sugieren que las células SKOV son resistentes a la citotoxicidad mediada por EnAd durante este período de tiempo.

En un experimento similar, también se evaluó la capacidad de EnAd para destruir las células NHDF utilizando la tecnología xCELLigence. Las células NHDF se sembraron en una placa E de 48 pocillos a 4×10^3 células/pocillo y se incubaron durante 18 h, a 37 °C, 5 % de CO₂, antes de que las células se infectaran con 100 ppc de EnAd o se dejaran sin infectar. xCELLigence se utilizó para medir la citotoxicidad de la célula objetivo cada 15 minutos durante el mismo período de tiempo que para las células A549 y SKOV. Los resultados (Figura 24C) sugieren que EnAd es incapaz de destruir las células NHDF en el período de tiempo observado.

En un experimento similar, se evaluó la capacidad de NG-603, NG-604, NG-605, NG-606 y EnAd para destruir células NHDF en cocultivo con células tumorales SKOV y células T CD3+ utilizando xCELLigence. Las células NHDF y las células SKOV se sembraron en una placa E de 48 pocillos a 4×10^3 y 1×10^3 células/pocillo, respectivamente. Las placas se incubaron durante 18 h, a 37 °C, 5 % de CO₂, antes de que las células se infectaran con 100 ppc de EnAd, de NG-603, NG-604, NG-605 o NG-606 o se dejaran sin infectar. Después de 2 horas de incubación, se agregaron 37,500 células T CD3+ a cada pocillo. Se utilizó xCELLigence para medir la citotoxicidad de la célula objetivo cada 15 minutos. Los resultados (Figura 25A) demuestran que los virus NG-605 y NG606 que expresan el acoplador de célula T Biespecífica a FAP, pero no EnAd ni los virus NG-603 y NG-604 que expresan el acoplador de célula T Biespecífica de control, fueron capaces de inducir la lisis de las células NHDF, con una cinética dependiente del promotor utilizado para la expresión del acoplador de célula T Biespecífica (más rápido con el promotor CMV).

En un experimento similar, se evaluó la capacidad de NG-603, NG-604, NG-605, NG-606 y EnAd para destruir células NHDF, en cocultivo con SKOV y células T CD3+ utilizando el ensayo de citotoxicidad de LDH. Las células NHDF y SKOV se sembraron en una placa inferior en U de 96 pocillos a 8×10^3 y 2×10^3 células/pocillo, respectivamente, y se infectaron con 100 ppc de EnAd, de NG-603, NG-604, NG-605 o NG-606 o se dejaron sin infectar. Después de 2 horas de incubación, se agregaron 75,000 células T CD3+ a cada pocillo y se incubaron placas a 37 °C, 5 % de CO₂. Los sobrenadantes se cosecharon a las 0, 24, 48 y 96 horas después del tratamiento y la citotoxicidad se midió mediante el ensayo de citotoxicidad de LDH. Los resultados (Figura 25B) demuestran que los virus NG-605 y NG606 que expresan el acoplador de célula T Biespecífica a FAP, pero no EnAd ni los virus NG-603 y NG-604 que expresan el acoplador de célula T Biespecífica de control, fueron capaces de inducir la lisis de las células NHDF, con una cinética dependiente del promotor utilizado para la expresión del acoplador de célula T Biespecífica.

Como una extensión del experimento de LDH anterior, las células también se cosecharon a las 0, 24, 48 y 96 horas después del tratamiento, se tiñeron con anticuerpos para CD45, CD69 y CD25 y se analizaron utilizando citometría de flujo. Los resultados (Figura 26) demuestran que los virus NG-605 y NG-606 que expresan el acoplador de célula T Biespecífica a FAP, pero no EnAd ni los virus NG-603 y NG-604 que expresan el acoplador de célula T Biespecífica de control, fueron capaces de inducir la activación de las células T, con una cinética dependiente del promotor utilizado para la expresión del acoplador de célula T Biespecífica.

En un experimento similar, se evaluó la dependencia de FAP para inducir la activación de células T mediadas por el acoplador de célula T Biespecífica a FAP. En una placa de fondo en U de 96 pocillos, las células SKOV se sembraron en 2×10^3 células/pocillo solas o en combinación con células NHDF en 8×10^3 células/pocillo. Se agregaron partículas virales a cada pocillo a 100 ppc, y las placas se incubaron a 37 °C, 5 % de CO₂. Después de dos horas, se agregaron 75,000 células T CD3+ y se incubaron las placas adicionalmente. A las 96 horas después de la infección, se cosecharon células y se tiñeron para CD45 y CD25 y se analizaron

utilizando citometría de flujo (Figura 27A). Los resultados demuestran que los virus NG-605 y NG-606 que expresan el acoplador de célula T Biespecífica a FAP solo indujeron la activación de las células T en presencia de células NHDF positivas a FAP.

En un experimento similar, se investigó más a fondo la especificidad de la expresión del acoplador de célula T Biespecífica impulsada por el promotor (CMV o virus MLP/SA) en NG-605 y NG-606. En una placa de fondo en U de 96 pocillos, las células NHDF se sembraron a 4×10^3 células/pocillo. Se agregaron 100 partículas virales por célula a cada pocillo y se incubaron placas a 37 °C, 5 % de CO₂. Después de dos horas, se agregaron 40,000 células CD3 y se incubaron más placas. A las 72 horas después de la infección, se cosecharon los sobrenadantes y se midió la citotoxicidad mediante el ensayo de citotoxicidad de LDH. Los resultados (Figura 27B) demuestran que el virus NG-605 impulsado por CMV, pero no el NG-606 impulsado por SA, fue capaz de mediar la destrucción de las células NHDF tras la infección de las células NHDF solas. Los resultados indican que NG-605 y NG-606 fueron capaces de inducir la activación de las células T y la lisis de las células objetivo, aunque el perfil cinético fue ligeramente diferente dependiendo el promotor utilizado. Se obtuvieron videos de lapso de tiempo para observar la lisis viral o mediada por células T de las células objetivo mediante un acoplador de célula T Biespecífica a FAP recombinante, EnAd, NG-603 o NG-605. Las células NHDF se tiñeron con Tinte CMTMR Naranja CellTracker (Life Tech, #C2927) y las células T CD3+ se tiñeron con Kit de Proliferación Celular Violeta CellTrace (Life Tech, #C34557) siguiendo los protocolos del fabricante. Los NHDF teñidos se sembraron en una placa de 24 pocillos a 7.5×10^3 células/pocillo en cocultivo con 1.35×10^4 células tumorales DLD o SKOV. Las placas se incubaron durante 18 horas, a 37 °C, 5 % de CO₂. A continuación, las células se trataron con 300 ng/ml de acoplador de célula T Biespecífica 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 células T CD3+ teñidas a los pocillos necesarios, además del reactivo CellEvent Caspasa 3-7 de 1.5 µM (Life Tech, #C10423). Los videos se obtuvieron en un microscopio invertido Nikon TE 2000-E Eclipse, con imágenes capturadas cada 15 minutos durante 96 horas. Los fotogramas de los videos se muestran en la Figura 28. Los resultados muestran que el acoplador de célula T Biespecífica a FAP recombinante y NG-605, pero no 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 Tinte CMFDA Verde CellTracker (Life Tech, #C2925) y las células T CD3+ se tiñeron con el Kit de Proliferación Celular Violeta CellTrace (Life Tech, #C34557) siguiendo los protocolos del fabricante. Los NHDF teñidos se sembraron en una placa de 24 pocillos a 7.5×10^3 células/pocillo en cocultivo con 1.35×10^4 células tumorales DLD o SKOV. Las placas se incubaron durante 18 horas, a 37 °C, 5 % de CO₂. A continuación, las células se infectaron 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 células T CD3+ teñidas a los pocillos necesarios. Los videos se obtuvieron en un microscopio invertido Nikon TE 2000-E Eclipse, con imágenes capturadas cada 15 minutos durante 96 horas. Los fotogramas de los videos se muestran en la Figura 29. Los resultados muestran que todos los virus conducen a la infección de las células tumorales (RFP, fluorescencia roja, positivo), pero solo NG-609 y NG-610 fueron capaces de inducir una lisis rápida de las células NHDF cocultivadas.

Ejemplo 15

En esta serie de experimentos, se evaluó la capacidad de EnAd y los virus NG-601, NG-602, NG-603 y NG-604 del acoplador de célula T Biespecífica a EpCAM o de control para destruir células objetivo, que incluyen células tumorales y fibroblastos.

Caracterización de la activación de células T humanas y lisis de células objetivo positivas a EpCAM mediante EnAd, NG-601, NG-602, NG-603 y NG-604

Se evaluó la capacidad de EnAd y NG-601, NG-602, NG-603 y NG-604 para destruir células tumorales DLD en presencia o ausencia de células T CD3+ utilizando la tecnología xCELLigence. Las células DLD se sembraron en una placa E de 48 pocillos a 1.2×10^4 células/pocillo. Las placas se incubaron durante 18 horas, a 37 °C, 5 % de CO₂, antes de que las células se infectaran con EnAd a 100 ppc o se dejaran sin infectar. Dos horas después de la infección, se agregaron 75,000 células T CD3+ a los pocillos necesarios. XCELLigence se utilizó para medir la citotoxicidad de las células objetivo cada 15 minutos. Los resultados (Figura 30) demuestran que NG-601 y NG-602 conducen a una citotoxicidad de DLD significativamente más rápida de una manera dependiente de las células T.

En un experimento similar, se evaluó la capacidad de EnAd y NG-601, NG-602, NG-603 y NG-604 para destruir células tumorales DLD en presencia o ausencia de células T CD3+ utilizando un ensayo de citotoxicidad de LDH. Las células DLD se sembraron en una placa inferior en U de 96 pocillos a 2×10^4 células/pocillo y se infectaron con 100 ppc de EnAd o se dejaron sin infectar. Dos horas después de la infección, se agregaron 150,000 células T CD3+ a los pocillos necesarios. Las placas se incubaron a 37 °C, % de CO₂ y se cosecharon los sobrenadante y se analizaron mediante ensayo de citotoxicidad de LDH a las 0, 24, 48 y 72 horas después

de la infección. Los resultados (Figura 31) demuestran que NG-601 y NG-602 conducen a una citotoxicidad más rápida de DLD de una manera dependiente de las células T.

Como una extensión del experimento de LDH anterior, las células también se cosecharon a las 0, 24, 48 y 96 horas después del tratamiento, se tiñeron con anticuerpos para CD45, CD69 y CD25 y se analizaron utilizando citometría de flujo para determinar el estado de activación de las células T CD3+. Los resultados (Figura 32) demuestran que los virus NG-601 y NG-602 que expresan el acoplador de célula T Biespecífica a EpCAM, pero no EnAd ni los virus NG-603 y NG-604 que expresan el acoplador de célula T Biespecífica de control, fueron capaces de inducir la activación de las células T, con una cinética dependiente del promotor utilizado para la expresión del acoplador de célula T Biespecífica. En otro experimento, se evaluó la capacidad de NG-601 para destruir células tumorales DLD en diversa multiplicidad de infección (MOI) en presencia o ausencia de células T CD3+ utilizando la tecnología xCELLigence. Las células DLD se sembraron en una placa E de 48 pocillos a 2×10^4 células/pocillo. Las placas se incubaron durante 18 horas, a 37 °C, 5 % de CO₂, antes de que las células se infectaran con NG-601 en un MOI (ppc) que variaba de 0.001 a 10 o se dejaron sin infectar. Dos horas después de la infección, se agregaron 150,000 células T CD3+ a los pocillos necesarios. Se utilizó xCELLigence para medir la citotoxicidad de la célula objetivo cada 15 minutos. Los resultados (Figura 33) demuestran que NG-601 conduce a una citotoxicidad más rápida de DLD de una manera dependiente de las células T a MOI tan bajos como 0.001.

En un experimento similar, se evaluó la capacidad de EnAd y NG-601, NG-602, NG-603 y NG-604 para destruir células tumorales SKOV en presencia o ausencia de células T CD3+ utilizando la tecnología xCELLigence. Las células SKOV se colocaron en una placa E de 48 pocillos a 1×10^4 células/pocillo. Las placas se incubaron durante 18 horas, a 37 °C, 5 % de CO₂, antes de que las células se infectaran con EnAd (100 ppc) o se dejaron sin infectar. Dos horas después de la infección, se agregaron 50,000 células T CD3+ a los pocillos necesarios. Se utilizó xCELLigence para medir la citotoxicidad de la célula objetivo cada 15 minutos. Los resultados (Figura 34) sugieren que las células SKOV son resistentes a la citotoxicidad mediada por EnAd durante el período de tiempo de este estudio, sin embargo, NG-601 y NG-602 pudieron inducir una rápida lisis de las células SKOV en presencia de células T CD3+.

En un experimento similar, se evaluó la capacidad de EnAd y NG-601, NG-602, NG-603 y NG-604 para destruir células SKOV en presencia o ausencia de células T CD3+ utilizando un ensayo de citotoxicidad de LDH. Las células SKOV se sembraron en placas de fondo U de 96 pocillos a 2×10^4 células/pocillo y se infectaron con EnAd (100 ppc) o se dejaron sin infectar. Dos horas después de la infección, se agregaron 150,000 células T CD3+ a los pocillos necesarios. Las placas se incubaron a 37 °C, 5 % de CO₂ y se recogió el sobrenadante y se analizaron mediante ensayo de citotoxicidad de LDH a las 0, 24, 48 y 72 horas después de la infección. Los resultados (Figura 35) son consistentes con los datos previos y sugieren que las células SKOV son resistentes a la citotoxicidad mediada por EnAd durante este período de tiempo, sin embargo, NG-601 y NG-602 son capaces de inducir una lisis rápida de las células SKOV en presencia de células T CD3+.

Como una extensión del experimento de LDH anterior, las células también se cosecharon a las 0, 24, 48 y 96 horas después del tratamiento, se tiñeron con anticuerpos para CD45, CD69 y CD25 y se analizaron utilizando citometría de flujo para determinar el estado de activación de las células T CD3+ (Figura 36). Los resultados demuestran que los virus NG-601 y NG-602 que expresan el acoplador de célula T Biespecífica a EpCAM, pero no EnAd ni los virus NG-603 y NG-604 que expresan el acoplador de célula T Biespecífica de control, fueron capaces de inducir la activación de las células T, con una cinética dependiente del promotor utilizado para la expresión del acoplador de célula T Biespecífica.

En un experimento similar, se evaluó la capacidad de EnAd y NG-601, NG-602, NG-603 y NG-604 para activar células T CD3+ derivadas de pacientes con cáncer a partir de una muestra de ascitis primaria negativa a EpCAM CD3+. Las células DLD positivas a EpCAM se sembraron a 1×10^4 células por pocillo en una placa inferior en U de 96 pocillos y se cocultivaron con 100,000 células de ascitis (sin cambios desde el momento en que se recibieron). Las células se infectaron con partículas virales a 100 ppc o se dejaron sin infectar. Después de la incubación a 37 °C durante 48 horas, se recogió la población celular total y se determinó el nivel de expresión de CD25 en las células T CD3+ utilizando citometría de flujo. Los resultados (Figura 37) demuestran que los virus NG-601 y NG-602 que expresan el acoplador de célula T Biespecífica a EpCAM, pero no EnAd ni los virus NG-603 y NG-604 que expresan el acoplador de célula T Biespecífica de control, fueron capaces de inducir la activación de las células T CD3+ derivadas del paciente.

Los resultados indican que ambos virus NG-601 y NG-602 del acoplador de célula T Biespecífica a EpCAM, fueron capaces de inducir la activación de células T y la lisis de células objetivo, aunque el perfil cinético fue ligeramente diferente dependiendo del promotor utilizado.

Se obtuvieron videos de lapso de tiempo para observar la lisis viral o mediada por células T de las células objetivo mediante el acoplador de célula T Biespecífica a EpCAM recombinante, EnAd, NG-601 o NG-603. Las células NHDF se tiñeron con Tinte CMTMR Naranja CellTracker (Life Tech, #C2927) y las células T CD3+ se tiñeron con el Kit de Proliferación Celular Violeta CellTrace (Life Tech, #C34557) siguiendo los protocolos del

fabricante. Los NHDF teñidos se sembraron en una placa de 24 pocillos a 7.5×10^3 células/pocillo en cocultivo con 1.35×10^4 células tumorales DLD o SKOV. Las placas se incubaron durante 18 h, a 37°C , 5 % de CO_2 . A continuación, las células se trataron con un acoplador de célula T Biespecífica a EpCAM de 300 ng/ml o se infectaron con EnAd, NG-601 o NG-603 a 100 ppc o se dejaron sin tratar. Después de dos horas de incubación, se agregaron 100,000 células T CD3+ teñidas a los pocillos necesarios, además del reactivo CellEvent Caspasa 3-7 de $1.5 \mu\text{M}$ (Life Tech, #C10423). Los videos se obtuvieron en Nikon TE 2000-E Eclipse invertida, con imágenes capturadas cada 15 minutos durante 96 horas. Los fotogramas de los videos se muestran en la Figura 38. Los resultados muestran que el activador recombinante del acoplador de célula T Biespecífica a EpCAM y NG-605 conducen a una lisis rápida de las células objetivo DLD y SKOV, pero NHDF no se vio afectado.

Ejemplo 16

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

En el primer experimento, las células de ascitis sin purificar (por lo tanto, sin cambios desde que se recibieron) de un paciente se sembraron a 250,000 células por pocillo de una placa de 96 pocillos con fondo en U en 100 % de fluido ascítico. Las células se infectaron con virus a 100 ppc, y los pocillos sin tratar sirvieron como controles negativos. EnAd-CMV-GFP y EnAd-SA-GFP también se incluyeron en el experimento como informantes para determinar la infección y la expresión génica viral en estadio tardío, respectivamente, con micrografías que se muestran en la Figura 39. Después de la incubación a 37°C durante 5 días, se recogió la población celular total y se determinó el nivel de expresión de CD25 en las células T CD3+ (Figura 40A). El número total de células por pocillo se determinó utilizando perlas de conteo de precisión. Los resultados demuestran que los virus NG-605 y NG-606 del acoplador de célula T Biespecífica a FAP dieron lugar a aumentos significativos en la activación de los linfocitos T asociados a tumores.

Como una extensión del experimento anterior, se cosecharon pocillos replicados y se determinó el número de células FAP+ endógenas utilizando citometría de flujo. El número total de células por pocillo se determinó utilizando perlas de conteo de precisión. Los resultados (Figura 40B) muestran que NG-605 y NG-606 dieron lugar a una disminución significativa en el número de células autólogas que expresan FAP en las muestras de ascitis, lo que sugiere que algunas células FAP+ habían sido eliminadas por las células T activadas.

En un segundo experimento, las células de ascitis sin purificar (por lo tanto, sin cambios desde que se recibieron) de un paciente con cáncer se sembraron en 250,000 células por pocillo de una placa de 96 pocillos con fondo en U en 100 % de fluido ascítico o medio suplementado con suero humano al 1 %. Las células se infectaron con virus a 100 ppc, y los pocillos sin tratar sirvieron como controles negativos. EnAd-CMV-GFP y EnAd-SA-GFP también se incluyeron como informantes para determinar la infección y la expresión génica viral en etapa tardía, respectivamente, con micrografías que se muestran en la Figura 41. Después de la incubación a 37°C durante 5 días, se recogió la población total de células y se determinó el número de células T CD3+ (Figura 42) y el nivel de expresión de CD25 en las células T CD3+ (Figura 43). El número total de células por pocillo se determinó utilizando perlas de conteo de precisión. Los resultados demuestran que, en este paciente, el acoplador de célula T Biespecífica FAP recombinante y NG-605, pero no NG-606, dieron lugar a un aumento significativo de la activación de los linfocitos T asociados a tumores en los medios. Ninguno de los virus provocó la activación en el fluido ascítico.

Como una extensión del experimento anterior, se cosecharon pocillos replicados y se determinó el número de células FAP+ utilizando citometría de flujo (Figura 44). El número total de células por pocillo se determinó utilizando perlas de conteo de precisión. Los resultados demuestran que el acoplador de célula T Biespecífica a FAP recombinante y NG-605, pero no NG-606, dieron lugar a una disminución significativa en el número de células autólogas que expresan FAP en los medios. Ninguno de los dos virus condujo a una reducción de las células FAP+ en el fluido ascítico.

Ejemplo 17 - Materiales y Métodos

Estirpes celulares

Las células HEK293A, DLD, SKOV3, MCF7, A431, A549 y PC3 (ATCC) se cultivaron en el Medio Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM, Sigma-Aldrich, Reino Unido) y células CHO (ATCC) en el Roswell Park Memorial Institute (RPMI-1640, Sigma-Aldrich, Reino Unido). Los medios de crecimiento se suplementaron con un 10 % (v/v) de suero fetal bovino (FBS, Gibco, Reino Unido) y un 1 % (v/v) de penicilina/estreptomicina (10 mg/ml, Sigma-Aldrich) y las células se mantuvieron en atmósfera humidificada a 37°C y 5 % de CO_2 . Para las infecciones virales y las transfecciones de plásmidos virales, las células se mantuvieron en DMEM suplementadas con 2 % de FBS. Las células de transfección de plásmidos del acoplador de célula T

Biespecífica se mantuvieron en DMEM sin FBS. La expresión de EpCAM de las estirpes celulares objetivo se determinó utilizando citometría de flujo.

Generación de estirpes celulares estables que expresan EpCAM

La secuencia de proteínas del gen EpCAM (ID: 4072) se obtuvo de la base de datos NCBI y el ADN fue sintetizado por Oxford Genetics Ltd (Oxford, Reino Unido). El gen EpCAM se clonó en el vector pSF-Lenti mediante técnicas de clonación estándar que produjeron el vector pSF-Lenti-EpCAM. Las células HEK293T se transfectaron utilizando Lipofectamine 2000 con vector de expresión de lentivirus Ep-CAM junto con pSF-CMVHIV-Gag-Pol, pSF-CMV-VSV-G, pSF-CMV-HIV-Rev (Oxford Genetics Ltd). Los sobrenadantes que contenían lentivirus se cosecharon 48 h más tarde y se mezclaron con polimereno (8 µg/ml). Se agregaron mezclas de lentivirus/polimereno a las células CHO y se incubaron a 37 °C. El día 4, el sobrenadante se cambió por medios que contenían 7.5 µg/ml de puomicina. A continuación, se seleccionaron clonalmente las variantes estables y se determinó la expresión de EpCAM de las estirpes celulares parentales o de la variante transfectada estable mediante tinción de anticuerpos con EpCAM o anticuerpo de control de isótopos y se analizó utilizando citometría de flujo. Los clones positivos se expandieron y se utilizaron en experimentos posteriores.

Preparación de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y aislamiento de células T

Las PBMC se aislaron mediante centrifugación en gradiente de densidad (Boyum, 1968) a partir de conos de leucocitos de sangre total obtenidos del NHS Blood and Transplant UK (Oxford, Reino Unido). La sangre se diluyó 1:2 con PBS y se colocó en capas sobre Ficoll (1.079 g/ml, Ficoll-Paque Plus, GE Healthcare) antes de la centrifugación a 400 g durante 30 min a 22 °C con baja desaceleración. Después de la centrifugación, se recogieron PBMC y se lavaron dos veces con PBS (300 g durante 10 min a temperatura ambiente) y se resuspendieron en medio RPMI-1640 suplementado con 10 % de FBS. Para la extracción de células T CD3 positivas de PBMC, las células no CD3 se agotaron utilizando el Kit de Aislamiento de Células T Pan (Miltenyi Biotec, # 130-096-535), de acuerdo con el protocolo del fabricante. Para un mayor aislamiento de las células T CD4 y positivas a CD8, las células T CD3 se sometieron a otra ronda de purificación utilizando microperlas CD4+ (Miltenyi Biotec, #130-045-101).

Procesamiento de ascitis primarias y derrames pleurales

Se recibieron muestras primarias de ascitis maligna humana y derrame pleural del Churchill Hospital, Oxford University Hospitals (Oxford, Reino Unido) tras el consentimiento informado de pacientes con múltiples indicaciones de carcinoma avanzado, que incluyen, pero no se limitan a, ovario, páncreas, mama y pulmón. Este trabajo fue aprobado por el comité de ética de investigación del Oxford Centre for Histopathology Research. Una vez recibidas, las fracciones celulares y fluidas se separaron y el fluido se utilizó inmediatamente o se almacenaron alícuotas a -20 °C para análisis futuros. La fracción celular se trató con tampón de lisis de glóbulos rojos (Roche, Reino Unido) siguiendo las instrucciones del fabricante. El número de células y la viabilidad se determinaron mediante tinción con azul de tripano. Los tipos de células presentes en cada muestra se determinaron mediante tinción de anticuerpos para EpCAM, EGFR, FAP, CD45, CD11b, CD56, CD3, CD4, CD8, PD1 y CTLA4 y se analizaron utilizando citometría de flujo. Para la activación ex vivo de células T y los experimentos de lisis de células objetivo, se utilizaron células frescas y fluidos. En algunos casos, las células adherentes se introdujeron en DMEM suplementadas con un 10 % de FBS y se expandieron para uso posterior.

Ingeniería y producción de acoplador de célula T Biespecífica

Los acopladores de célula T Biespecífica se generaron al unir dos scFvs de diferentes especificidades con un ligador GS flexible. Cada scFv se crea mediante la unión de dominios VH y VL a partir de anticuerpos monoclonales parentales mediante un ligador. Cada acoplador de célula T Biespecífica poseía una secuencia de señal de terminal N de cadena ligera (Ig) de inmunoglobulina para la secreción de mamíferos y una etiqueta de afinidad de decahistidina C-terminal para la detección y purificación. Los acopladores de célula T Biespecífica se diseñaron mediante técnicas estándar de clonación de ADN y se insertaron en un vector de expresión de proteínas (pSFCMV-Amp) para la expresión y secreción de proteínas constitutivas impulsadas por el promotor del citomegalovirus (CMV). El ADN plásmido del acoplador de célula T Biespecífica a pSF-CMV-EpCAM o el acoplador de célula T Biespecífica a pSF-CMV-Control se transfectó a células HEK293A utilizando polietilenimina (PEI, lineal, MW 25000, Polysciences, EE. UU.) bajo las siguientes condiciones, se agregaron 55 µg de ADN de plásmido: 110 µg de PEI (relación ADN:PEI de 1:2 (p/p)) a las células, incubadas a 37 °C durante 4 h, luego se reemplazó con DMEM fresco sin suero y se incubó a 37 °C, 5 % de CO₂ durante 48 h. Las células se transfectaron en paralelo con pSF-CMV-GFP para garantizar la eficiencia de la transfección. Para cosechar la proteína secretada, se recogió el sobrenadante de las células transfectadas y se centrifugó a 350 g, 4 °C durante 5 min para eliminar los componentes celulares. Los sobrenadantes se transfirieron a 10,000 unidades de filtro centrífugo Amicon Ultra-15 MWCO (Millipore). Después de la centrifugación a 4750 g y 4 °C, el volumen del retenido se ajustó con el flujo para obtener una concentración 50 veces mayor. Las alícuotas de proteína concentrada se almacenaron a -80 °C.

Generación EnAdenotucirev que expresa el acoplador de célula T Biespecífica

Los plásmidos acoplador de célula T Biespecífica a EnAd2.4-CMV-EpCAM, acoplador de célula T Biespecífica a pEnAd2.4-SA-EpCAM, acoplador de célula T Biespecífica a pEnAd2.4-CMV-Control, acoplador de célula T Biespecífica a pEnAd2.4-SA-Control se generaron mediante la inserción directa del casete de transgén que codifica el acoplador de célula T Biespecífica a EpCAM o el acoplador de célula T Biespecífica de control en el plásmido básico EnAd pEnAd2.4 utilizando la tecnología de ensamblaje de Gibson. El casete del transgén contenía una secuencia aceptora de empalme corto de 5' o un promotor exógeno de CMV, seguido en dirección descendente por la secuencia de ADNc del acoplador de célula T Biespecífica a EpCAM o de control y una secuencia de poliadenilación de 3'. En la Figura 18 se muestra un esquema del casete de transgén insertado. La correcta construcción del plásmido se confirmó mediante secuenciación de ADN. Los plásmidos acoplador de célula T Biespecífica a EnAd2.4-CMV-EpCAM, acoplador de célula T Biespecífica a pEnAd2.4-SA-EpCAM, acoplador de célula T Biespecífica a pEnAd2.4-CMV-Control y acoplador de célula T Biespecífica a pEnAd2.4-SA-Control se linealizaron mediante digestión por restricción con la enzima AseI antes de la transfección en células HEK293A. La producción del virus se monitorizó mediante la observación del efecto citopático (CPE) en la monocapa celular. Una vez que se observó un CPE extenso, el virus se recogió de células HEK293A mediante tres ciclos de congelación y descongelación. Los clones de un solo virus se seleccionaron al diluir en serie el lisado recogido y reinfectar células HEK293A, y cosechar pocillos que contenían placas individuales. Las infecciones en serie de las células HEK293A se realizaron una vez que una infección había alcanzado la CPE completa con el fin de amplificar las existencias de virus. Una vez que se amplificaron las potentes existencias de virus, los virus se purificaron mediante doble banda de cloruro de cesio para producir existencias de virus del acoplador de célula T Biespecífica a EnAd-CMV-EpCAM, acoplador de célula T Biespecífica a EnAd-SAEpCAM, acoplador de célula T Biespecífica a EnAd-CMV-Control, acoplador de célula T Biespecífica a EnAd-SA-Control. Estas existencias se valoraron mediante TCID₅₀ y ensayo picogreen (Life Technologies), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Preparación de sobrenadantes

Para evaluar la liberación de citocinas mediada por el acoplador de célula T Biespecífica, las células DLD (20,000) se sembraron con 100,000 células T CD3+ en una placa de fondo plano de 96 pocillos sola o con 2 µg/ml de acoplador de célula T Biespecífica a EpCAM o de control. Después de 48 h de incubación a 37 °C y 5 % de CO₂, se recogieron sobrenadantes, se eliminaron los componentes celulares por centrifugación y se almacenaron alícuotas a -20 °C. Para evaluar la expresión del transgén del acoplador de célula T Biespecífica de virus recombinantes, se infectaron células HEK293A (1e6) o DLD (1.2e6) con el acoplador de célula T Biespecífica a EnAd-CMV-EpCAM, acoplador de célula T Biespecífica a EnAd-SA-EpCAM, acoplador de célula T Biespecífica a EnAd-CMVControl, acoplador de célula T Biespecífica a EnAd-SA-Control o EnAd a 100 vp/célula. Las células se cultivaron durante 72 h, momento en el que avanzó el efecto citopático (EPC). Los sobrenadantes se recogieron y centrifugaron durante 5 min, 300 g para eliminar los restos celulares y se almacenaron a -20 °C para posterior análisis.

Inmunotransferencia

Se utilizó transferencia de puntos para medir la concentración de acoplador de célula T Biespecífica recombinante producida a partir de transfecciones de plásmidos. Se prepararon diluciones seriadas dobles de cada acoplador de célula T Biespecífica y de una proteína estándar (10 x Cathepsina D humana marcada con His (terminal C), Biolegend, #556704). La concentración molar del estándar de proteína se ajustó para representar una concentración de acoplador de célula T Biespecífica de 100 µg/ml. Dos µl de cada muestra y patrón de proteína se aplicaron directamente sobre una membrana de nitrocelulosa. La membrana se secó al aire, se bloqueó y se probó con el anticuerpo α-6xHis (C-terminal) (1:5000, clon 3D5, Invitrogen, UK, #46-0693) para la detección de proteínas etiquetadas con His de terminal C, seguido de lavado e incubación con anticuerpo secundario antiratón (1:10000, Dako, #P0161) y se detectó mediante la aplicación del Sustrato de Duración Extendida SuperSignal West Dura (Thermo Fisher, #34075) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los sobrenadantes de las células HEK293A infectadas por virus se analizaron mediante transferencia Western para determinar la expresión del acoplador de célula T Biespecífica. Los sobrenadantes fueron fraccionados por SDS-PAGE y transferidos a una membrana de nitrocelulosa de acuerdo con los protocolos del fabricante (Bio-Rad). Además, las membranas se trataron de forma idéntica al protocolo de transferencia de puntos anterior.

Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA)

Para evaluar la unión a EpCAM, las placas de ELISA se prepararon al recubrir durante la noche a 4 °C con proteína humana EpCAM/TROP-1 (50 ng/pocillo, Sino Biological Inc, #10694-H02H-50). Las placas se bloquearon durante 1 h a temperatura ambiente con 5 % de BSA, seguidas de incubación con sobrenadantes diluidos de HEK293A transfectados con acoplador de célula T Biespecífica a EpCAM, acoplador de célula T Biespecífica de control y vectores de pSF-CMV vacíos (2 h, temperatura ambiente). Las placas se lavaron tres

veces con PBS-T y posteriormente después de cada etapa de unión posterior. Las placas se incubaron con anticuerpo anti-His (C-term) (1:5000, clon 3D5, #46-0693, Invitrogen, UK) durante 1 h, temperatura ambiente, seguido de anti-Fc conjugado con HRP (1:1000 en PBS/5 % leche, Dako) durante 1 h a temperatura ambiente. La detección de HRP se realizó utilizando 3.3.5.5'-terametiltetrametildiamina (TMB, Thermo-Fisher) y se utilizó solución de parada para terminar la reacción. La absorbancia a 450 nm se midió en un lector de placas Wallac 1420 (Perkin Elmer).

Citometría de flujo

El análisis de citometría de flujo se realizó en un citómetro de flujo FACSCalibur (BD Biosciences) y los datos se procesaron con el software Flowjo v10.0.7r2 (TreeStar Inc., EE.UU.). Para la clasificación de las diferentes poblaciones celulares se utilizaron anticuerpos específicos para CD45 (HI30, Biolegend), CD11b (ICRF44, Biolegend), EpCAM (9C4, Biolegend) y FAP (427819, RyD Systems). Para el análisis de las poblaciones de células T se utilizaron los siguientes clones de anticuerpos acoplados a diferentes fluoróforos: CD69 (FN50, Biolegend), CD25 (BC96, Biolegend), IFN γ (4S.B3, Biolegend), anticuerpo α CD107a (H4A3, Biolegend), CD3 (HIT3a, Biolegend), CD4 (OKT4, Biolegend), CD8a (HIT8a, Biolegend), PD1 (H4A3, Biolegend). En cada caso, se utilizó el anticuerpo de control del isotipo adecuado.

Caracterización de activación de células T humanas

Niveles de expresión de CD69 y CD25

Se evaluó la capacidad del acoplador de célula T Biespecífica a EpCAM o de los virus del acoplador de célula T Biespecífica a EpCAM para inducir la activación de células T mediante la expresión de superficie de CD69 y CD25. Las células CD3 humanas (75,000 células/pocillo en placas de fondo plano de 96 pocillos) de muestras de PBMC o ascitis se cultivaron solas o con DLD, SKOV, CHO, CHOEpCAM o células objetivo de ascitis (15,000) en presencia de medios solos, EpCAM o proteína del acoplador de célula T Biespecífica de control (2 ng/ μ l) o virus recombinante (100 vp/célula). En algunos casos, se agregó el anticuerpo anti-PD1 (Invivogen, #hpdlni-mab7) a una concentración final de 2.5 μ g/ml. Las células CD3 se incubaron con Dinaperlas CD3/CD28 (Thermo Fisher, #11131D) como control positivo para la activación de las células T. Las células se cultivaron en medio durante 24 h a 37 °C, a menos que se indique lo contrario, y posteriormente se cosecharon con tampón de disociación celular libre de enzimas (Gibco, #13151014). Las células totales se tiñeron con anticuerpos para la expresión superficial de CD69, CD25, CD3, CD4 o CD8 y se analizaron utilizando citometría de flujo. El efecto del fluido ascítico sobre la activación de las células T (CD69, CD25) se investigó mediante PBMC purificado con CD3 activador policlonalmente (100,000) mediante incubación con anticuerpo CD3 inmovilizado en placa (7.5 μ g/ml, HIT3a, Biolegend, #300313) en RPMI-1640 o fluidos aislados de las muestras de ascitis maligna.

Expresión de IFN γ

La capacidad del acoplador de célula T Biespecífica a EpCAM para inducir actividad de células T se evaluó mediante la expresión de IFN γ , mediante el cocultivo de células T durante 6 h con células DLD (200,000 células CD3/pocillo, 40,000 células DLD/pocillo en una placa de 96 pocillos de fondo plano) y 2 μ g/ml de EpCAM recombinante o acoplador de célula T Biespecífica de control. Como control positivo, las células T fueron estimuladas con un cóctel soluble de activación celular PMA/ionomicina (Biolegend, #423301). La brefeldina A (GolgiPlug, BD Biosciences) se agregó al medio de cultivo 5 h antes de la cosecha, momento en el que se cosecharon las células T CD3+ y se tiñeron intracelularmente para determinar la expresión de IFN γ y se analizaron utilizando citometría de flujo.

Proliferación de células T

Para estudiar la proliferación de células T, se incubaron 100,000 células T CD3+ marcadas con CFSE (kit Cell Trace CFSE, Invitrogen, #C34554) con 20,000 células DLD en formato de placa de 96 pocillos, con 2 μ g/ml de acoplador de célula T Biespecífica a EpCAM o de control. Cinco días después del cocultivo, las células se tiñeron para CD3, CD4 o CD8 y se midió la fluorescencia CFSE de las células T CD3+ viables mediante citometría de flujo, con el número total de células normalizado mediante perlas de recuento de precisión (5000/pocillo, Biolegend, #424902). Los datos de fluorescencia se analizaron y modelaron utilizando la función de proliferación del software Flowjo v7.6.5. Los datos se presentan como el porcentaje de células originales que entraron en un ciclo de proliferación (%divididas) o el número medio de divisiones celulares que ha experimentado una célula de la población original (Índice de división).

Degranulación de CD107a

Las células DLD (15,000 células/pocillo) se cocultivaron con 75,000 células T CD3+ en una placa de fondo plano de 96 pocillos en presencia de medios solos o 2 ng/ μ l de acoplador de célula T Biespecífica a EpCAM o de control. Se agregaron α CD107a o anticuerpos de control de isotipo directamente al medio de cultivo. Se

agregó Monensina (GolgiStop, BD Biosciences) después de 1 h de incubación a 37 °C y 5 % de CO₂, seguido de 5 h de incubación adicional. Posteriormente, se cosecharon las células, se tiñeron para CD3, CD4 o CD8 y se analizaron utilizando citometría de flujo.

5 Liberación de citocinas

Las citocinas dentro de los sobrenadantes recogidos de cultivos de DLD/PBMC o células de derrame pleural se cuantificaron utilizando el panel de Citocinas Auxiliares T Humanas LEGENDplex (Biolegend, #740001) y citometría de flujo siguiendo las instrucciones del fabricante. Las citocinas incluidas en el análisis son IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13, IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22, IFN γ y TNF α .

Ensayo de citotoxicidad de células objetivo in vitro

La citotoxicidad de las células objetivo mediada por virus o acopladores de célula T Biespecífica recombinantes se evaluó mediante liberación de LDH o ensayo MTS. Las células objetivo (DLD, SKOV, HT-29, A431, A549, PC3, CHO, CHO-EpCAM) se cocultivaron con células T CD3, CD4 o CD8 (E:T 5:1) en una placa de 96 pocillos de fondo plano en presencia de medios solos, sobrenadantes diluidos o virus (100 vp/célula). Después de 24 h de cocultivo (a menos que se indique lo contrario), se cosecharon los sobrenadantes y células y se determinó la citotoxicidad mediante el ensayo LDH (Ensayo de Citotoxicidad No Reactivo CytoTox 96, Promega, #G1780) o el ensayo de viabilidad MTS (Ensayo de Proliferación Celular 96 CellTiter, Promega, #G3580) según las instrucciones del fabricante. La cantidad de acoplador de célula T Biespecífica producido a partir de células DLD infectadas por virus se determinó al comparar la citotoxicidad inducida por sobrenadantes virales diluidos con la de una curva estándar generada utilizando el acoplador de célula T Biespecífica recombinante.

Para evaluar la actividad oncolítica de los virus, las células DLD se sembraron en una placa de 96 pocillos (25,000 células/pocillo) durante 18 h a 37 °C y 5 % de CO₂, antes de la infección con un aumento de vp/célula (dilución en serie de 5 veces, 100 a 5.12e-5 vp/célula) o se dejaron sin infectar. La citotoxicidad de DLD se midió el día 5 mediante el ensayo de viabilidad MTS. Se ajustaron las curvas de dosis-respuesta y se determinó la IC₅₀ utilizando un modelo de ajuste no lineal de cuatro parámetros integrado en el software Prism 7 (GraphPad Software). La viabilidad celular se monitorizó en tiempo real utilizando la tecnología xCELLigence RTCA DP (Acea Biosciences). Las células DLD, SKOV3 o MCF7 se sembraron en una placa E de 48 pocillos a 12,000 células/pocillo. Las placas se incubaron durante 18 h, 37 °C, 5 % de CO₂, antes de que las células se trataran con un acoplador de célula T Biespecífica (2 ng/ μ l) o se infectaran con el virus (100 vp/célula) o se dejaran sin tratar. Dos horas después de la infección, se agregaron 75,000 células CD3+ a los pocillos necesarios. La impedancia de la célula se midió cada 15 min durante un máximo de 160 h. Para los ensayos de citotoxicidad ex vivo, las células no purificadas de muestras de ascitis o derrame pleural se resuspendieron en fluido ascítico y se sembraron (1.5e5/pocillo) en placas de fondo plano de 96 pocillos. Después de la incubación durante la duración indicada a 37 °C, 5 % de CO₂, los sobrenadantes se analizaron mediante ensayo LDH o las células totales se cosecharon con tampón de disociación celular, se tiñeron para CD3, CD25 y EpCAM, y se analizaron utilizando citometría de flujo. Para los experimentos de bloqueo de PD1, se incluyó el anticuerpo anti-PD1 (2.5 μ g/ml, Invivogen, #hpdlni-mab7).

Replicación del genoma viral y qPCR

Se analizó la capacidad del acoplador de célula T Biespecífica a EnAd-CMV-EpCAM, acoplador de célula T Biespecífica a EnAd-SA-EpCAM, acoplador de célula T Biespecífica a EnAd-CMV-Control, acoplador de célula T Biespecífica a EnAd-SA-Control o EnAd para replicar sus genomas mediante la siembra de células DLD en una placa de 24 pocillos (150,000 células/pocillo) durante 18 h, 37 °C, 5 % de CO₂, antes de la infección con 100 vp/célula. Los pocillos se recogieron 24 y 72 h después de la infección, y el ADN se purificó utilizando el mini kit de ADN genómico PureLink (Invitrogen, #K182001) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Los genomas virales totales se cuantificaron mediante qPCR contra EnAd hexón utilizando un conjunto específico de cebadores-sondas (cebadores: TACATGCACATCGCCGGA/CGGGCGAACTGCACCA, sonda: CCGGACTCAGGTACTCCGAAGCATCCT).

55 Microscopía

Se capturaron imágenes de campo claro y fluorescencia con un microscopio Zeiss Axiovert 25. Se obtuvieron videos de lapso de tiempo para observar la lisis viral o mediada por células T de las células objetivo mediante el acoplador de célula T Biespecífica a EnAd o EnAd-CMVEpCAM. Las células no infectadas se utilizaron como control negativo. Las células NHDF se tiñeron con Tinte CMTMR Naranja CellTracker (Life Technologies, #C2927) y las células CD3+ se tiñeron con Kit de Proliferación Celular Violeta CellTrace (Life Technologies, #C34557) siguiendo los protocolos del fabricante. Los NHDF teñidos se sembraron en una placa de 24 pocillos a 7,500 células/pocillo en cocultivo SKOV3 a 13,500 células/pocillo. Las placas se incubaron durante 18 h, 37 °C, 5 % de CO₂. A continuación, las células se trataron con un acoplador de célula T Biespecífica a EpCAM de 300 ng/ml o se infectaron con 100 vp/célula de EnAd o acoplador de célula T Biespecífica a EnAd2.4-CMV-EpCAM o se dejaron sin tratar. Después de 2 h de incubación, se agregaron 100,000 CD3+ teñidos a los pocillos

necesarios, además del reactivo CellEvent Caspasa 3-7 de 1.5 μ M (Life Technologies, #C10423). Las imágenes se capturaron en un microscopio invertido Nikon TE 2000-E Eclipse (10X objetivo óptico) a intervalos de 15 minutos cubriendo un período de 96 h. Los vídeos de lapso de tiempo (12 fotogramas/segundo) se generaron utilizando el software ImageJ.

Estadística

En todos los casos en los que se compararon más de dos condiciones experimentales, el análisis estadístico se realizó utilizando una prueba de ANOVA de una vía con el análisis Post Hoc de Tukey. Todos los datos se presentan como la media \pm DE. Los niveles significativos utilizados fueron $P = 0.01 - 0.05$ (*), $0.001 - 0.01$ (**), $0.0001 - 0.001$ (***). Todos los experimentos in vitro se realizaron por triplicado, a menos que se indique lo contrario.

Ejemplo de comparación 18 - Generación y producción de un acoplador de célula T Biespecífica dirigido a EpCAM

Se diseñó un acoplador de célula T Biespecífica dirigido a EpCAM al unir dos scFv específicos para CD3 ϵ y EpCAM con un ligador flexible de glicina-serina (GS). También se produjo un acoplador de célula T Biespecífica de control, que reconocía CD3 ϵ y un antígeno irrelevante (la hemaglutinina filamentosa adhesina (FHA) de Bordetella pertussis). Ambos acopladores de célula T Biespecífica se diseñaron para contener una secuencia de señal de terminal N para la secreción de mamíferos y una etiqueta de afinidad de decahistidina de terminal C para la detección y purificación (Figura 45A). Para caracterizar la funcionalidad de los acopladores de célula T Biespecífica recombinantes, se clonaron en vectores de expresión bajo el control transcripcional del promotor temprano inmediato de CMV (acoplador de célula T Biespecífica a pSF-CMV-EpCAM y acoplador de célula T Biespecífica a pSF-CMV-Control, respectivamente).

Las células HEK293 adherentes (HEK293A) se transfectaron con los vectores de expresión y los sobrenadantes se recogieron y concentraron 50 veces para su posterior análisis. Para estimar la cantidad de acoplador de célula T Biespecífica producido, las muestras se diluyeron en serie y se evaluaron, utilizando anti-His, en una transferencia de puntos utilizando cathepsina D etiquetada con decahistidina como estándar. De esta manera, fue posible estimar que el nivel de acopladores de célula T Biespecífica producidos en el sobrenadante era de aproximadamente 20 μ g/ml a las 48 h después de la transfección (de 1.8×10^7 células HEK293A)

(Figura 46A). La unión específica del acoplador de célula T Biespecífica a EpCAM y no del acoplador de célula T Biespecífica de control a la proteína EpCAM recombinante se demostró mediante ELISA (Figura 46B).

Ejemplo de comparación 19 - Caracterización de la activación de células T humanas mediante un acoplador de célula T Biespecífica a EpCAM recombinante

Se evaluó la capacidad de la proteína recombinante del acoplador de célula T Biespecífica a EpCAM para activar las células T derivadas de PBMC mediante la adición de células CD3 $^{+}$ primarias humanas no estimuladas a un cultivo de células de carcinoma colorrectal DLD humano, que se sabe que expresan EpCAM en su superficie (Karlsson et al, 2008). La adición de 2.5 ng/ml de acoplador de célula T Biespecífica a EpCAM (como sobrenadante de las células HEK293A transducidas) condujo a un aumento significativo de los marcadores de activación de células T CD69 y CD25 (Figura 45B y C), mientras que el acoplador de célula T Biespecífica de control no tuvo ningún efecto

La exposición de las células CD3 al acoplador de célula T Biespecífica a EpCAM en ausencia de células tumorales produjo un aumento muy modesto en CD69 y CD25, y esto indica que la agrupación de CD3 mediada por anticuerpos es esencial para la activación completa por esta unión anti-CD3. Las células T estimuladas por el acoplador de célula T Biespecífica a EpCAM en presencia de células tumorales también mostraron un aumento significativo en la producción de interferón gamma (Figura 45D) y la proliferación celular (Figura 45E), mientras que el acoplador de célula T Biespecífica de control no tuvo ningún efecto. El objetivo de la activación de las células T es causar citotoxicidad mediada por la degranulación, y la expresión de CD107a/LAMP1 de superficie (que indica degranulación, Aktas et al.) fue fuertemente regulada al alza por el acoplador de célula T Biespecífica a EpCAM, pero no por el control (Figura 45F).

La liberación de citocinas después de la activación mediada por células T derivadas de PBMC en presencia de células DLD se caracterizó mediante citometría de flujo utilizando una matriz de perlas de citocinas. Al igual que antes, el acoplador de célula T Biespecífica de control mostró poca actividad, aunque el acoplador de célula T Biespecífica a EpCAM desencadenó la liberación de varias citocinas, que incluyen niveles altos de IL-2, IL-6, IL-10, IL-13, interferón gamma y TNF (Figura 45G). La producción de IL-2, interferón gamma y TNF se asocian generalmente con una respuesta Th1, mientras que la IL-6 y la IL-10 se relacionan más a menudo con una respuesta Th2 (Mosmann y Sad, 1996).

Ejemplo de comparación 20 - Especificidad del acoplador de célula T Biespecífica a EpCAM recombinante

La mayoría de las células epiteliales humanas expresan EpCAM, por lo que para evaluar si el efecto del acoplador de célula T Biespecífica a EpCAM era específico de antígeno, se diseñaron por ingeniería células de Ovario de Hámster Chino (células CHO) utilizando un vector lentiviral para expresar EpCAM humano en su superficie. En presencia de un acoplador de célula T Biespecífica a EpCAM y de células CHO-EpCAM, las células T derivadas de PBMC agregados exógenamente mostraron una fuerte activación (evaluada por la expresión de CD25 (véase la Figura 47A) y una citotoxicidad asociada (Figura 47B) que no se observó con las células de control CHO parentales ni con los acopladores de célula T Biespecífica de control. Esto indica que la citotoxicidad del acoplador de célula T Biespecífica a EpCAM es específica del antígeno.

A continuación, evaluamos si el acoplador de célula T Biespecífica a EpCAM destruiría una variedad de células tumorales, y si el nivel de citotoxicidad mediada por el acoplador de célula T Biespecífica a EpCAM observado dependía de la densidad de expresión de EpCAM. Se midió la citotoxicidad de las células T en presencia del acoplador de célula T Biespecífica a EpCAM en seis estirpes celulares de carcinoma diferentes, observándose la mayor citotoxicidad en DLD y A431, y la menor en A549 y PC3 (Figura 47C). Esto mostró una asociación débil con los niveles superficiales de EpCAM (determinados por citometría de flujo), donde las células A549 y PC3 mostraron los niveles más bajos y DLD los más altos (Figura 47D). Esto sugiere que la presencia y el nivel de expresión de EpCAM influyen en el grado de citotoxicidad, aunque otros factores (tal vez la resistencia intrínseca de las células a la apoptosis mediada por granzima) también desempeñan una función en la determinación del nivel general de destrucción celular.

Ejemplo de comparación 21: activación mediada por un acoplador de célula T Biespecífica de subconjuntos de células T CD4+ y CD8+

Para determinar qué tipos de células T son activadas por el acoplador de célula T Biespecífica a EpCAM, se incubaron células T derivadas de PBMC con células DLD y se activaron utilizando el acoplador de célula T Biespecífica antes del análisis de flujo. Tanto las células CD4+ como las CD8+ mostraron altos niveles de expresión de CD69 y CD25 (Figura 49A), aunque el porcentaje de células CD4 activadas fue generalmente ligeramente mayor. La proliferación de células T mediadas por el acoplador de célula T Biespecífica a EpCAM se evaluó mediante tinción CFSE (Figura 49B), y se observó la degranulación por expresión de CD197a/LAMP1 (Figura 49C) y nuevamente se observaron niveles similares de activación para las células CD4+ y CD8+. Por último, se compararon los niveles de citotoxicidad de las células tumorales alcanzados utilizando el acoplador de célula T Biespecífica a EpCAM para activar los subconjuntos de CD4+ y CD8+ purificados. Todas las preparaciones de células T mostraron una citotoxicidad similar (Figura 49D), lo que indica que tanto las linfocitos CD4+ como los CD8+ pueden contribuir a la citotoxicidad mediada por el acoplador de célula T Biespecífica observada.

Ejemplo de comparación 22 - Expresión del acoplador de célula T Biespecífica a EpCAM a partir de adenovirus oncolítico, EnAdenotucirev

EnAdenotucirev (EnAd) es un adenovirus oncolítico, una quimera del grupo B tipo 11 y tipo 3 con una región E2B en mosaico, una supresión E3 casi completa y una supresión E4 más pequeña mapeada a E4orf4 (Kuhn 2008). El virus, que actualmente se encuentra en fase temprana de ensayos clínicos para el tratamiento del cáncer, combina una buena farmacocinética sistémica y una actividad clínica prometedora con la posibilidad de codificar y expresar transgenes (Calvo 2014, Boni 2014). El acoplador de célula T Biespecífica a EpCAM se codificó dentro de EnAd inmediatamente en dirección descendente del gen de la fibra, utilizando un vector lanzadera insertado en la estructura principal del virus por el ensamblaje de Gibson (Figura 18). El acoplador de célula T Biespecífica se colocó bajo el control transcripcional de un promotor temprano inmediato de CMV (acoplador de célula T Biespecífica a EnAd-CMV-EpCAM), o se colocó en dirección descendente de un sitio aceptor de empalme para el promotor tardío principal del adenovirus (MLP; acoplador de célula T Biespecífica a EnAd-SA-EpCAM). En la configuración anterior, el acoplador de célula T Biespecífica se debe expresar siempre que el virus infecte con éxito una célula, mientras que la expresión desde el sitio aceptor del empalme MLP solo se producirá cuando el MLP esté activado en células que son permisivas a la replicación del virus. También se introdujo un acoplador de célula T Biespecífica de control (que reconoce CD3 y FHA) para crear dos virus de control correspondientes.

Los virus fueron clonados, rescatados en células HEK293A, y un gran lote de cada uno fue preparado en un hipermatraz y purificado dos veces mediante bandas de cloruro de cesio. La infección de DLD con EnAd parental y los virus recombinantes del acoplador de célula T Biespecífica produjo cantidades similares de genomas virales (medidos por qPCR) en todos los puntos temporales analizados, lo que indica que el transgén del acoplador de célula T Biespecífica no interfiere con la cinética de replicación viral (Figura 51A). A continuación, investigamos la replicación y las propiedades oncolíticas de los virus en ausencia de células T humanas. Las células DLD se infectaron con lotes de virus en aumento de partículas de virus (vp)/célula, y la citotoxicidad se midió mediante el ensayo MTS el día 5. Todos los virus recombinantes, que incluyen aquellos con EpCAM y acopladores de célula T Biespecífica de control, regulados por el promotor de CMV o el aceptor

de empalme, mostraron una actividad citotóxica indistinguible del virus parental, lo que demuestra que la modificación genética no había cambiado la actividad oncolítica intrínseca del virus (Figura 51B).

Para evaluar la expresión y secreción del acoplador de célula T Biespecífica, se utilizaron los virus EnAd que expresan el acoplador de célula T Biespecífica para infectar células HEK293A, y se examinaron sobrenadantes durante 72 h mediante transferencia Western utilizando un anticuerpo anti-His. Como se muestra en la Figura 51C, los cuatro virus (dos que expresan el acoplador de célula T Biespecífica de control y dos que expresan el acoplador de célula T Biespecífica a EpCAM) mostraron niveles similares de acoplador de célula T Biespecífica secretado en el sobrenadante

Ejemplo comparador 23 – Destrucción selectiva de células positivas a EpCAM por un acoplador de célula T Biespecífica a EpCAM producido viralmente

Los sobrenadantes de las células HEK293A infectadas con el acoplador de célula T Biespecífica a EnAd-EpCAM se agregaron a cultivos de células CHO y CHO-EpCAM, ya sea con o sin células T derivadas de PBMC; La activación de las células T y la citotoxicidad para las células CHO/CHO-EpCAM se midieron después de 24 h. En el caso de las células CHO, no se observó un aumento en la expresión de CD25 de las células T (Figura 51D) ni se observó citotoxicidad con ningún tratamiento (Figura 51E). Sin embargo, las células T incubadas con las células CHO-EpCAM mostraron aumentos sustanciales en la expresión de CD25 utilizando sobrenadantes de células HEK293A que habían sido infectadas con virus del acoplador de célula T Biespecífica a EnAd-CMV-EpCAM o acoplador de célula T Biespecífica a EnAd-SA-EpCAM (Figura 51D). Como era de esperar, esto se tradujo en una citotoxicidad selectiva para las células CHO-EpCAM solo cuando se agregaron células T en presencia de sobrenadante de células 293A que habían sido infectadas con virus del acoplador de célula T Biespecífica a EnAd-CMV-EpCAM o del acoplador de célula T Biespecífica a EnAd-SA-EpCAM (Figura 51E). Fundamentalmente, no hubo citotoxicidad en ausencia de células T, o cuando se utilizaron sobrenadantes de HEK293A que las células habían sido infectadas con EnAd que expresa el acoplador de célula T Biespecífica de control.

Ejemplo de comparación 24 - Citotoxicidad superior de EnAd que expresa el acoplador de célula T Biespecífica a EpCAM

EnAd destruye la mayoría de las células de carcinoma rápidamente mediante oncólisis directa (Kuhn 2008), aunque algunas células, en particular las células de carcinoma de ovario SKOV3, son parcialmente resistentes y se destruyen más lentamente. Por lo tanto, razonamos que las consecuencias de armar End para secretar el acoplador de célula T Biespecífica a EpCAM, que conduce a la activación citotóxica de las células T, podrían ser particularmente evidentes en las células SKOV3. Por lo tanto, las células se expusieron al virus (100 vp/célula) 24 h después de la siembra y la muerte celular se monitorizó por el sistema xCELLigence. Las células T derivadas de PBMC se agregaron (o no) al cultivo celular SKOV3 2 h después. En ausencia de células T, las células tumorales crecieron durante aproximadamente 72 h (manifestadas por el aumento de la señal del Índice Celular en la Figura 53A), pero el crecimiento celular alcanzó una meseta y se mantuvo estable, independientemente de la infección por virus, hasta al menos 160 h). Todos los virus probados, que incluyen el EnAd parental, no indujeron citotoxicidad observable en las células objetivo durante el tiempo medido. Sin embargo, cuando se cocultivaron con células T derivadas de PBMC, los virus armados con el acoplador de célula T Biespecífica a CMV y SA-EpCAM indujeron una lisis rápida de SKOV3, con lisis inducida impulsada por CMV dentro de las 16 h y SA dentro de las 44 h posteriores a la adición de células T (Figura 53B). Es importante destacar que el EnAd parental o los virus de control del acoplador de célula T Biespecífica no específico no demostraron ninguna lisis de células objetivo en este período de tiempo, incluso con la adición de células T. Este resultado se confirmó mediante el ensayo de LDH, en el que se establecieron cocultivos idénticos al anterior, con la citotoxicidad medida a las 24, 48 y 96 h después de la infección (Figura 48). Estos resultados están respaldados por hallazgos similares en células DLD en las que los virus que expresan el acoplador de célula T Biespecífica a EpCAM indujeron citotoxicidad a un ritmo significativamente más rápido que los virus del acoplador de célula T Biespecífica de control (Figura 50A + B).

Para confirmar que la citotoxicidad de las células objetivo está mediada por la activación de las células T, se recogieron células CD3 en cada punto de tiempo y se determinó el estado de activación por la expresión de CD69 y CD25, demostrando una cinética de expresión similar a la observada para la citotoxicidad (Figura 53C y D, Figura 50C y D). La cantidad aproximada de acoplador de célula T Biespecífica a EpCAM producido a partir de células DLD infectadas se determinó al comparar la citotoxicidad (Abs490) inducida por sobrenadantes DLD infectados con la citotoxicidad inducida por cantidades conocidas de acoplador de célula T Biespecífica recombinante (es decir, creación de una curva estándar (Abs490)). Las DLD en cocultivo con PBMC purificadas con CD3 (1:5) se incubaron con un acoplador de célula T Biespecífica recombinante (Figura 50E) o un sobrenadante DLD infectado (Figura 50F) y la liberación de LDH se midió a las 24 h, lo que nos permitió determinar que el acoplador de célula T Biespecífica a EpCAM se produjo a 165 µg y 50 µg por millón de DLD para el acoplador de célula T Biespecífica a EnAd-CMV-EpCAM y el acoplador de célula T Biespecífica a EnAd-SAEpCAM, respectivamente. La EC50 para el acoplador de célula T Biespecífica a EpCAM es de 7.4 ng/ml (Figura 50E y F) y, por lo tanto, el acoplador de célula T Biespecífica a EpCAM se produce por el virus

recombinante a niveles que probablemente alcancen dosis terapéuticas. La citotoxicidad de EnAd que expresa el acoplador de célula T Biespecífica a EpCAM se visualizó mediante microscopía de video de lapso de tiempo. Las células tumorales SKOV3 (sin marcar) se incubaron conjuntamente con fibroblastos humanos normales (EpCAM negativo, marcados en rojo, que sirven como células de control no objetivo) y células T derivadas de PBMC (marcados en azul) en presencia de una tinción de caspasa (el reactivo CellEvent Caspasa 3-7 produce una tinción verde cuando se activan las caspasas). Una vez más, la combinación de EnAd que expresa el acoplador de célula T Biespecífica a EpCAM, combinado con células T exógenas, dio una citotoxicidad dramática a las células tumorales SKOV3, que mostraron una fuerte inducción de apoptosis cuando se infectaron con el acoplador de célula T Biespecífica a EnAd-CMV-EpCAM, pero no con EnAd parental. Es importante destacar que el NHDF negativo a EpCAM en el cocultivo permaneció viable en todo momento. En la Figura 53E se muestran imágenes fluorescentes representativas en diferentes puntos de tiempo de los videos de SKOV3. También se muestran videos de lapso de tiempo equivalentes que muestran células DLD (que son intrínsecamente más sensibles al virus) cocultivadas con NHDF.

Ejemplo de comparación 25: el acoplador de célula T Biespecífica a EpCAM puede superar la inmunosupresión, activar las células T endógenas y destruir las células tumorales endógenas dentro de la ascitis peritoneal maligna

Tres muestras clínicas de muestras de ascitis peritoneal maligna que contenían células tumorales positivas a EpCAM y fibroblastos primarios (como células de control, que no expresan EpCAM) se expandieron ex vivo y las poblaciones de células primarias mixtas se incubaron con células T derivadas de PBMC y se trataron con un acoplador de célula T Biespecífica libre o un acoplador de célula T Biespecífica a EnAd-EpCAM de 100 vp/célula en medio de cultivo. Después de 72 h, se midió el nivel de células objetivo positivas a EpCAM (Figura 55A) o fibroblastos positivos a la proteína de activación de fibroblastos no objetivo (FAP) (Figura 55B) mediante citometría de flujo. La activación de las células T se analizó al medir la expresión de CD25 (Figura 55C). El acoplador de célula T Biespecífica a EpCAM libre y los virus que expresan el acoplador de célula T Biespecífica a EpCAM indujeron la activación de las células T, lo que provocó un agotamiento de las células tumorales positivas a EpCAM, y los fibroblastos primarios positivos a FAP (EpCAM negativos) no mostraron cambios en el número. Esto se observó en todas las muestras de los pacientes, y ninguno de los otros tratamientos mostró efectos significativos. Esto demuestra que el acoplador de célula T Biespecífica a EpCAM (o virus oncolítico que lo codifica) puede mediar la activación y la citotoxicidad selectiva de las células T derivadas de PBMC en las células tumorales de ascitis ovárica humana.

Es probable que los exudados malignos representen un entorno de posible tolerancia inmunitaria con respuestas inmunitarias suprimidas que se observan comúnmente en pacientes con cáncer metastásico en estadio tardío. Para probar esta hipótesis, estimulamos policlonalmente células T derivadas de PBMC con anticuerpos anti-CD3 en medios de cultivo o la presencia de 100 % de fluido ascítico de cinco pacientes con neoplasias malignas peritoneales. Mientras que en el medio RPMI el anticuerpo anti-CD3 dio aproximadamente el 50 % de las células T positivas tanto para CD25 como para CD69, la presencia de fluido ascítico pareció atenuar la activación de las células T determinada por la disminución de la elevación mediada por anticuerpos de la expresión de CD69/CD25, y esto fue particularmente notable para el fluido del paciente #2 (Figura 56A). Esto apoya nuestra idea de que los componentes del fluido ascítico pueden ejercer un efecto inmunosupresor o tolerante. Sin embargo, esta atenuación en el aumento de los marcadores de activación no se correlacionó con una supresión de la degranulación de las células T, con una externalización de CD107a en el fluido ascítico similar a la del medio de cultivo (Figura 56B). De ello se deduce que los acopladores de célula T Biespecífica pueden ser capaces de eludir los mecanismos de inmunosupresión de células T asociados al microambiente tumoral (Nakamura y Smyth, 2016).

Por lo tanto, investigamos la capacidad de las células T derivadas de PBMC y el acoplador de célula T Biespecífica a EpCAM para mediar la citotoxicidad de las células objetivo en presencia de fluido inmunosupresor de ascitis. Las células T incubadas con fluido ascítico 1 y 2 indujeron una lisis de la estirpe celular MCF7 del adenocarcinoma de mama humana similar a la del tratamiento en medio de cultivo RPMI (medido con xCELLigence), aunque la citotoxicidad mostró un retraso de aproximadamente 8 h en presencia del fluido ascítico #2 del paciente (Figura 56C). Además del fluido inmunosupresor y las células tumorales presentes, la ascitis contiene linfocitos asociados al tumor y células de soporte del estroma tumoral, lo que proporciona un sistema modelo único similar al tumor para probar la activación mediada por el acoplador de célula T Biespecífica de células T endógenas derivadas del paciente. Tras una incubación de 24 h de las células endógenas totales y del fluido ascítico con el acoplador de célula T Biespecífica recombinante libre, se evaluó la activación de las células T de los pacientes (Figura 56D). En este entorno de gran relevancia clínica, el acoplador de célula T Biespecífica a EpCAM (pero no el homólogo de control) indujo la expresión de CD69 y CD25, aunque CD25 a niveles más bajos cuando el experimento se realizó en 100 % de fluido ascítico que en medio simple. Estos datos sugieren que el acoplador de célula T Biespecífica a EpCAM puede superar al menos algunos de los efectos inmunosupresores del fluido ascítico peritoneal para activar las células T endógenas. La citotoxicidad se evaluó al medir la liberación de LDH, y el acoplador de célula T Biespecífica causó un aumento significativo tanto cuando el experimento se realizó en medio como en 100 % de fluido ascítico. Esto indica que algunas de las células de ascitis habían sido destruidas por citotoxicidad mediada por el acoplador de célula T

Biespecífica, aunque dados los múltiples tipos de células presentes en la ascitis primaria no es posible definir qué proporción de células tumorales se destruyen.

Ejemplo de comparación 26 - El acoplador de célula T Biespecífica que expresa EpCAM puede activar las células T endógenas para destruir las células tumorales endógenas dentro de los exudados pleurales malignos

Para estudiar los efectos de los virus que expresan el acoplador de célula T Biespecífica a EpCAM en otro entorno clínicamente relevante, obtuvimos varias muestras de exudados pleurales de pacientes con una variedad de neoplasias malignas. En el cribado inicial (se muestra un ejemplo en la Figura 52), las muestras consideradas adecuadas para un análisis posterior fueron las que contenían células CD3 y positivas a EpCAM. También evaluamos la expresión de PD1 por parte de las células T endógenas después de su aislamiento inicial, y mientras que solo el 10 % de las células T derivadas de PBMC expresan PD1, todas las muestras de células T con derrame maligno fueron al menos 40 % positivas para PD1 y alcanzaron a veces hasta el 100 % (Figura 54). Las células totales no purificadas (aisladas por centrifugación y resuspendidas) se incubaron a concentraciones fijas en 100 % de fluido de derrame pleural en presencia de un acoplador de célula T Biespecífica a EpCAM libre de 500 ng/ml o un acoplador de célula T Biespecífica que codifican para virus de 100 vp/célula. Después de 5 días, se recogió la población total de células y se midió el número total de células CD3+ (Figura 57A).

En comparación con los controles sin tratar, solo las muestras que recibieron el acoplador de célula T Biespecífica a EpCAM libre o el acoplador de célula T Biespecífica a EpCAM que codifica EnAd mostraron proliferación de células T. Esto confirma que el acoplador de célula T Biespecífica a EpCAM se unía al objetivo de EpCAM y se entrecruzaba CD3 para estimular las células T endógenas. También se determinó el nivel de expresión de CD25 en las células CD3 (Figura 57B). El acoplador de célula T Biespecífica a EpCAM libre indujo una activación significativa de las células T de linfocitos asociados al tumor (evaluada por la expresión de CD25) en todas las muestras de los pacientes, incluso dentro del entorno probablemente inmunotolerante del fluido de derrame pleural. La adición de un anticuerpo bloqueante anti-PD1 no tuvo ningún efecto sobre la activación de las células T mediada por el acoplador de célula T Biespecífica a EpCAM en este entorno (Figura 54B y C). Hubo una variación notable entre pacientes (aunque poca entre muestras de un mismo paciente), con una activación que varió entre el 50 % y el 90 % dependiendo del donante. Del mismo modo, las muestras tratadas con EnAd que expresan el acoplador de célula T Biespecífica a EpCAM mostraron una alta activación en algunos pacientes (variando entre el 10-20 % hasta el 80 %, tanto para el acoplador de célula T Biespecífica a EnAd-CMV-EpCAM como para el acoplador de célula T Biespecífica a EnAd-SA-EpCAM).

Curiosamente, el paciente que mostró la activación mediada por el acoplador de célula T Biespecífica más baja también mostró el nivel más bajo de activación de células T de fondo. El EnAd parental, o los acopladores de célula T Biespecífica de control o los acopladores de célula T Biespecífica de control libre no causaron estimulación por encima del fondo.

Evaluamos la capacidad de los virus biespecíficos que expresan células T para mediar la citotoxicidad dirigida a EpCAM al medir los niveles residuales de células positivas a EpCAM mediante citometría de flujo al final de la incubación de cinco días (Figura 57C). El acoplador de célula T Biespecífica a EpCAM libre y los dos virus que codifican el acoplador de célula T Biespecífica a EpCAM causaron un marcado agotamiento de las células autólogas que expresaban EpCAM en todos los casos, mientras que los otros tratamientos tuvieron poco o ningún efecto sobre el nivel de células positivas a EpCAM. En el caso de la Muestra #1 hay una ligera disminución de la viabilidad con todos los virus basados en EnAd en comparación con el control no tratado, y es probable que esto represente los efectos de la oncólisis viral directa. Junto con la falta de influencia del anticuerpo bloqueador de PD1 en la activación de las células T, no tuvo ningún efecto sobre la destrucción de las células objetivo mediada por el acoplador de célula T Biespecífica a EpCAM, con una citotoxicidad casi completa de las células EpCAM+ (pacientes 2, 3 y 4) en ausencia del bloqueador de PD1 (Figura 54D).

Los diferentes efectos del EnAd parental y del acoplador de célula T Biespecífica a EnAd-CMV-EpCAM se muestran mediante microscopía en la Figura 57D, donde la expresión del acoplador de célula T Biespecífica reduce la presencia de células tumorales y expande la población de células T. Los gráficos de citometría de flujo asociados confirman la expansión y activación sustanciales de las células T después del tratamiento con el virus que expresa el acoplador de célula T Biespecífica a EpCAM.

Finalmente, los efectos de los diversos tratamientos se caracterizaron al medir los niveles de citocinas clave producidas utilizando una matriz de proteínas LEGENDplex (Figura 57E). Con mucho, los mayores aumentos se produjeron en el interferón gamma, que se multiplicó casi por 1000 después del tratamiento con el acoplador de célula T Biespecífica a EpCAM libre o el acoplador de célula T Biespecífica a EpCAM que codifican EnAd. Estos dos tratamientos también causaron aumentos de aproximadamente 10 veces en la expresión de IL-5, IL-13, factor de necrosis tumoral (TNF), IL17A e IL17F, características de las células T activadas. EnAd solo (o que expresa el acoplador de célula T Biespecífica de control) también causó un aumento de 10 veces en el interferón gamma, pero por lo demás ningún tratamiento causó cambios apreciables en la expresión de citocinas.

Ejemplo 27 - Discusión

Los virus oncolíticos ofrecen una nueva estrategia intrigante para combinar varias modalidades terapéuticas dentro de un solo agente dirigido y autoamplificador (Keller y Bell, 2016; Seymour y Fisher, 2016). A medida que se replican selectivamente dentro de las células cancerosas y se propagan de célula a célula, se considera que algunos virus oncolíticos median la muerte celular por rutas de muerte no apoptóticas (Ingemarsdotter et al, 2010; Li et al, 2013), como parte del proceso que permite que las partículas del virus escapen de las células moribundas. El EnAd, en particular, destruye las células mediante un proceso proinflamatorio conocido como oncolisis 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 (conocidos como patrones moleculares asociados al daño, DAMP) (Weerasinghe y Buja, 2012), y es probablemente fundamental para la capacidad del virus para promover una respuesta inmunitaria eficaz contra el cáncer. Sin embargo, además de las consecuencias de la lisis directa, los virus ofrecen el potencial de codificar y expresar otros productos biológicos contra el cáncer, lo que evita los desafíos de entrega y garantiza que el producto biológico alcance su concentración más alta dentro del microambiente tumoral. Imlytic codifica GM-CSF, sin embargo, el potencial para armar virus es prácticamente ilimitado y brinda muchas oportunidades interesantes para diseñar estrategias terapéuticas multimodales con efectos anticancerígenos aditivos o sinérgicos (de Gruijl et al, 2015; Hermiston y Kuhn, 2002).

La codificación de los acopladores de célula T Biespecífica dentro de los virus oncolíticos proporciona un medio poderoso para activar los linfocitos infiltrantes de tumores para que se conviertan en citotóxicos y lisen células objetivo positivas a antígenos, proporcionando una modalidad terapéutica completamente separada de los efectos de la lisis viral directa. En este estudio hemos demostrado que

La citotoxicidad dirigida al acoplador de célula T Biespecífica es totalmente específica del antígeno, puede ser mediada por ambas células T CD4 y CD8

(Brischwein et al, 2006) y se puede incorporar a un adenovirus oncolítico y expresar solo en células que permiten la replicación del virus. Además, el estudio actual muestra, por primera vez, que las células T endógenas dentro de las biopsias de cáncer líquido pueden ser activadas por los acopladores de célula T Biespecífica y los acopladores de célula T Biespecífica codificadas por virus y pueden destruir las células tumorales endógenas sin ninguna estimulación adicional o reversión de la inmunosupresión. Es importante destacar que esto puede suceder incluso en los fluidos primarios que componen el microambiente de la ascitis peritoneal o los derrames pleurales, como sustitutos del microambiente inmunosupresor de los tumores sólidos.

El armado de virus oncolíticos para que expresen acopladores de célula T Biespecífica combina dos mecanismos terapéuticos bastante distintos, con el primero proporcionando la muerte lítica de las células tumorales que son permisivas para la infección por virus, y el segundo dirigido a la citotoxicidad de las células T a través de un antígeno específico elegido. Esto proporciona una flexibilidad considerable en el diseño de un enfoque terapéutico, tal vez utilizando los acopladores de célula T Biespecífica para administrar citotoxicidad a las células asociadas al tumor que son relativamente resistentes a la destrucción directa del virus. Por ejemplo, si bien hemos ejemplificado la tecnología en el presente documento utilizando un acoplador de célula T Biespecífica que reconoce un antígeno asociado al carcinoma (EpCAM), también es posible utilizar el enfoque del acoplador de célula T Biespecífica para dirigir la citotoxicidad a los fibroblastos asociados a tumores u otras células estromales. De hecho, incluso cuando los objetivos para el reconocimiento del acoplador de célula T Biespecífica no se limitan a la expresión en el microambiente tumoral, al vincular la producción del acoplador de célula T Biespecífica con la replicación del virus, la expresión del acoplador de célula T Biespecífica se restringe espacialmente al tumor, minimizando las toxicidades sistémicas. Esto es importante, ya que los acopladores de célula T Biespecífica 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 objetivo (Teachey et al, 2013). La posibilidad de codificar acopladores de célula T Biespecífica dentro de virus oncolíticos se ha explorado previamente utilizando un virus vaccinia oncolítico con un acoplador de célula T Biespecífica dirigido a Efrina A2. Este agente mostró que el acoplador de célula T Biespecífica de efrina podía mediar la activación de PBMC y la destrucción de células tumorales dirigida por antígenos tanto in vitro como in vivo. Curiosamente, aunque el acoplador de célula T Biespecífica podía activar las células T, no condujo a la proliferación de células T sin la adición de IL-2 exógena, mientras que el acoplador de célula T Biespecífica utilizado en el estudio actual condujo a una proliferación extensa tanto de PBMC in vitro como de linfocitos asociados a tumores utilizando las muestras de biopsia clínica ex vivo.

Consideramos que las diferencias observadas pueden reflejar el diferente diseño del acoplador de célula T Biespecífica, los diferentes virus oncolíticos utilizados o tal vez depender de la densidad de antígenos que proporciona suficiente entrecruzamiento de CD3 en las células T.

Un objetivo central de la terapia con virus oncolíticos es crear una respuesta de células T anticancerosas que reconozca los neoantígenos específicos del paciente, así como los antígenos asociados al tumor "público". Los

virus líticos pueden hacer esto al estimular una mejor presentación de antígenos mediante la lisis de células tumorales en el contexto de DAMP junto con patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) relacionados con virus. La tinción inmunohistoquímica de tumores de colon resecados, después del suministro intravenoso de EnAd, sugiere que el virus promueve una fuerte afluencia de células T CD8⁺ en el tejido tumoral (García-Carbonero, 2017). Sin embargo, aunque este es un enfoque potencialmente muy poderoso, las respuestas adaptativas de las células T dependen en última instancia de la expresión de antígenos MHC de clase I por parte de las células tumorales, para permitir la destrucción dirigida. La pérdida de expresión de MHC es una estrategia de evasión inmunitaria bien documentada para los tumores (Garrido et al, 2016). Cabe destacar que las dos estrategias citotóxicas que son inmediatamente acopladas por los virus oncolíticos armados con el acoplador de células T Biespecífica operan independientemente de la clase MHC I por las células tumorales y, por lo tanto, se pueden emplear para destruir células cancerosas incluso cuando las células tumorales han perdido la expresión de MHC. De este modo, el presente estudio demuestra que la codificación de acopladores de célula T Biespecífica dentro de EnAd proporciona una estrategia especialmente prometedora para lograr una expresión dirigida en tumores diseminados, aprovechando la conocida estabilidad sanguínea y la biodisponibilidad sistémica del virus, que ahora se ha estudiado en varios ensayos clínicos de fase temprana. En particular, en un estudio en el que el virus se administró 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 llegado a regiones a través de los tumores y había dado fuertes señales de hexones intranucleares, lo que indica una infección exitosa y una replicación selectiva del virus en las células tumorales. Esto confirma los datos preclínicos (Di et al, 2014; Illingworth, 2017), lo que indica que este virus es estable en el 100 % de la sangre humana y debería ser capaz de infectar tumoralmente de neoplasias malignas diseminadas y metastásicas en pacientes humanos.

Los acopladores de célula T Biespecífica podrían ser codificados por EnAd sin ninguna pérdida de virulencia oncolítica (Figura 51B), lo que refleja la considerable capacidad de empaquetamiento transgénico del virus. La presencia del transgén no afectará a las propiedades fisicoquímicas de las partículas del virus, por lo que los virus modificados deben presentar exactamente la misma farmacocinética clínica que el agente parental, y deben ser capaces de expresar selectivamente el acoplador de célula T Biespecífica codificadas dentro de los tumores de todo el cuerpo. Esto proporciona un nuevo enfoque emocionante y potencialmente muy eficaz para la inmunoterapia contra el cáncer dirigida sistémicamente que ahora se debe priorizar para la evaluación clínica.

Ejemplo de comparación 28:

Inmunosupresión de la activación de células T humanas y citotoxicidad de células objetivo por fluidos de exudado maligno del paciente

Los exudados malignos representan un entorno de posible tolerancia inmunitaria con respuestas inmunitarias suprimidas que se observan comúnmente en pacientes con cáncer metastásico en estadio tardío. La cantidad de IL-10, considerada una citocina antiinflamatoria, se midió en suero normal o en fluidos de exudado maligno del paciente (A, ascitis peritoneal; P, derrame pleural) utilizando el kit ELISA MAX de IL-10 humana (Biolegend, 430604). Los niveles de IL-10 en los exudados (88.1 - 633.4 pg/ml) fueron muy superiores a los medidos en suero normal (7.2 - 10 pg/ml). Véase la figura 58.

Se investigó la capacidad de las perlas CD3/CD28 (Gibco, 11161D) para activar las células T de PBMC en presencia de suero, ascitis o fluido pleural normales. Las células T de PBMC humanas (100,000 células por pocillo en una placa de 96 pocillos) se trataron con perlas CD3/CD28 (siguiendo las instrucciones del fabricante) en suero normal o fluido de exudado del paciente (50 %). Las células T se dejaron sin tratar en cada fluido como control negativo. Después de 24 horas de cultivo, se recogieron células y se analizaron los niveles de expresión de CD69 y CD25 en las células T CD3⁺ mediante tinción de anticuerpos y citometría de flujo, representados como porcentaje de células duales positivas (células CD69+CD25⁺) (Figura 59). En suero normal, las perlas anti-CD3/CD28 dieron aproximadamente el 60 % de las células T positivas para CD25 y CD69, mientras que la presencia de fluido ascítico atenuó la activación de las células T en 6/12 fluidos.

En un experimento similar, 100,000 células T se trataron con perlas CD3/CD28 en presencia de suero normal, ascitis o fluido pleural (50 %). Se agregaron anti-CD107a o anticuerpos de control de isotipo 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 recogieron y analizaron por citometría de flujo para determinar la degranulación (Figura 60). En suero normal, las perlas anti-CD3/CD28 dieron aproximadamente el 22.5 % de las células T degranuladas, mientras que la presencia de fluido ascítico atenuó la activación de las células T en 10/12 fluidos. El nivel de degranulación fue significativamente correlativo (coeficiente de Pearson, $r = -0.7645$; $p = 0.0038$) con la cantidad de IL-10 en cada fluido (Figura 61).

En un experimento similar, se cocultivaron 75,000 células T con 15,000 SKOV3 y EpCAM en presencia de suero, ascitis o fluido pleural normales (50 %). Las células T se trataron con un acoplador de célula T Biespecífica de control en cada fluido como control negativo. Después de 24 horas de cultivo, se recogieron células y se analizaron los niveles de expresión de CD69 y CD25 en las células T CD3⁺ mediante tinción de

anticuerpos y citometría de flujo, representados como porcentaje de células duales positivas (células CD69+CD25+) (Figura 62). En suero normal, el acoplador de célula T Biespecífica a EpCAM dio aproximadamente el 67.6 % de las células T positivas para CD25 y CD69, mientras que la presencia de fluido ascítico atenuó la activación de las células T en 0/12 fluidos y la activación ligeramente inducida en 4/10 fluidos.

En un experimento similar, 75,000 células T fueron cocultivadas con 15,000 SKOV3 y EpCAM en presencia de suero, ascitis o fluido pleural normales (50 %). Las células T se trataron con un acoplador de célula T Biespecífica de control en cada fluido como control negativo. Se agregaron anti-CD107a o anticuerpos de control de isotipo 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 recogieron y analizaron por citometría de flujo para determinar la degranulación (Figura 63). En suero normal, las perlas de captación de acoplador de célula T Biespecífica a EpCAM dieron aproximadamente el 41.4 % de las células T degranuladas, mientras que la presencia de fluido ascítico atenuó la activación de las células T en 2/12 fluidos.

Se evaluó la capacidad del acoplador de célula T Biespecífica a EnAd-SA-EpCAM y del acoplador de célula T Biespecífica a EnAd-SA-Control para inducir la lisis de células objetivo mediada por células T en fluidos de exudado maligno utilizando la tecnología xCELLigence. Las células SKOV se sembraron en una placa E de 48 pocillos a 1e4 células/pocillo, respectivamente. Las placas se incubaron durante 18 h, a 37 °C, 5 % de CO₂, antes de que las células se infectaran con 100 partículas de virus por célula (ppc) o se dejaran sin infectar. Después de dos horas, se agregaron células T de PBMC (5:1) en suero normal o fluido exudado del paciente (final, 50 %). Se utilizó xCELLigence para medir la citotoxicidad de la célula objetivo cada 10 minutos (Figura 64). Los resultados sugieren que la lisis de SKOV3 mediada por el acoplador de célula T Biespecífica por células T es independiente del fluido utilizado.

Las células de ascitis no purificadas (por lo tanto, sin cambios desde que se recibieron) se siembran a 100,000 células por pocillo de una placa de fondo plano de 96 pocillos en medio RPMI o fluido ascítico. Las células se trataron con acoplador de célula T Biespecífica a EpCAM o de control, y los pocillos sin tratar sirvieron como control negativo. Después de la incubación a 37C durante 24 horas, se recogieron células y se determinó el nivel de expresión de CD25 y CD69 en células CD3 (Figura 65). Los resultados demuestran que el acoplador de célula T Biespecífica a EpCAM dio lugar a un aumento significativo de la activación de las células T (CD69/CD25 dual positivo) de los linfocitos asociados a tumores, ligeramente aumentada por el fluido ascítico.

En un experimento similar, las células de ascitis no purificadas (por lo tanto, sin cambios desde que se recibieron) se siembran a 100,000 células por pocillo de una placa de fondo plano de 96 pocillos en medio RPMI o fluido ascítico. Las células se trataron con virus del acoplador de célula T Biespecífica a EpCAM o de control o acoplador de célula T Biespecífica recombinante (100 vp/célula), y los pocillos sin tratar sirvieron como control negativo (Figura 66). Después de la incubación a 37C durante 5 días, se recogió la población celular total y se determinó el número de células CD3+ (Figura 66A) y el nivel de expresión de CD25 en las células CD3 (Figura 66B) y el número de células endógenas EpCaM+ determinadas por citometría de flujo (Figura 66C). El número total de células por pocillo se determinó utilizando perlas de conteo de precisión. Los resultados demuestran que el acoplador de célula T Biespecífica a EpCAM y el acoplador de célula T Biespecífica que expresan EpCAM dieron lugar a un aumento significativo de la activación de las células T (número de CD3, CD25) de los linfocitos asociados a tumores y a la citotoxicidad de las células EpCAM+ tanto en el medio RPMI como en el fluido ascítico.

Como una extensión del experimento anterior, seis muestras más de exudado de pacientes (para un total de 7) se trataron de manera idéntica en fluido ascítico (Figura 67) y el número de CD3+ (Figura 67A), la expresión de CD25 de las células T (Figura 67B) y el número de células EpCAM+ (Figura 67C) se determinaron utilizando citometría de flujo. Los resultados muestran que el acoplador de célula T Biespecífica a EpCAM y el acoplador de célula T Biespecífica que expresan EpCAM dieron lugar a un aumento significativo de la activación de las células T (número de CD3, CD25) de los linfocitos asociados a tumores y a la citotoxicidad de las células EpCAM+ de forma reproducible en un rango de muestras de biopsia de exudado.

Ejemplo 29

El acoplador de célula T Biespecífica a FAP media la activación de las células T y la destrucción de las células FAP+ por diferentes células T donantes

En otros experimentos, se utilizaron los métodos descritos en el Ejemplo 2 para evaluar adicionalmente las propiedades activadoras de las células T de la proteína del acoplador de célula T Biespecífica a FAP recombinantes probadas en cocultivos de células NHDF y células T, en comparación con el acoplador de célula T Biespecífica de control y la activación de células T policlonales utilizando Dinaperlas anti-CD3/CD28.

Los sobrenadantes tomados después de 24 horas de cultivo se probaron mediante ELISA para IFN γ (Figura 68A) y mediante una matriz de perlas de citocinas (panel de citocinas auxiliares humanas LEGENDplex,

BioLegend #74001) para un panel de citocinas (Figura 68B). El acoplador de célula T Biespecífica de control no indujo cambios significativos en ninguna citocina, sin embargo, el acoplador de célula T Biespecífica a FAP condujo a fuertes aumentos en el interferón gamma, IL-2, TNF α , IL-17 e IL-10, consistente con la estimulación de diferentes subconjuntos de células T, y la producción de IFN γ fue mucho mayor que la desencadenada por anti-CD3/CD28.

La estimulación con el acoplador de célula T Biespecífica a FAP, pero no con el acoplador de célula T Biespecífica de control, en presencia de linfocitos NHDF también indujo una rápida degranulación (dentro de las 6 horas) de las células T, tanto los subconjuntos de CD4 $^{+}$ como CD8 $^{+}$, según lo determinado por la externalización de CD107a/LAMP1 en la superficie de las células T (según se evalúa por citometría de flujo), que es fuertemente correlativo con su capacidad para destruir células objetivo (Figura 69AyB). Esta inducción de la degranulación por el acoplador de célula T Biespecífica a FAP se tradujo en una potente lisis de fibroblastos (Figura 69C), medida por la liberación de LDH después de 24 h de cocultivo con células T de PBMC (EC $_{50}$ de ~2.5 ng/ml) con activación inducida de células T y citotoxicidad observada utilizando 6/6 células T donantes (Figura 69D). No se indujo citotoxicidad por el acoplador de célula T Biespecífica de control, lo que concuerda con que las células T permanecen en un estado inactivado.

Ejemplo 30

Efecto de los virus del acoplador de célula T Biespecífica a FAP y el acoplador de célula T Biespecífica a EnAd-FAP en células de muestras de ascitis maligna primaria de diferentes pacientes con cáncer

Como seguimiento de los estudios descritos en el Ejemplo 16, se obtuvieron ascitis peritoneales malignas primarias frescas de otros pacientes con cáncer para el estudio de las actividades del virus acoplador de célula T Biespecífica a EnAd FAP. Tres muestras de pacientes que contenían células tumorales EpCAM $^{+}$ y fibroblastos FAP $^{+}$ se expandieron ex vivo, y las poblaciones de células mixtas (adherentes) se cultivaron con células T derivadas de PBMC y virus EnAd que expresan el acoplador de célula T Biespecífica o no modificada. Después de 72 h, se recogieron las células totales y se determinó el número de células FAP $^{+}$ (Figura 70A) y EpCAM $^{+}$ (Figura 70B) mediante citometría de flujo. Adicionalmente, se midió el estado de activación de las células T (por la expresión de CD25) (Figura 70C). La infección tanto con el acoplador de célula T Biespecífica a EnAd-CMV-FAP como con el acoplador de célula T Biespecífica a EnAd-SA-FAP indujo la activación de las células T y el agotamiento de las células FAP $^{+}$ en todas las muestras de pacientes, sin cambios significativos en los niveles de células tumorales EpCAM $^{+}$. El EnAd parental o los virus de control no indujeron ninguna activación observable de las células T, y el número de células FAP $^{+}$ permaneció similar al del control no infectado. Es importante destacar que esta depleción de los fibroblastos FAP $^{+}$ condujo consistentemente a una fuerte reducción en los niveles de la citocina inmunosupresora TGF β detectada en los sobrenadantes (Figura 70D).

En una segunda serie de experimentos, se evaluaron células totales (y no purificadas) de cinco muestras de biopsia de pacientes para evaluar la actividad de las células T endógenas asociadas a tumores en las muestras. Las células se sembraron en 50 % de fluido ascítico y se trataron con proteínas recombinantes del acoplador de célula T Biespecífica a FAB o de control, o 100 vp/célula de virus EnAd o del acoplador de célula T Biespecífica a EnAd-. Después de 5 días de incubación, se midió la activación de las células T (por expresión de CD25) y el número residual de células FAP $^{+}$ utilizando citometría de flujo (Figura 71AyB). En las 3 muestras de pacientes, el acoplador de célula T Biespecífica a FAP recombinante y el acoplador de célula T Biespecífica a EnAd-CMV-FAP indujeron una fuerte activación de las células T, con hasta ~80 % de las células T derivadas del paciente activadas, lo que causó un marcado agotamiento de los fibroblastos FAP $^{+}$. Curiosamente, el acoplador de célula T Biespecífica a EnAd-SA-FAP indujo la expresión de CD25 en 2/3 muestras, sin activación observable ni agotamiento de células FAP $^{+}$ en el paciente 1. Esto se debe probablemente a la insuficiencia de células tumorales para la infección por el virus y la producción de proteína del acoplador de célula T Biespecífica (no se detectaron células tumorales EpCAM $^{+}$ en esta muestra por citometría de flujo), lo que es coherente con la necesidad de células tumorales para la expresión de transgenes impulsada por MLP (SA) (esto probablemente también explica la falta de activación de las células T y el agotamiento de las células FAP $^{+}$ por el virus del acoplador de célula T Biespecífica a EnAd-SA-FAP con la muestra de ascitis del paciente ilustrada en las Figs. 42-44). En conjunto, los datos muestran que el acoplador de célula T Biespecífica a FAP que expresa EnAd puede, tras la infección de las células tumorales, conducir de forma reproducible a la activación de las células T asociadas al tumor para destruir los fibroblastos endógenos.

Otro experimento investigó si la actividad del acoplador de célula T Biespecífica a FAP se podría mejorar al bloquear el punto de control de PD-1, utilizando una muestra de biopsia de paciente en la que las células T tenían un 73.6 % de PD-1 positivo y las células FAP $^{+}$ eran un 62.9 % de PDL1 positivo (Figura 72A). Se establecieron cocultivos similares a los descritos anteriormente en presencia o ausencia de un anticuerpo IgG2b bloqueante de ratón purificado contra PDL1 humano (BioLegend, clon 29E.2A3) a una concentración final de 2.5 μ g/ml. Después de 2 días de cultivo, se recogieron las células totales y se midió la activación de las células FAP $^{+}$ residuales y las células T. La inclusión del anticuerpo bloqueante anti-PDL1 condujo a un modesto aumento en la inducción de CD25 (Figura 72B) y una producción de IFN γ dos veces mayor (Figura 72C), sin

alterar el agotamiento de las células FAP+ (Figura 72D) con una lisis casi completa en el día 2 en ninguno de los entornos.

Se ha informado que los linfocitos asociados a tumores (TAL) aislados de la ascitis de pacientes con cáncer de ovario tienen una expresión enriquecida de PD-1 y funciones efectoras deterioradas, incluyendo citotoxicidad y producción de IFN γ . De acuerdo con esto, la expresión de PD-1 fue 2 veces mayor en las células CD3+ de seis biopsias de ascitis de pacientes con cáncer que en las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de tres donantes sanos (Figura 73A). Para evaluar la funcionalidad de las células T dentro de estas muestras de biopsia de cáncer, las células NHDF y las células PBMC o ascitis no purificadas (el % de células CD3+ para cada una de las muestras se muestra en la Figura 73B) se cocultivaron con sobrenadantes que contenían el acoplador de célula T Biespecífica a FAP o de control, y los sobrenadantes se recogieron 5 días después y se probaron para IFN γ mediante ELISA (Figura 73C). No se indujo IFN γ por el acoplador de célula T Biespecífica de control. 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 acoplador de célula T Biespecífica a FAP. A continuación, investigamos la capacidad de estas células T para inducir la lisis mediada por el acoplador de célula T Biespecífica de las células NHDF. Se colocó una placa de NHDF y se agregaron células PBMC o ascitis junto con sobrenadantes que contenían el acoplador de célula T Biespecífica y se monitorizó en tiempo real la viabilidad de las células en el cultivo utilizando el sistema de ensayo de citotoxicidad xCELLigence. A pesar de la variabilidad en la producción de IFN γ , todas las muestras de ascitis indujeron una citotoxicidad completa de las células NHDF cuando se agregaron con el acoplador de célula T Biespecífica a FAP, con una tasa general similar de lisis de NHDF mediada por el acoplador de célula T Biespecífica a la observada cuando se efectúa con PBMC (Figura 73D).

Para investigar si el acoplador de célula T Biespecífica a FAP puede mediar la activación de células T en presencia de muestras de exudado maligno del paciente (todas al 50 %), las células T de PBMC se activaron con acopladores de célula T Biespecífica a FAP o de control en presencia de células NHDF, o se activaron con Dinaperlas anti-CD3/CD28, ya sea en suero humano (NS) normal al 50 % o en muestras de exudado maligno diferentes (sin células). Mientras que en el suero normal el 74 % de las células T se activaron (doble positivo tanto para CD25 como para CD69) a las 24 h tras la estimulación con las perlas anti-CD3/CD28, el fluido ascítico probado 3/5 atenuó significativamente la activación de las células T en comparación con la respuesta en el SN (Figura 74A). Sin embargo, cuando las PBMC se cultivaron con NHDF y se estimularon con el acoplador de célula T Biespecífica a FAP, no hubo supresión observable de la activación de las células T en presencia de ninguno de los fluidos de exudado (Figura 74B), lo que demuestra que el acoplador de célula T Biespecífica a FAP puede superar los mecanismos inmunosupresores para activar las células T.

Ejemplo 31:

La oncólisis mediada por el acoplador de célula T Biespecífica a EnAd-FAP y la estimulación de células T polarizan los TAM CD11b+ en la ascitis de pacientes a un fenotipo más activado

Para investigar si la producción de citocinas Th1, que incluyen IFN γ , TNF α e IL-2, mediante la activación de células T mediada por el acoplador de célula T Biespecífica a FAP, y la posterior eliminación de fibroblastos FAP+ (y la reducción asociada en TGF β 1 se asoció con otros cambios en el microambiente tumoral de inmunosupresor y prooncogénico hacia actividad antitumoral), se evaluó el efecto sobre los macrófagos asociados al tumor (TAM) en una muestra de células de ascitis no separadas. El total de células de ascitis de los pacientes no purificadas se sembraron en 50 % de fluido ascítico y se trataron con un acoplador de célula T Biespecífica a FAP o de control libre o se infectaron con un acoplador de célula T Biespecífica a EnAd-SA-control o un virus del acoplador de célula T Biespecífica a EnAd-SA-FAP (a 100 vp/célula). Paralelamente, algunas células se trataron con IFN γ para inducir un fenotipo de células mieloides CD11b activadas. Después de 3 días de incubación, primero se midió el estado de activación de las células T; Células CD25+ medidas por citometría de flujo y secreción de IFN γ por ELISA.

El tratamiento con el acoplador de célula T Biespecífica a FAP y el acoplador de célula T Biespecífica a EnAd-SA-FAP condujo a que aproximadamente el 60 % de las células T CD3+ se convirtieran en CD25+ (Figura 75A) y a grandes cantidades de IFN γ en sobrenadantes de cultivo (Figura 75B). No se observó ningún aumento por encima del nivel de fondo por parte del virus de control o del acoplador de célula T Biespecífica de control para la expresión de CD25 o IFN γ . Para evaluar la polarización de TAM, se midieron los niveles de expresión de CD64 y CD86 (marcadores de macrófagos M1 o 'activados') y CD206 y CD163 (marcadores M2 o TAM) en células CD11b+ utilizando citometría de flujo (Figura 75C). El tratamiento con un acoplador de célula T Biespecífica a FAP libre o un acoplador de célula T Biespecífica que expresan FAP en EnAd induce un fenotipo más activado, que se manifiesta por aumentos significativos en la expresión de CD64 y fuertes disminuciones de CD206 y CD163, similar a lo observado cuando se introdujo IFN γ en los cultivos.

Si bien el tratamiento con un virus del acoplador de célula T Biespecífica a FAP o de control libre no indujo ningún cambio claro en CD86 antes de los antecedentes en este experimento, el acoplador de célula T Biespecífica a FAP que expresa EnAd indujo un gran aumento en la expresión de CD86, lo que indica que la

infección por el virus EnAd y la actividad del acoplador de célula T Biespecífica a FAP se pueden sinergizar para activar las células mieloides primarias dentro de un microambiente tumoral supresor tal como las muestras de fluido ascítico maligno probadas en el presente documento. En este estudio, el tratamiento con IFN γ indujo una disminución modesta de CD86, lo que indica que el fuerte aumento de CD86 observado por el acoplador de célula T Biespecífica a EnAd-SA-FAP puede deberse a un mecanismo independiente de IFN γ .

Ejemplo 32:

El acoplador de célula T Biespecífica a EnAd-FAP activa los linfocitos infiltrantes de tumores e induce citotoxicidad en biopsias sólidas de tumores de próstata ex vivo

Los cultivos de cortes 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 el acoplador de célula T Biespecífica a FAP en este entorno de gran relevancia clínica, se estudiaron varias biopsias en sacabocados emparejadas de tejido prostático maligno y benigno de próstatas humanas resecadas. En el cribado inicial, se demostró de forma reproducible que el tejido prostático tenía anillos circulares de células tumorales EpCAM⁺ (Figura 76A) intercalados entre grandes regiones del estroma que contenían células T CD8 dispersas (Figura 76B). Se encontró tinción de FAP en fibroblastos adyacentes a regiones tumorales (Figura 76C).

Los núcleos se cortaron con un vibratomo a 300 μ m de grosor y se cortaron los cultivos establecidos en presencia de virus (1.5e9 vp/corte), o se dejaron sin infectar. Después de 7 días, los cortes se fijaron, se incluyeron en parafina, se seccionaron y se evaluó el estado de activación de las células T mediante inmunohistoquímica (IHQ) mediante tinción para la expresión de CD25 (Figura 76D). Solo las muestras que recibieron el acoplador de célula T Biespecífica a EnAd-CMV-FAP o el acoplador de célula T Biespecífica a EnAd-SA-FAP mostraron activación de células T infiltrantes de tumores, que se manifiesta por tinción fuerte de CD25. Ni los virus tratados con virus sin tratar ni los tratados con control tenían células CD25 positivas detectables. Los sobrenadantes de estos cultivos de cortes tomados a los 4 y 7 días después de la infección se analizaron para IFN γ e IL-2 mediante ELISA, y se detectaron aumentos de IFN γ en cultivos de corte de próstata malignos, pero no benignos, infectados con el virus del acoplador de célula T Biespecífica a FAP (Figura 76E) e IL-2 detectado en cultivos con el virus del acoplador de célula T Biespecífica a EnAd-SA-FAP (Figura 76F). El acoplador de célula T Biespecífica a EnAd-SA-FAP indujo mayores cantidades de IFN γ , que fueron detectables antes, que el virus acoplador de célula T Biespecífica a FAP impulsado por CMV.

Ejemplo 33 – Virus EnAd que expresan acopladores de célula T Biespecífica a EpCAM o FAP

Se generaron cinco virus (NG-611, NG-612, NG-613, NG-614, NG-617) que codifican un solo acoplador de célula T Biespecífica (Tabla 8).

Tabla 8

ID de Virus	Casete de transgén
NG-611 (SEQ ID NO: 96)	SSA ¹ -acoplador de célula T Biespecífica a EpCam ² -His ³ -PA ⁴
NG-612 (SEQ ID NO: 97)	SSA ⁴ -acoplador de célula T Biespecífica a FAP ⁵ -His ³ -PA ⁴
NG-613 (SEQ ID NO: 98)	SA ⁶ -acoplador de célula T Biespecífica a FAP ⁵ -His ³ -PA ⁴
NG-614 (SEQ ID NO: 99)	SA ⁶ -acoplador de célula T Biespecífica a FAP ⁷ -His ³ -PA ⁴
NG-617 (SEQ ID NO: 100)	SSA ⁴ -acoplador de célula T Biespecífica a FAP ⁵ -PA ⁴
¹ SEQ ID NO. 55; ² SEQ ID NO. 83; ³ SEQ ID NO. 84; ⁴ SEQ ID NO. 65; ⁵ SEQ ID NO. 85; ⁶ SEQ ID NO. 86; ⁷ SEQ ID NO. 87	

En cada casete de transgén, el ADNc que codifica el acoplador de célula T Biespecífica estaba flanqueado en el extremo 5' con una secuencia aceptora de empalme corta (SSA, ID DE SECUENCIA NO: 55) o una secuencia de aceptor de empalme más larga (SA, ID DE SECUENCIA NO: 86). En el extremo 3' del acoplador de célula T Biespecífica, se codificó una secuencia de poli(A) tardía SV40 (PA, ID DE SECUENCIA NO: 65) precedida por una etiqueta de histidina (HIS, SEQ ID NO. 41) o ninguna etiqueta. En los virus NG-611, NG-612, NG-613 y NG-617, la porción anti-CD3 de la molécula del acoplador de célula T Biespecífica utilizó una variante de cadena única del anticuerpo monoclonal OKT3 anti-CD3 ϵ humano en ratón.

Producción de virus

El plásmido pEnAd2.4 se utilizó para generar los plásmidos pNG-611, pNG-612, pNG-613, pNG-614 y pNG-617 mediante la inserción directa de casetes transgénicos sintetizados (SEQ ID NOs: 88-92, respectivamente). El casete de transgén pNG-611 codifica para un acoplador de célula T Biespecífica dirigido a EpCam (SEQ ID NO. 93), los casetes de transgenes pNG-612, pNG-613 y pNG-617 codifican un acoplador de célula T Biespecífica dirigido a FAP de la SEQ ID NO. 94 y el casete de transgén pNG-614 codifica un acoplador de célula T Biespecífica dirigido a FAP de la SEQ ID NO. 95. Los esquemas de los casetes de transgenes se muestran en las Figuras 77A a C. La construcción del ADN plasmídico se confirmó mediante análisis de restricción y secuenciación de ADN.

Los plásmidos, pNG-611, pNG-612, pNG-613, pNG-614 y pNG-617, fueron linealizados por digestión de restricción con la enzima *Ascl* para producir los genomas del virus. Los virus se amplificaron y purificaron de acuerdo con los métodos que se indican a continuación.

El ADN digerido se purificó mediante extracción de fenol/cloroformo y se precipitó durante 16 horas, a -20 °C en 300 µl de etanol >95 % de grado de biología molecular y 10 µl de acetato de sodio 3M. El ADN precipitado se granuló por centrifugación a 14000 rpm, 5 minutos y se lavó en 500 µl de etanol al 70 %, antes de centrifugar nuevamente, 14000 rpm, 5 min. El sedimento de ADN limpio se secó al aire, se resuspendió en OptiMEM de 500 µl que contenía 15 µl de reactivo de transfección de lipofectamina y se incubó durante 30 min, RT. A continuación, la mezcla de transfección se agregó gota a gota a un matraz T-25 que contenía 293 células cultivadas al 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 medio celular (DMEM glucosa alta con glutamina suplementada con 2 % de FBS) a las células y los matraces se incubaron a 37 °C, 5 % de CO₂.

Las 293 células transfectadas se monitorizaron cada 24 horas y se complementaron con medios adicionales cada 48-72 horas. La producción del virus se monitorizó mediante la observación de un efecto citopático significativo (CPE) en la monocapa celular. Una vez que se observó un CPE extenso, el virus se recogió de 293 células mediante tres ciclos de congelación y descongelación. Los virus recogidos se utilizaron para reinfectar 293 células con el fin de amplificar las existencias de virus. La producción viable del virus durante la amplificación se confirmó mediante la observación de CPE significativo en la monocapa celular. Una vez que se observó el CPE, el virus se recogió de 293 células mediante tres ciclos de congelación y descongelación. Las existencias amplificadas de virus se utilizaron para una mayor amplificación antes de que los virus se purificaran mediante bandas dobles de cloruro de cesio para producir existencias de virus purificadas.

Actividad viral evaluada por qPCR

Las células A549, infectadas durante 72 horas con 1 ppc NG-611, NG-612, NG-617, enadenotucirev o no infectadas, se utilizaron para la cuantificación del ADN viral mediante qPCR. Los sobrenadantes celulares se recogieron y clarificaron por centrifugación durante 5 min, 1200 rpm. El ADN se extrajo de 45 µl de sobrenadante utilizando el kit Qiagen DNeasy, de acuerdo con el protocolo de Turer. También se preparó y extrajo una curva estándar utilizando partículas de virus enadenotucirev (2.5e10-2.5e5vp) utilizando el kit DNeasy. Cada muestra o patrón extraído se analizó mediante qPCR utilizando una sonda de cebado específica del gen del virus configurada con el gen E3 temprano.

La cuantificación del número de genomas de virus detectados por célula demostró que NG-611, NG-612 y NG-617 mostraron una replicación significativa del genoma en estirpes celulares A549 (Figura 77D). Esto fue similar para todos los virus analizados, incluido el virus parental enadenotucirev, lo que indica que la inclusión del transgén acoplador de célula T Biespecífica no afecta la actividad replicativa del virus. No se pudieron detectar genomas de virus en células no infectadas (datos no mostrados).

Activación y degranulación de células T mediada por virus que expresan un acoplador de célula T Biespecífica. Infección de células de carcinoma

Las células A549 se sembraron en placas de 24 pocillos a una densidad de 2.5e5 células/pocillo. Las placas se incubaron durante 4 horas, a 37 °C, 5 % de CO₂, antes de que las células se infectaran con 1ppc de NG-611, NG-612, enadenotucirev o se dejaran sin infectar. A las 24, 48 o 72 horas después de la infección, se recogieron sobrenadantes de las células, se clarificaron mediante centrifugación durante 5 minutos, 1200 rpm y se congelaron rápidamente.

Ensayo de células T

Las estirpes celulares de fibroblastos de pulmón MRC-5 que expresan FAP o EpCam que expresan células de carcinoma de ovario, SKOV3 se sembraron en placas de 48 pocillos a densidades de 5.7e4 células/pocillo y 1.2e5 células/pocillo, respectivamente. Las placas se incubaron durante 4 horas, a 37 °C, 5 % de CO₂, antes de reemplazar el medio con 150 µl/pocillo de sobrenadante descongelado recogido de las placas A549. A continuación, también se agregaron a las placas células T CD3 purificadas aisladas de donantes humanos de PBMC para obtener una proporción de células T con respecto a MRC-5 o SKOV3 de 2 a 1. Los cocultivos se

incubaron durante 16 horas, a 37 °C, 5 % de CO₂ antes de que se recogieran los sobrenadantes celulares para el análisis de ELISA y se recogieran las células T para el análisis de citometría de flujo. Los medios de cultivo que contenían células no adherentes se retiraron de los pocillos de cocultivo y se centrifugaron (300xg). El sobrenadante se retiró cuidadosamente, se diluyó 1 en 2 con PBS 5 % de BSA y se almacenó para el análisis ELISA. Las monocapas de células adherentes se lavaron una vez con PBS y luego se separaron con tripsina. La tripsina se inactivó utilizando un medio FBS RPMI al 10 % y las células se agregaron a los gránulos celulares que se habían recogido de los sobrenadantes del cultivo. Las células se centrifugaron (300xg), se desechó el sobrenadante y se lavó el sedimento celular en 200 µl de PBS. Las células se centrifugaron de nuevo y luego se resuspendieron en 50 µl de PBS que contenía agua viva/muerta (Life tech) durante 15 minutos a RT. Las células se lavaron una vez en el tampón de FAC antes de tñirlas con paneles de anticuerpos conjugados directamente: anti-CD3 conjugados con AF700; anti-CD25 conjugado con BV421; anti-HLA-DR conjugado con PE/CY5; anti-CD40L conjugado con BV605; anti-CD69 conjugado a PE y anti-CD107a conjugado a FITC. Una muestra de células de cada condición de cocultivo también se tñió con anticuerpos de control de isotipo relevantes. Toda la tñición se llevó a cabo en tampón FACs en un volumen total de 50 µl/pocillo durante 15 minutos, 4 °C. A continuación, las células se lavaron dos veces con tampón FACs (200 µl) antes de la resuspensión en 200 µl de tampón FACs y el análisis por citometría de flujo (Attune).

Regulación al alza de los marcadores de activación de las células T

El análisis de citometría de flujo de la activación de células T se evaluó mediante la expresión de los marcadores de activación de células T CD25, CD69, HLA-DR y CD40L o el marcador de degranulación de células T, CD107a en células vivas individuales. Estos datos mostraron que cuando se cocultivaron con células EpCam+ SKOV3, el número de células T que expresaban CD25, CD69, HLA-DR, CD40L o CD107a de la superficie celular aumentó significativamente cuando se agregaron sobrenadantes NG-611 a las células en comparación con NG-612, enadenotucirev o sobrenadantes de control sin tratar (Figura 78). Para todos estos marcadores, los sobrenadantes de las células A549 infectadas estimularon poca activación de las células T durante 24 horas, sin embargo, 48 horas después de la infección, los sobrenadantes estimularon una activación significativa de las células T en todos los marcadores. Este también fue el caso a las 72 horas después de la infección.

Cuando se cocultivaron con células FAP+ MRC-5, el número de células T que expresaban CD25, CD69, HLA-DR, CD40L o CD107a en la superficie celular aumentó significativamente cuando se agregaron sobrenadantes NG-612 a las células en comparación con NG-611, enadenotucirev o sobrenadantes de control sin tratar (Figura 79). También se pudo observar cierta activación de células T con el virus NG-611, lo que probablemente se debió a una expresión baja pero detectable de EpCam (~5 %) en las estirpes celulares MRC-5 que interactúan con el acoplador de célula T Biespecífica a EpCAM expresado por el virus NG-611 (Figura 80). Para todos estos marcadores, la activación de las células T pequeñas fue estimulada por los sobrenadantes de las células A549 infectadas durante 24 horas, sin embargo, a las 48 horas después de la infección, los sobrenadantes estimularon una activación significativa de las células T en todos los marcadores. Los marcadores CD25 y CD69 también se regularon al alza después de la incubación con sobrenadantes recogidos 72 horas después de la infección, sin embargo, los marcadores de activación, HLA-DR, CD40L y CD107a se detectaron en niveles más bajos con sobrenadantes recogidos 72 horas después de la infección que 48 horas después de la infección. Esto podría deberse a los altos niveles de acoplador de célula T Biespecífica presentes en este último estadio de la infección, lo que conduce a una activación rápida y potente de las células T, lo que significa que las funciones efectoras deben medirse en puntos de tiempo 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 un tampón de ensayo 5 % de BSA/PBS (en un rango de 1:10 a 1:1000) y se llevó a cabo ELISA utilizando el kit ELISA Quantikine IFN gamma Humano (RyD systems) de acuerdo con el protocolo del fabricante. La concentración de IFN γ secretado se determinó al interpolar a partir de la curva estándar. La expresión de IFN γ solo pudo detectarse en los sobrenadantes de los cocultivos utilizando NG-611 en células SKOV3 (Figura 81A) o NG-611, NG-612 en células MRC-5 (Figura 81B).

Ejemplo 34: Activación inmunitaria y eficacia antitumoral de virus que expresan el acoplador de célula T Biespecífica in vivo

Se implantaron células madre hematopoyéticas CD34+ humanizadas de ratones NSG (de Jackson Labs) con células tumorales HCT116 por vía subcutánea en ambos flancos 18 semanas después del injerto. Una vez que los tumores alcanzaron los 80-400 mm³, los ratones se agruparon de tal manera que cada brazo de tratamiento tenía una distribución equivalente de volúmenes tumorales, 7 ratones por grupo. A los ratones se les inyectó por vía intratumoral solución salina, enadenotucirev o NG-611 a 5 X 10⁹ partículas por inyección, 2 inyecciones por tumor. Se trataron los tumores en ambos flancos. El volumen tumoral se midió 3-4 veces por semana y demostró que el tratamiento con NG-611 dio lugar a una respuesta antitumoral significativa hasta 20 días después de la administración en comparación con enadenotucirev o controles sin tratar (Figura 82a). Después de los 20 días posteriores a la dosificación, un tumor de 4 ratones de cada grupo se procesó para la citometría de flujo, mientras que los tumores restantes se congelaron en hielo seco.

Citometría de flujo

Las muestras tumorales se desagregaron mecánicamente inmediatamente después de la resección en un pequeño volumen de medios RPMI. A continuación, los tumores disgregados se pasaron a través de un filtro de células de 70 µm y se centrifugaron a 300 g durante 10 minutos. Los sedimentos celulares se resuspendieron en 100 µl de PBS que contenía agua viva/muerta (Life tech) durante 15 minutos en hielo. Las células se lavaron una vez en tampón FACS (5 % de BSA PBS) antes de tefirlas 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 un conjunto de suspensiones de células tumorales con anticuerpos de control de isotipo relevantes. Toda la tinción se llevó a cabo en tampón FACS en un volumen total de 50 ml/pocillo durante 20 minutos a 4 °C. Las células se lavaron tres veces con tampón FACS (200 µl) antes de la resuspensión en 200 µl de tampón FACS y el análisis por citometría de flujo (Attune). El análisis de FACS demostró que la relación de células T CD8 y 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 82b).

Ejemplo 35: virus EnAd que coexpresan acopladores de célula T Biespecífica a FAP y citocinas y quimiocinas inmunomoduladoras

Se generaron tres virus (NG-615, NG-640 y NG-641) que codificaron un acoplador de célula T Biespecífica a FAP y proteínas inmunomoduladoras (Tabla 9).

Tabla 9

ID del virus	Casete de transgén
NG-615 (SEQ ID NO: 101)	SSA ¹ -acoplador de célula T Biespecífica a FAP ² -E2A ³ -Fit3L ⁴ -P2A ⁵ -MIP1α ⁶ -T2A ⁷ -IFNα ⁸ -PA ⁹
NG-640 (SEQ ID NO: 102)	SSA ¹ -acoplador de célula T Biespecífica FAP ² -P2A ⁵ -CXCL10 ¹⁰ -T2A ⁷ -CXCL9 ¹¹ -PA ⁶
NG-641 (SEQ ID NO: 103)	SSA ¹ -acoplador de célula T Biespecífica a FAP ⁵ -P2A ⁵ -CXCL10 ¹⁰ -T2A ⁷ -CXCL9 ¹¹ -E2A ³ -IFNα ⁸ -PA ⁶
NG-615 (SEQ ID NO: 298)	SA ¹² -acoplador de célula T Biespecífica FAP ² -E2A ³ -Fit3L ⁴ -P2A ⁵ -MIP1α ⁶ -T2A ⁷ -IFNα ⁸ -PA ⁹
¹ SEQ ID NO. 55; ² SEQ ID NO. 87; ³ SEQ ID NO. 63; ⁴ SEQ ID NO. 105; ⁵ SEQ ID NO. 61; ⁶ SEQ ID NO. 107; ⁷ SEQ ID NO. 64; ⁸ SEQ ID NO. 109; ⁹ SEQ ID NO. 65; ¹⁰ SEQ ID NO. 110; ¹¹ SEQ ID NO. 111; ¹² SEQ ID NO. 86	

Producción de virus

El plásmido pEnAd2.4 se utilizó para generar los plásmidos pNG-615, pNG-616, pNG-640 y pNG-641 mediante la inserción directa de casetes transgénicos sintetizados (SEQ ID NOs: 112-114, respectivamente). NG-615 y NG-616 contienen cuatro transgenes que codifican un acoplador de célula T Biespecífica dirigido a FAP (SEQ ID NO. 94), Fit3L (SEQ ID NO. 115), MIP1α (SEQ ID NO. 116) e IFNα (SEQ ID NO. 117). NG-640 y NG-641 codifican para un acoplador de célula T Biespecífica dirigido a FAP (SEQ ID NO. 94), CXCL9 (SEQ ID NO. 118) y CXCL10 (SEQ ID NO. 119), NG-641 también contiene un cuarto transgén que codifica IFNα (SEQ ID NO. 117). Los esquemas de los casetes de transgenes se muestran en las Figuras 83A a C. La construcción del ADN plasmídico se confirmó mediante análisis de restricción y secuenciación de ADN.

Los plásmidos, pNG-615, pNG-616, pNG-640 y pNG-641, se linealizaron por digestión de restricción con la enzima AscI para producir los genomas del virus. Los virus se amplificaron y purificaron de acuerdo con los métodos detallados en el Ejemplo 33.

Actividad viral evaluada por qPCR y ELISA transgénica

Infección de carcinoma celular

Se utilizaron células A549 infectadas durante 72 horas con 1ppc NG-615, enadenotucirev o no infectadas para la cuantificación del ADN viral mediante qPCR y el análisis de la expresión transgénica mediante ELISA. Los sobrenadantes celulares se recolectaron y clarificaron por centrifugación durante 5 min, 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 la muestra sobrenadante utilizando el kit Qiagen DNeasy, de acuerdo con el protocolo del fabricante. También se preparó una curva estándar utilizando partículas de virus enadenotucirev (2.5e10-2.5e5vp) y se extrajo utilizando el kit DNeasy. Cada muestra extraída o estándar se analizó mediante qPCR utilizando un cebador-sonda específico del gen del virus ajustado al gen E3 temprano. La cuantificación del número de genomas de virus detectados por célula demostró que NG-615 mostró una replicación significativa del genoma en estirpes celulares A549 a un nivel similar al del virus parental enadenotucirev (Figura 84). Estos datos indicaron que la inclusión del acoplador de célula T Biespecífica y tres transgenes inmunomoduladores no afecta significativamente la actividad replicativa del virus. No se pudieron detectar genomas de virus en células no infectadas.

ELISA

El ELISA de IFN α se llevó a cabo utilizando el kit de IFN alfa humano Verikine (Pbl assay science), el ELISA de MIP1 α se llevó a cabo utilizando el kit de ELISA humano CCL3 Quantikine (RyD systems) y el ELISA de Flt3L se llevó a cabo utilizando el kit de ELISA humano Flt3L (Abcam). Todos los ensayos se llevaron a cabo de acuerdo con el protocolo de los fabricantes.

Las concentraciones de IFN α , MIP α o Flt3L secretadas se determinaron interpolando a partir de las curvas estándar. La expresión de IFN α , MIP1 α y Flt3 L pudo detectarse en el sobrenadante celular de NG-615, pero no en enadenotucirev ni en células control sin tratar (Figura 85).

Activación y degranulación de células T mediada por virus que expresan un acoplador de célula T Biespecífica. Infección de células de carcinoma

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

Ensayo de células T

Las estirpes celulares MRC-5 de fibroblastos pulmonares que expresan FAP se sembraron en 48 placas de pocillos a una densidad de 5.7e4 células/pocillo. Las placas se incubaron durante 4 h, a 37 °C, 5 % de CO₂, antes de reemplazar el medio con 150 μ l/pocillo de sobrenadante descongelado recogido de las placas A549. A continuación, también se agregaron a las placas células T CD3 purificadas aisladas de donantes humanos de PBMC para obtener una relación de células T con respecto a MRC-5 de 2 a 1. Los cocultivos se incubaron durante 16 h, a 37 °C, 5 % de CO₂ antes de que se recolectaron sobrenadantes celulares para el análisis de ELISA y se recogieran células T para el análisis de citometría de flujo de acuerdo con los métodos detallados en el Ejemplo 29.

Regulación al alza de los marcadores de activación de las células T

El análisis de citometría de flujo de la activación de células T se evaluó mediante la expresión de los marcadores de activación de células T CD25, CD69, HLA-DR y CD40L o el marcador de degranulación de células T, CD107a en células vivas, CD3+, individuales. Estos datos mostraron que cuando se cocultivaron con células FAP+ MRC-5, el número de células T que expresaban CD25, CD69, HLA-DR, CD40L o CD107a aumentó significativamente cuando se agregaron sobrenadantes NG-615 o 612 a las células en comparación con enadenotucirev o sobrenadantes de control sin tratar (Figura 86).

Secreción de la citocina estimuladora IFN γ

Para la detección de la expresión de IFN γ , los sobrenadantes de cocultivo se diluyeron en un tampón de ensayo 5 % de BSA/PBS (en un rango de 1:10 a 1:1000) y se llevó a cabo ELISA utilizando el kit de IFN gamma Quantikine humano (RandD Systems) de acuerdo con el protocolo del fabricante. La concentración de IFN γ secretado se determinó al interpolar a partir de la curva estándar. La expresión de IFN γ solo se pudo detectar en los sobrenadantes de los cocultivos utilizando sobrenadantes A549 infectados con NG-612 o NG-615 (Figura 87).

Ejemplo 36: Virus EnAd que coexpresa un acoplador de célula T Biespecífica dirigido a FAP y un acoplador de célula T Biespecífica dirigido a EpCam

Se generó el virus NG-618 que codificó dos moléculas del acoplador de célula T Biespecífica, una dirigida a EpCam (acoplador de célula T Biespecífica a EpCAM) y otra dirigida a FAP (acoplador de célula T Biespecífica a FAP) (Tabla 10).

5

Tabla 10

ID de virus	Casete de transgén
NG-618 (SEQ ID NO: 120)	SSA ¹ -acoplador de célula T Biespecífica a EpCAM ² -P2A ³ -acoplador de célula T Biespecífica a FAP ⁴ -PA ⁵
¹ SEQ ID NO. 55; ² SEQ ID NO. 121; ³ SEQ ID NO. 106; ⁴ SEQ ID NO. 122; ⁵ SEQ ID NO. 65	

Producción de virus

El plásmido pEnAd2.4 se utilizó para generar el plásmido pNG-618 mediante la inserción directa de casetes de transgén sintetizados (SEQ ID NO. 123). El virus NG-618 contiene dos transgenes que codifican un acoplador de célula T Biespecífica dirigido a EpCAM (SEQ ID NO. 93) y un acoplador de célula T Biespecífica dirigido a FAP (SEQ ID NO. 95). En la Figura 88 se muestra un esquema del casete del transgén. La construcción del ADN plasmídico se confirmó mediante análisis de restricción y secuenciación de ADN.

El plásmido pNG-618, fue linealizado por digestión de restricción con la enzima AclI para producir los genomas del virus. Los virus se amplificaron y purificaron de acuerdo con los métodos detallados en el Ejemplo 33.

Activación y degranulación de células T mediada por virus que expresan el acoplador de célula T Biespecífica. Infección de células de carcinoma

20

Las células A549 se sembraron en placas de 6 pocillos a una densidad de 1.2e6 células/pocillo. Las placas se incubaron durante 4 h, a 37 °C, 5 % de CO₂, antes de que las células se infectaran con NG-611, NG-612, NG-618, enadenotucirev o se dejaran sin infectar. A las 72 horas después de la infección, los sobrenadantes se recogieron de las células y se clarificaron mediante centrifugación durante 5 min, a 1200 rpm.

25

Ensayo de células T

Las estirpes celulares de fibroblastos pulmonares MRC-5 y EpCam que expresan células A549 que expresan FAP se sembraron en placas de 24 pocillos a una densidad de 1.5e5 células/pocillo. Las células MRC-5 y A549 también se mezclaron en una relación de 1 a 1 y se sembraron en 24 placas con una densidad total de células de 1.5e5 células/pocillo. Las placas se incubaron durante 4 h, a 37 °C, 5 % de CO₂, antes de que se reemplazaran los medios con 300 µl/pocillo de sobrenadante descongelado recogido de las placas A549. A continuación, también se agregaron a las placas células T CD3 purificadas aisladas de donantes humanos de PBMC para obtener una relación de células T con respecto a las células MRC-5 o SKOV3 de 2 a 1. Los cocultivos se incubaron durante 16 horas, a 37 °C, 5 % de CO₂ antes de que se recolectaron los sobrenadantes celulares para el análisis ELISA y se recogieran las células T, MRC-5 y A549 para el análisis de citometría de flujo.

Detección de FAP y EpCam en células MRC-5 o SKOV

40

El análisis de citometría de flujo de FAP o EpCam detectables en la superficie de las células MRC-5 o SKOV, respectivamente, se evaluó al lavar las células una vez en tampón FACs antes de tñirlas con paneles de anticuerpos directamente conjugados: anti-FAP conjugado con AF647; anti-EpCam conjugado con PE. El análisis mostró que la expresión de FAP ya no era detectable en las células MRC-5 que habían sido incubadas con sobrenadante de células infectadas con el virus que expresa el acoplador de célula T Biespecífica a FAP, NG-618, pero se detectó en el >80 % de las células incubadas con sobrenadantes de células tratadas con EnAd, o en las células sin tratar (Figura 89A). Estos datos indican que el acoplador de célula T Biespecífica a FAP producido por los virus NG-618 se une a su objetivo FAP en las células MRC-5 ocluyendo la unión del anticuerpo anti-FAP. Se evaluaron las células SKOV vivas, grandes y de células individuales para determinar la expresión detectable de EpCam. La expresión de EpCam solo fue detectable a niveles bajos en las células SKOV que habían sido incubadas con sobrenadantes de células infectadas con el virus que expresa el acoplador de célula T Biespecífica a EpCAM, NG-618 (17 % de las células), pero se detectó en el >40 % de las células incubadas con sobrenadantes de células tratadas con EnAd o de las células sin tratar (Figura 89B). En conjunto, estos datos indican que NG-618 produce moléculas del acoplador de célula T Biespecífica que se unen a las proteínas objetivo EpCam y FAP.

55

Regulación al alza de los marcadores de activación de las células T

El análisis de citometría de flujo de la activación de células T se evaluó mediante la expresión de los marcadores de activación de células T CD25, CD69, HLA-DR y CD40L o el marcador de degranulación de células T, CD107a en células vivas CD3+ individuales. Estos datos mostraron que cuando se cocultivaron con células FAP+ MRC-5, el número de células T que expresaban CD25, CD40L o CD107a aumentó significativamente cuando se agregaron sobrenadantes NG-618 a las células en comparación con enadenotucirev o sobrenadantes de control sin tratar (Figura 90). El número de células T que expresan CD25, CD40L o CD107a también aumentó significativamente cuando se agregaron sobrenadantes NG-618 a las células EpCam+ SKOV3 en comparación con enadenotucirev o sobrenadantes de control sin tratar (Figura 91). Estos datos demuestran que ambas moléculas del acoplador de célula T Biespecífica expresadas por el virus NG-618 son funcionales en términos de inducir la activación de las células T.

Análisis de la destrucción de células objetivo mediada por células T (MRC-5 y SKOV)

El análisis de citometría de flujo de la viabilidad de las células MRC-5 y SKOV se evaluó al tefir las células en 50 µl de PBS que contenían agua viva/muerta (Life tech) durante 15 minutos en RT. Las células se lavaron una vez en el tampón de FACs antes de tefirlas con paneles de anticuerpos directamente conjugados: anti-FAP conjugados con AF647; anti-EpCam conjugado con PE. La viabilidad de las células MRC-5 y SKOV se redujo significativamente después de la incubación con muestras de sobrenadante NG-618, mientras que no se detectó una muerte celular significativa en los sobrenadantes de control enadenotucirev o sin tratar Figura 92. Estos datos demuestran la capacidad funcional de NG-618 que coexpresan los acopladores de célula T Biespecífica dirigidos a FAP y EpCam para inducir la destrucción celular mediada por células T de las células objetivo.

Secuencias

SEQ ID NO: 25: acoplador de célula T Biespecífica a FAP-P2A-RFP (*CURSIVA* = líder, **NEGRILLA** = sitio de escisión de furina, SUBRAYADO = secuencia P2A, minúscula = RFP)

MGWSCILFLVATATGVHSDIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLYSRNQKNYLAWYQQKPGQPPKLLIFWASTRESGVDPDRFSGSGFGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYFSYPLTFGQGTKEIKGGGGSGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKTSRYTFTEYTIHWVRQAPGQRLEWIGGINPNNGIPNYNQKFKGRV

*TITVDTASTAYMELSSLRSEDVAVYYCARRRIAYGYDEGHAMDYWGQGLTVTVSSGGGGSDVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYTFTRYTMHWVRQAPGQGLEWIGYINPSRGYTNYADSVKGRFTITTDKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTITVTVSSGEGTSTGSGGGSGGGGADDIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSYMNWYQQKPGKAPKRWIYDTSKVASGVPARFSGSGSGTDYSLTINSLEAEDAATYYCQWSSNPLTFGGGTKEIKHHHHHHHHHRRKRGSGATNFSLLKQAGDVEENPGP*mselikenmhmky megtvnnhhfktsegegkpyegtqtmkikvveggplpfadilatsfmygskafinhtqgipdffkqsfpegftwerittyedggvltatqdtstfngciinyvkingvnfpnsgpvmqkktgrgweantemlypadgggrghsqmalkivgggylhcsfkttyrskkpaknlkmpgfhvdhrlerikeadketyveqhemavakycdlpsklghr**

SEQ ID NO: 26: Acoplador de célula T Biespecífica (Anti-FHA) de control-P2A-RFP (*CURSIVA* = líder, **NEGRILLA** = sitio de escisión de furina, SUBRAYADO = secuencia P2A, minúscula = RFP)

*MGWSCILFLVATATGVHSELDIVMTQAPASLAVSLGQRATISCRASKSVSSSGYNYLHWYQQKPGQPPKLLIYLASNLESGVPARFSGSGSGTDFTLNHPVEEEDAATYYCQHSREFPLTFGAGTKLEIKSSGGGGSGGGGGSSSRSSLEVQLQQSGPELVKPGASVKISCKTSGYTFTRYTMHWVRQSHGKSLEWIGGINPKNGGIYNQKFQGKATLTVDKSSSTASMEISRSLTSDDSAVYYCARRVYDDYPYYAMDYWGQGTSTVTVSSAKTTPPSVTSGGGSDVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYTFTRYTMHWVRQAPGQGLEWIGYINPSRGYTNYADSVKGRFTITTDKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTITVTVSSGEGTSTGSGGGSGGGGADDIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSYMNWYQQKPGKAPKRWIYDTSKVASGVPARFSGSGSGTDYSLTINSLEAEDAATYYCQWSSNPLTFGGGTKEIKHHHHHHHHHRRKRGSGATNFSLLKQAGDVEENPGP*mselikenmhmky megtvnnhhfktsegegkpyegtqtmkikvveggplpfadilatsfmygskafinhtqgipdffkqsfpegftwerittyedggvltatqdtstfngciinyvkingvnfpnsgpvmqkktgrgweantemlypadgggrghsqmalkivgggylhcsfkttyrskkpaknlkmpgfhvdhrlerikeadketyveqhemavakycdlpsklghr**

SEQ ID NO: 33: Secuencia aceptora de empalme

ES 2 983 916 T3

CAGG

SEQ ID NO: 55 Secuencia de ADN de aceptor de empalme corto (SSA) (secuencia nula)

5 CAGG

SEQ ID NO: 58 secuencia de Kozak (secuencia nula)

10 CCACC

REIVINDICACIONES

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

5 5'ITR-B₁-B_A-B₂-B_X-B_B-B_Y-B₃-3'ITR (I)

en la que:

B₁ es un enlace o comprende: E1A, E1B o E1A-E1B;

10

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

B₂ es un enlace o comprende: E3;

15

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;

20

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

B₃ es un enlace o comprende: E4;

25

en la que el adenovirus codifica un Acoplador de célula T Biespecífica en la posición B_Y que comprende al menos dos dominios de unión en los que:

uno de los dichos dominios es específico a un componente del complejo receptor de células T (TCR); y

30

otro de los dichos dominios es específico a un antígeno estromal tumoral;

en el que el adenovirus es Enadenotucirev (EnAd) o adenovirus de serotipo 11 (Ad11); y

35

en el que el antígeno estromal tumoral se selecciona de: proteína de activación de fibroblastos (FAP), TREM1, IGFBP7, FSP- 1, receptor del factor- α de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR- α), receptor del factor- β de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR- β) y vimentina.

2. Un adenovirus oncolítico de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el adenovirus es EnAd.

40

3. Un adenovirus oncolítico de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en el que el componente del TCR es CD3.

4. Un adenovirus oncolítico de acuerdo con la reivindicación 3, en el que el componente del TCR es CD3 ϵ .

45

5. Un adenovirus oncolítico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el antígeno estromal tumoral es FAP.

6. Un adenovirus oncolítico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el adenovirus es competente para replicación.

50

7. Un adenovirus oncolítico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el Acoplador de célula T Biespecífica codificado en la posición B_Y está bajo el control del promotor tardío principal.

8. Un adenovirus oncolítico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el adenovirus codifica además un segundo Acoplador de célula T Biespecífica.

55

9. Un adenovirus oncolítico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el Acoplador de célula T Biespecífica codificado comprende un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 8, o una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la misma y un VL que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 9 o una secuencia al menos 95 % idéntica a la misma, y en el que el Acoplador de célula T Biespecífica es específico a CD3.

60

10. Un adenovirus oncolítico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el Acoplador de célula T Biespecífica codificado comprende un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 13, o una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la misma y un VL que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 12 o una

65

secuencia al menos 95 % idéntica a la misma, y en el que el Acoplador de célula T Biespecífica es específico a FAP.

5 11. Un adenovirus oncolítico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que el adenovirus comprende al menos un transgén adicional, en el que el transgén adicional codifica una citocina, quimiocina o un inmunomodulador.

10 12. Un adenovirus oncolítico de acuerdo con la reivindicación 11, en el que la citocina o quimiocina se selecciona de MIP1 α , IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-9, IL-12, IL-13, IL-17, IL-18, IL-22, IL-23, IL-24, IL-25, IL-26, IL-27, IL-33, IL-35, IL-2, IL-4, IL-5, IL-7, IL-10, IL-15, IL-21, IL-25, IL-1RA, IFN α , IFN β , IFN γ , TNF α , linfotóxina α (LTA), Flt3L, GM-CSF, IL-8, CCL2, CCL3, CCL5, CCL17, CCL20, CCL22, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL13, CXCL12, CCL2, CCL19 y CCL21.

15 13. Un adenovirus oncolítico de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el adenovirus comprende una secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 36, 37, 81, 82, 97, 98, 99 o 100.

14. Un adenovirus oncolítico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que el adenovirus codifica 2, 3 o 4 transgenes adicionales.

20 15. Una composición que comprende un adenovirus de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, y un diluyente o portador.

25 16. Un adenovirus oncolítico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 o una composición de acuerdo con la reivindicación 15, para uso en un método para tratar un paciente.

17. Un adenovirus oncolítico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 o una composición de acuerdo con la reivindicación 15, para uso en el tratamiento de cáncer.

30 18. Un adenovirus oncolítico para uso en un método de tratamiento dirigido a células estromales tumorales, en el que el adenovirus comprende una secuencia de la fórmula (I):



en el que:

35 B₁ es un enlace o comprende: E1A, E1B o E1A-E1B;

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

40 B₂ 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;

45 B_B comprende L5;

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

B₃ es un enlace o comprende: E4;

50 en el que el adenovirus codifica un Acoplador de célula T Biespecífica en la posición B_Y que comprende al menos dos dominios de unión en los que:

uno de los dichos dominios es específico a un componente del complejo receptor de células T (TCR); y

55 otros de los dichos dominios es específico a un antígeno estromal tumoral expresado en fibroblastos, macrófagos asociados a tumores, células dendríticas, células NK y/o células T que se han infiltrado en el estroma; y

60 en el que el adenovirus es Enadenotucirev (EnAd) o adenovirus de serotipo 11 (Ad11).

Figura 1A

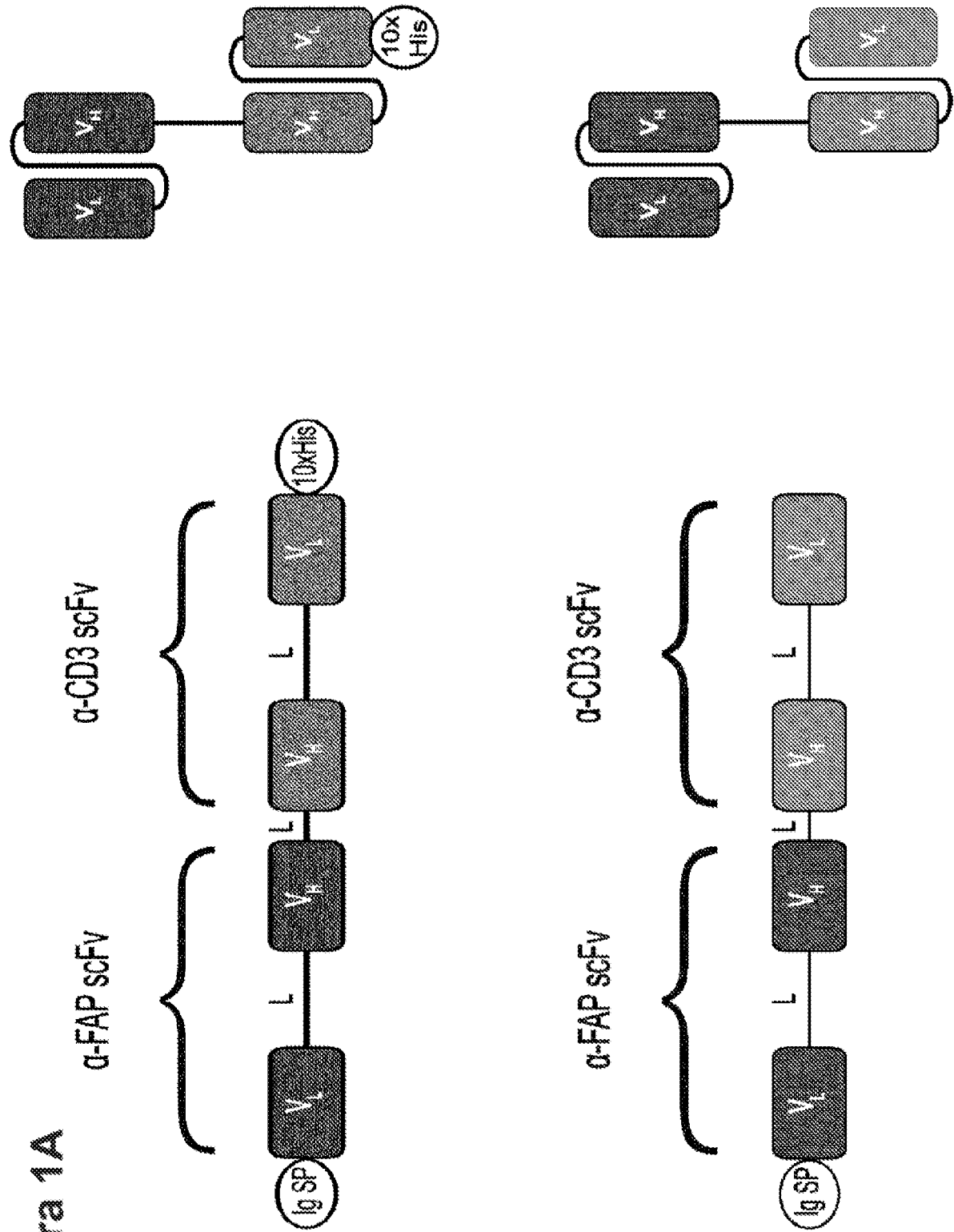
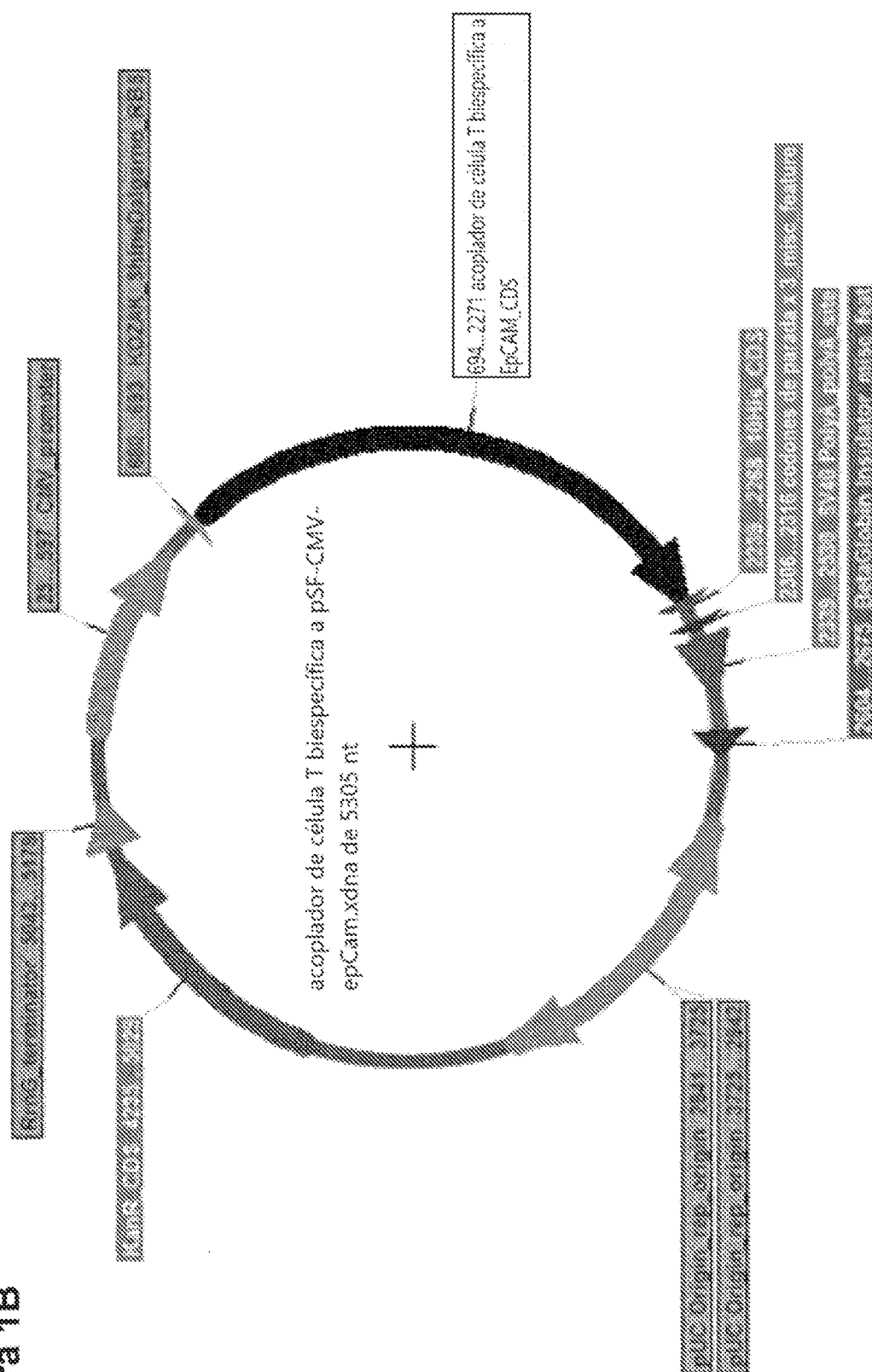
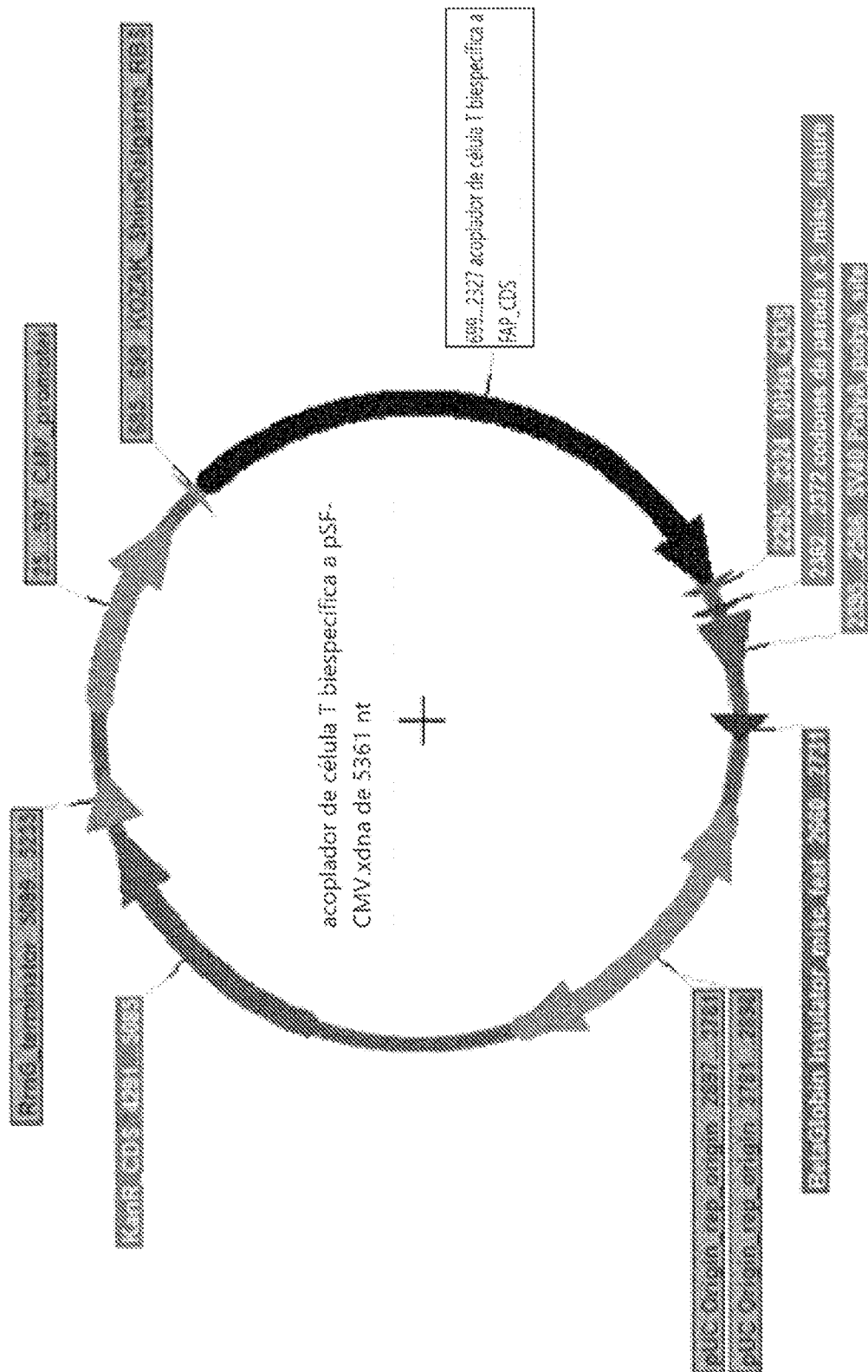


Figura 1B



1995



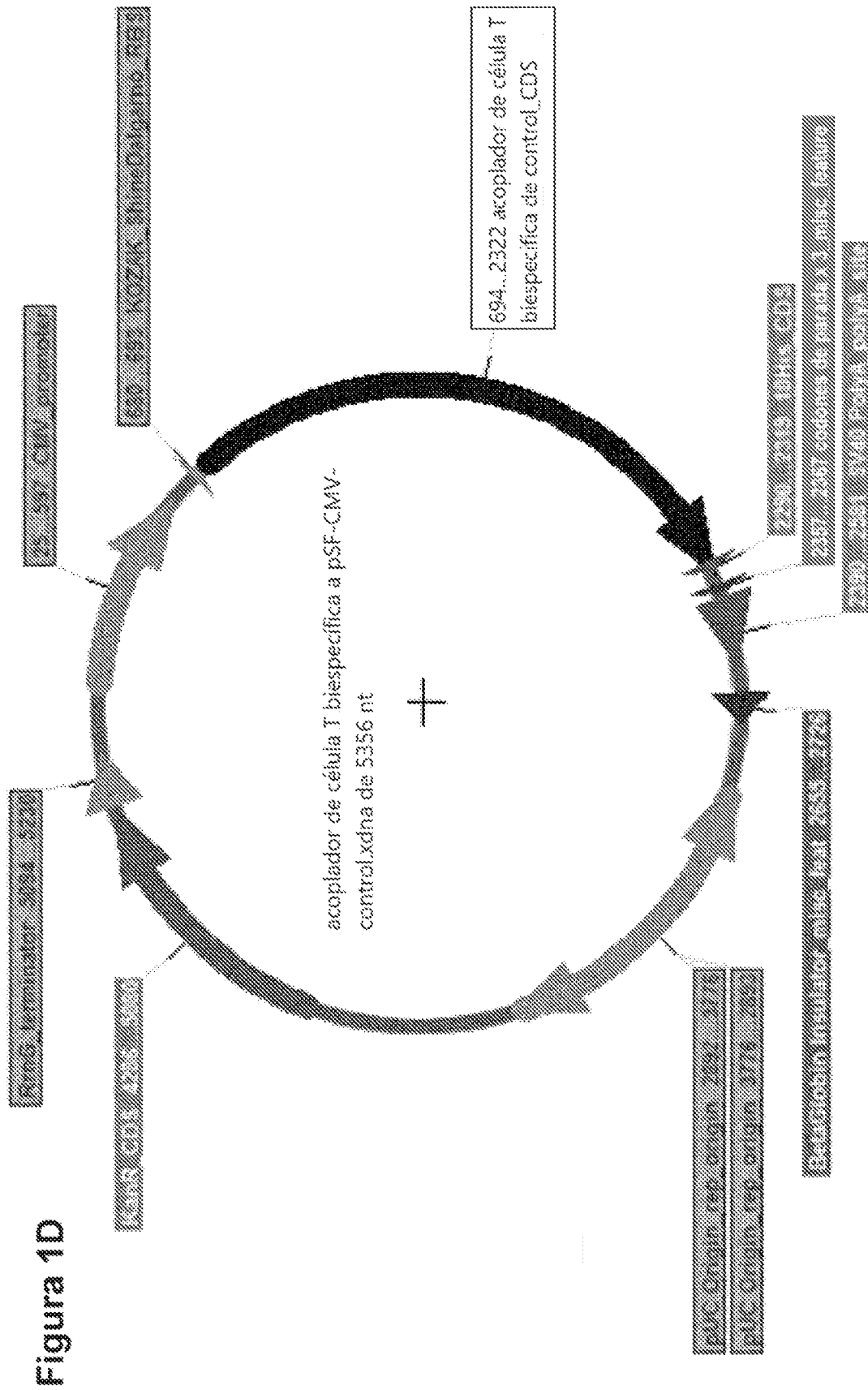


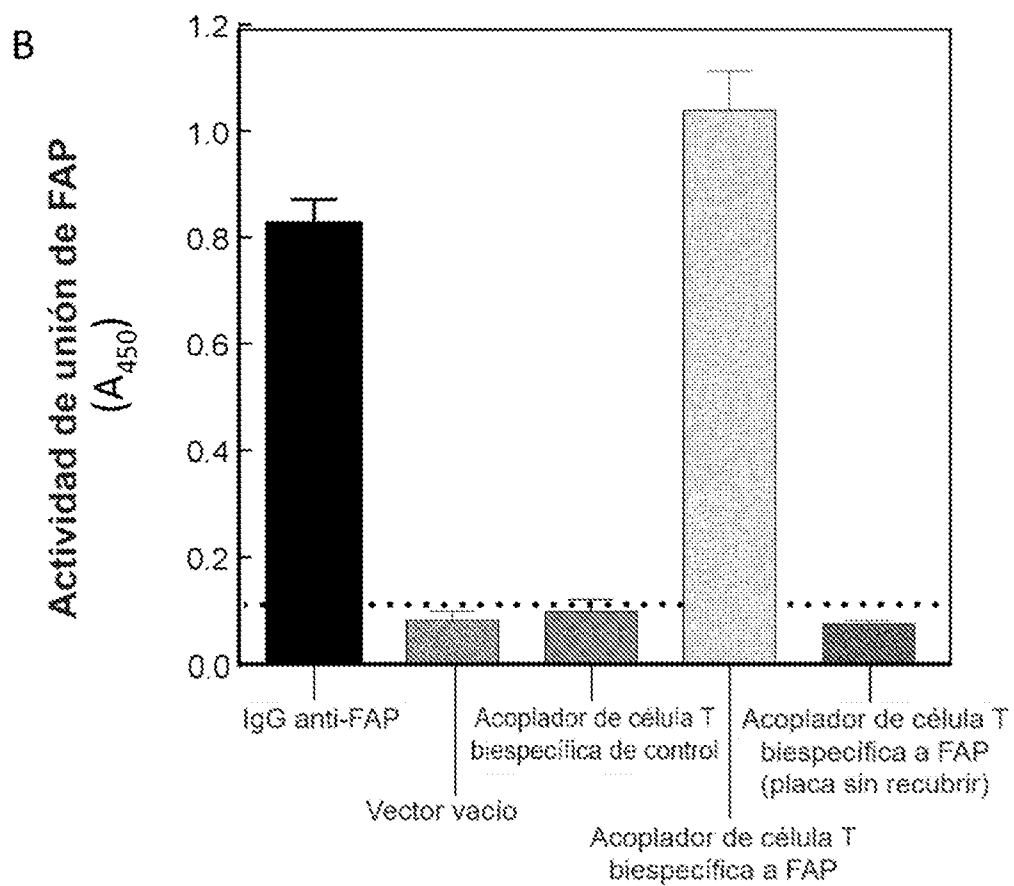
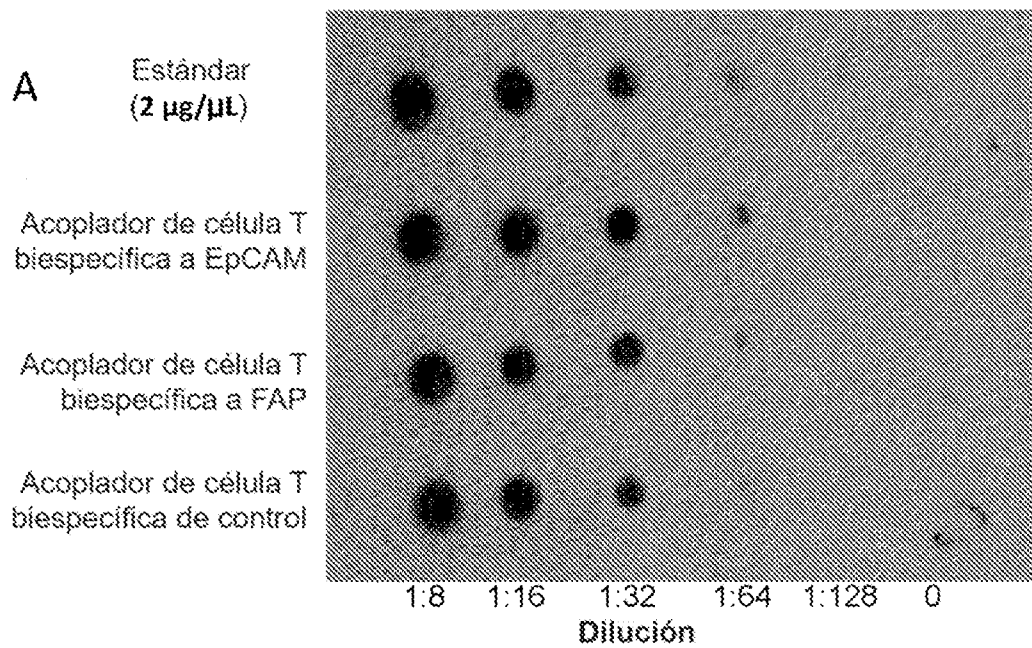
Figura 2

Figura 2C

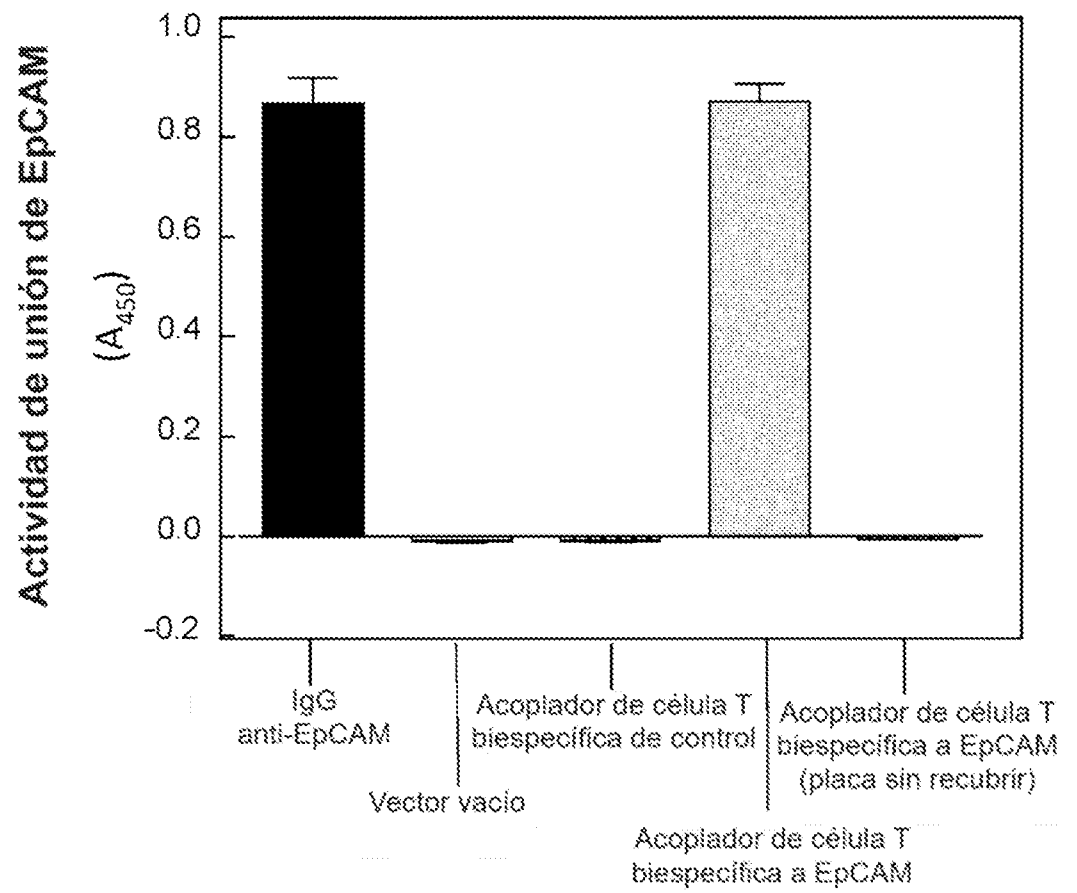


Figura 3A

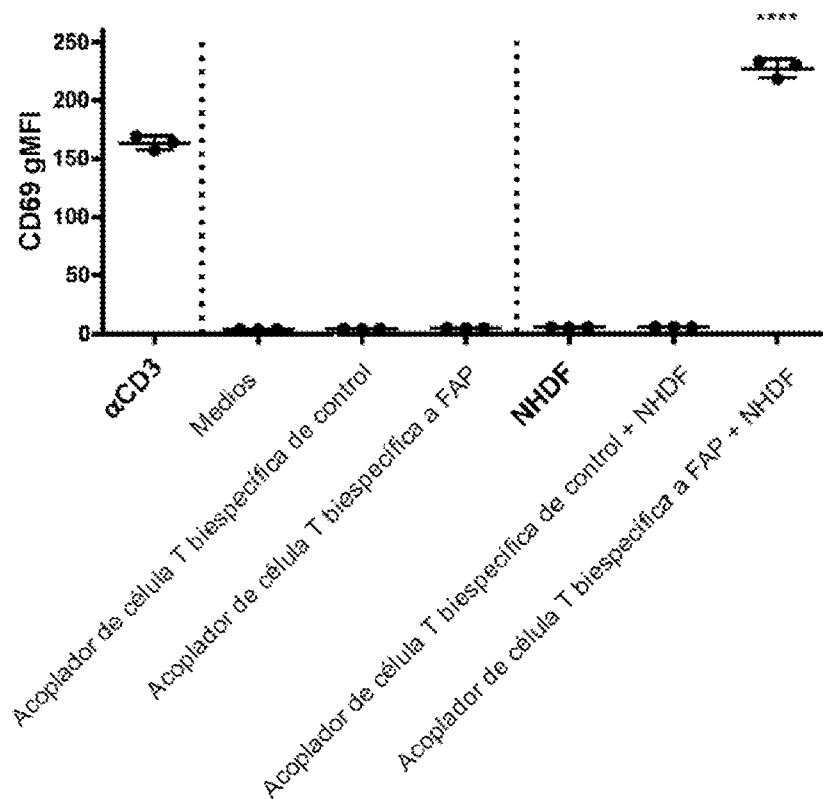
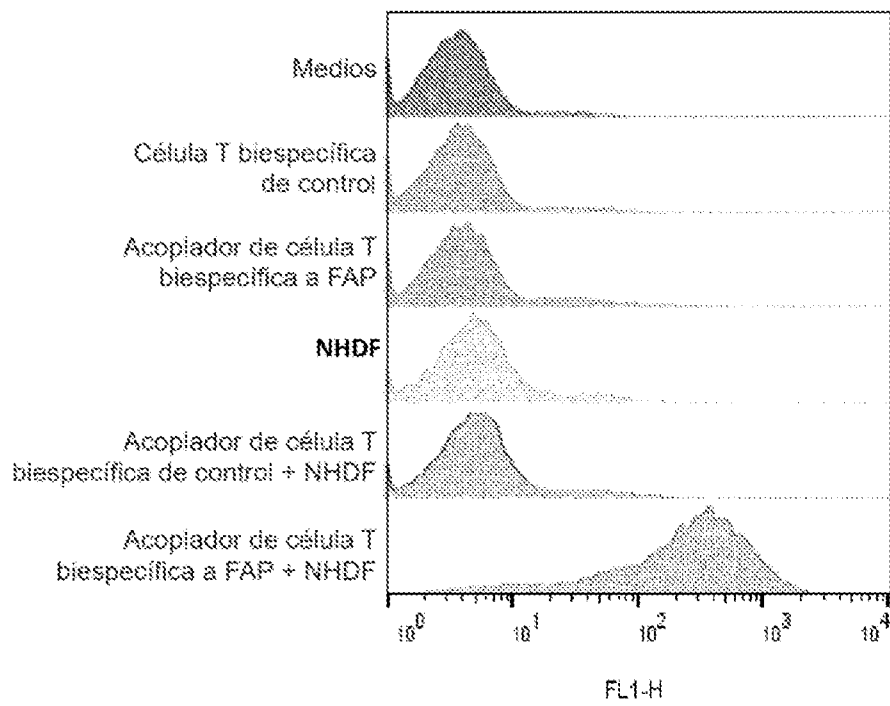


Figura 3B

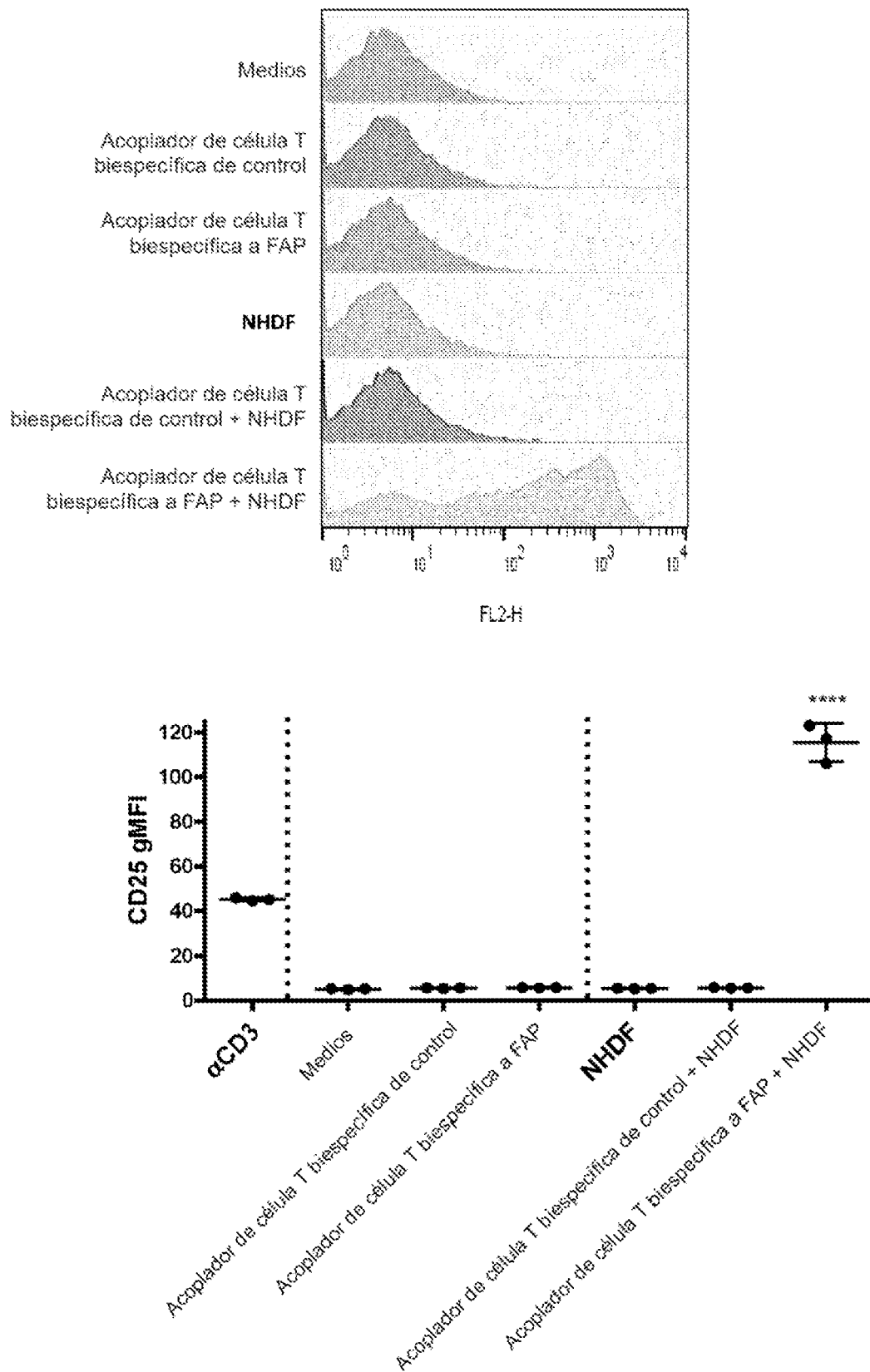


Figura 4A

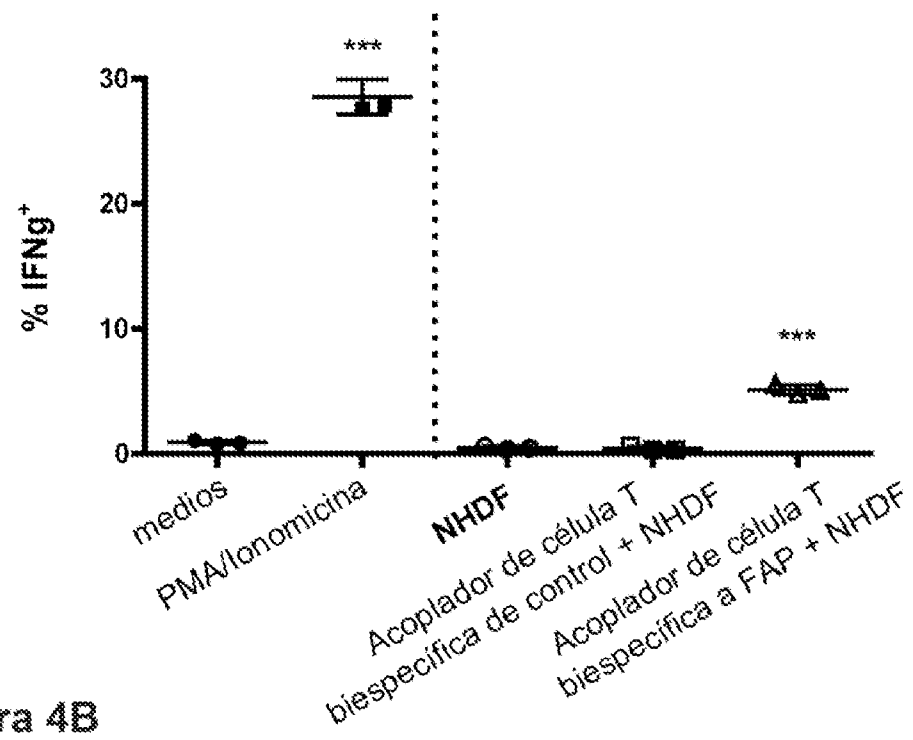


Figura 4B

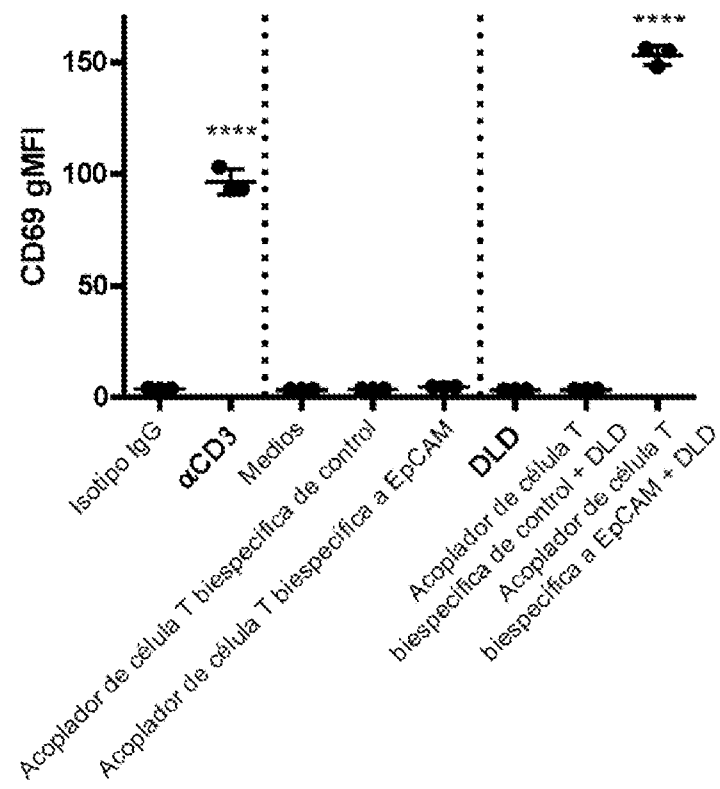


Figura 4C

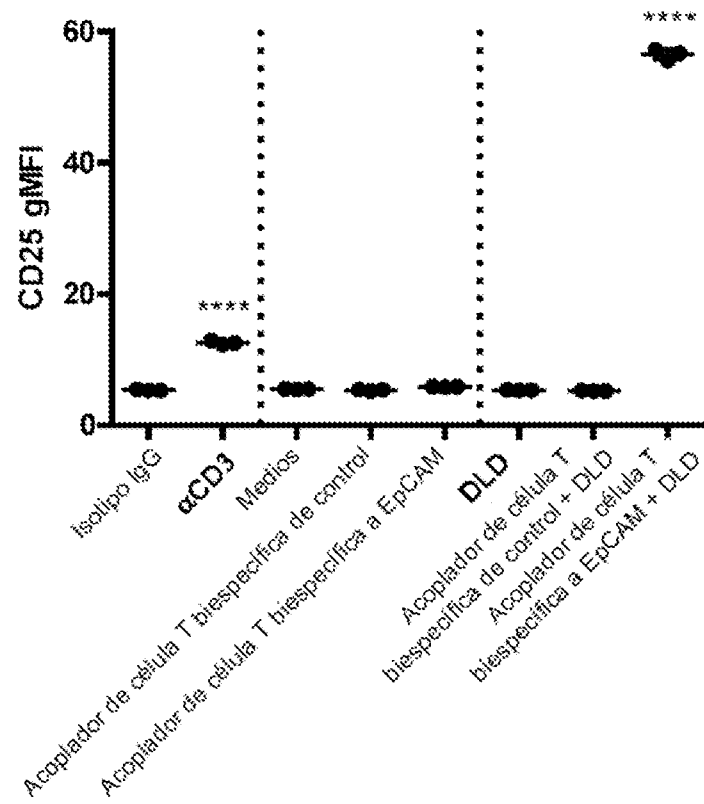


Figura 5A

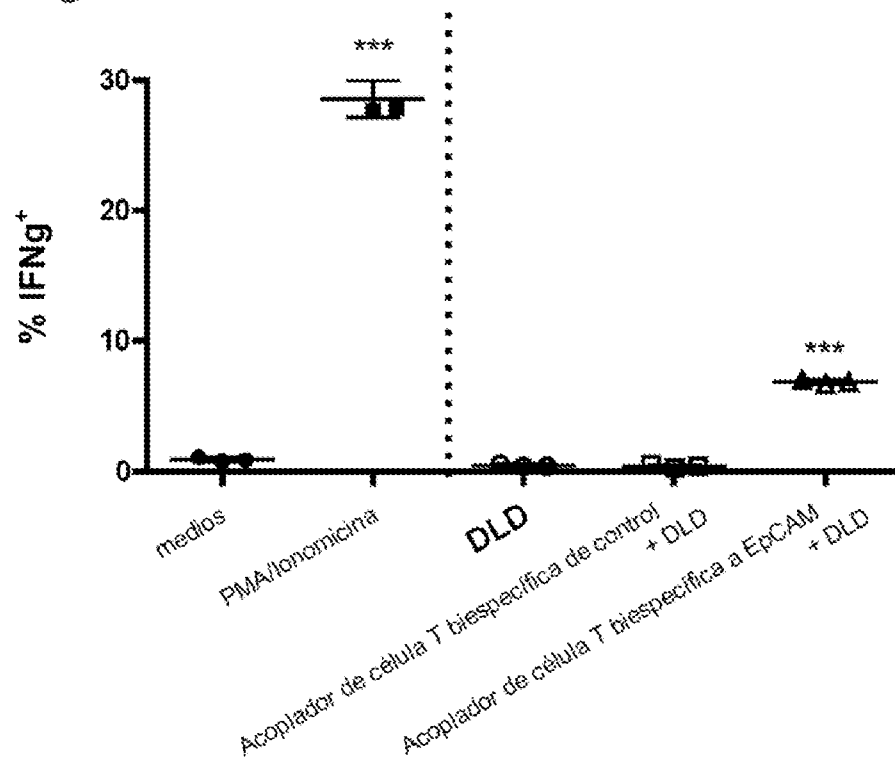


FIGURA 5 continuación
CD69

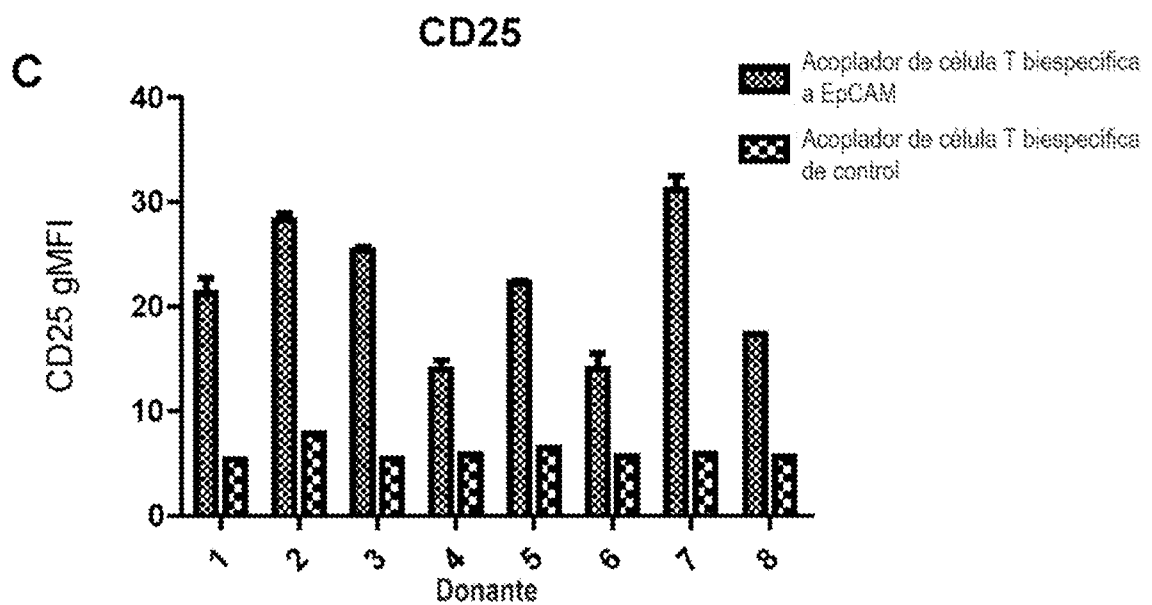
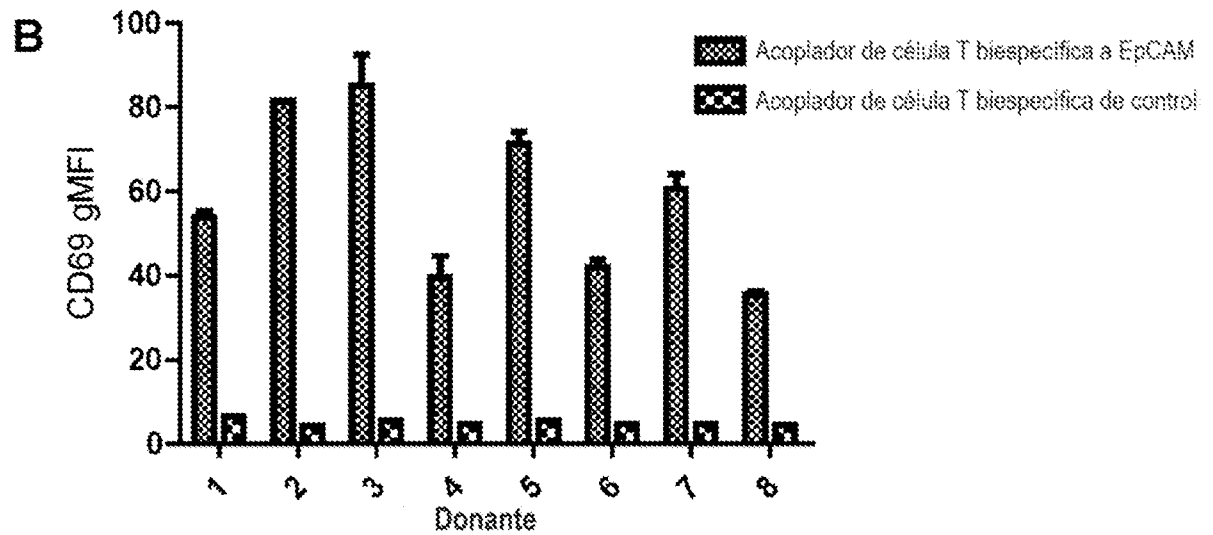


Figura 6

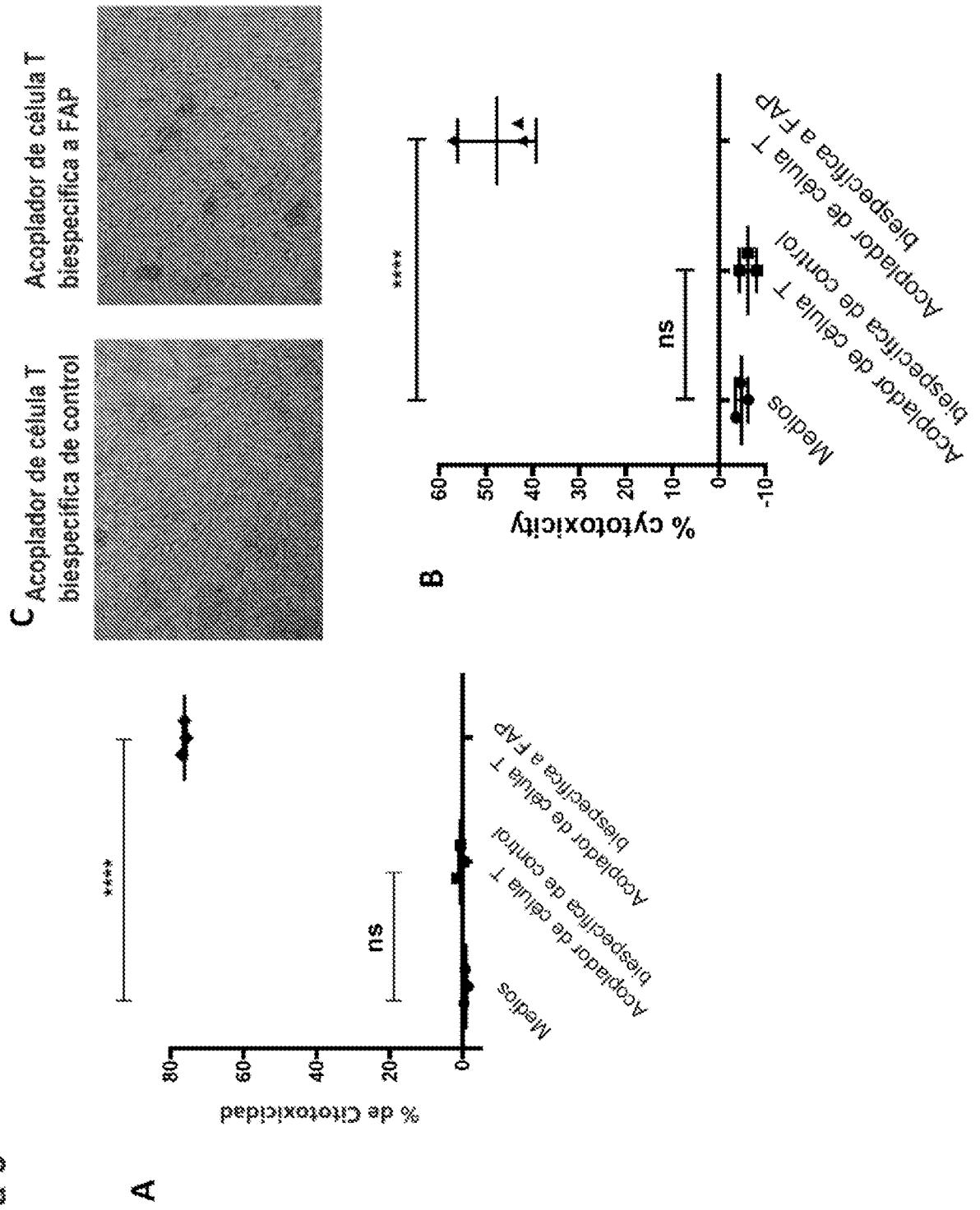
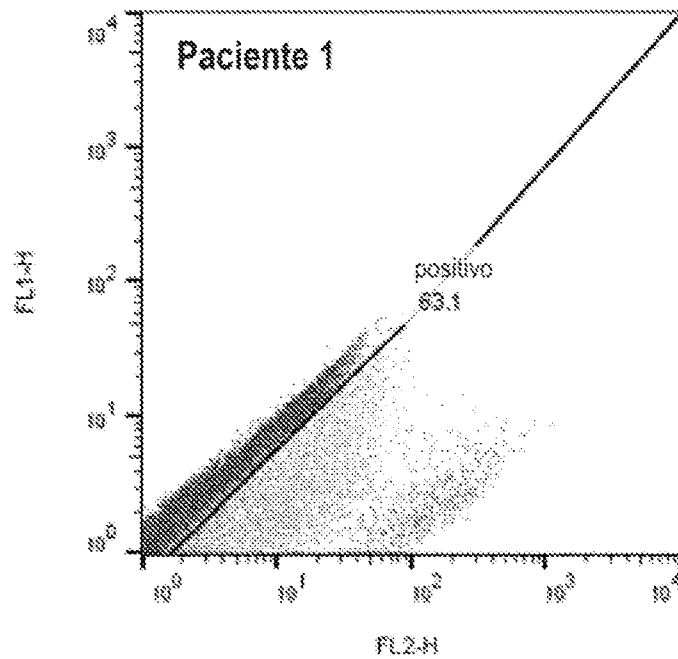
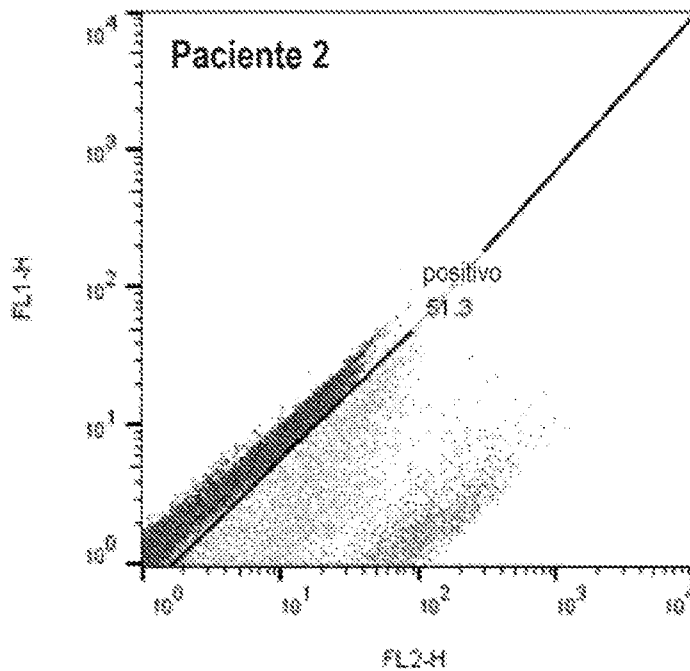


Figura 7A

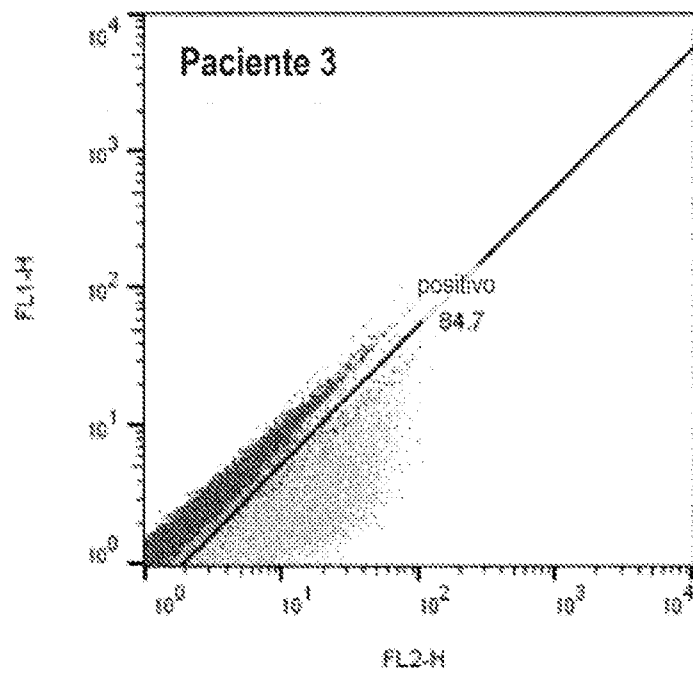


Nombre de muestra	positivo: freq. de Parental
Sin teñir	0.10
Isotipo C	0.41
Acoplador de célula T biespecifica a EpCAM	15.7
Acoplador de célula T biespecifica a FAP	63.1

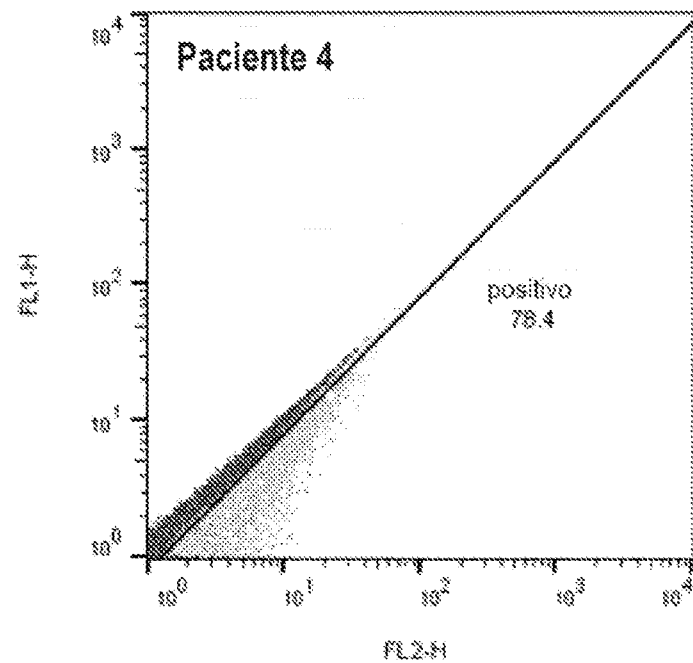


Nombre de muestra	positivo: freq. de Parental
Sin teñir	0.45
Isotipo C	0.58
Acoplador de célula T biespecifica a EpCAM	23.9
Acoplador de célula T biespecifica a FAP	51.3

Figura 7A continuación



Nombre de muestra	positivo: frec. de Parental
Sin teñir	1.08
Isotipo C	1.12
Acoplador de célula T biespecifica a EpCAM	4.48
Acoplador de célula T biespecifica a FAP	84.7



Nombre de muestra	positivo: frec. de Parental
Sin teñir	0.78
Isotipo C	0.22
Acoplador de célula T biespecifica a EpCAM	0.37
Acoplador de célula T biespecifica a FAP	78.4

Figura 7B

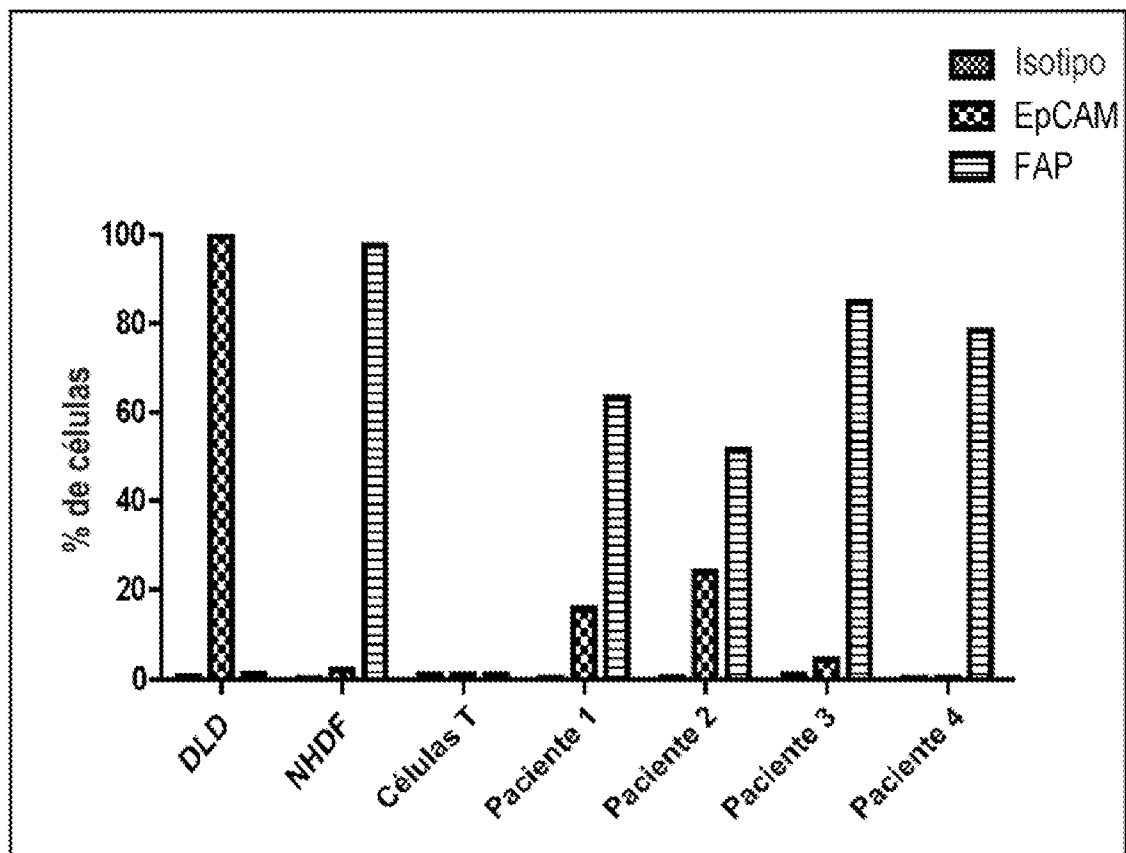


Figura 8A

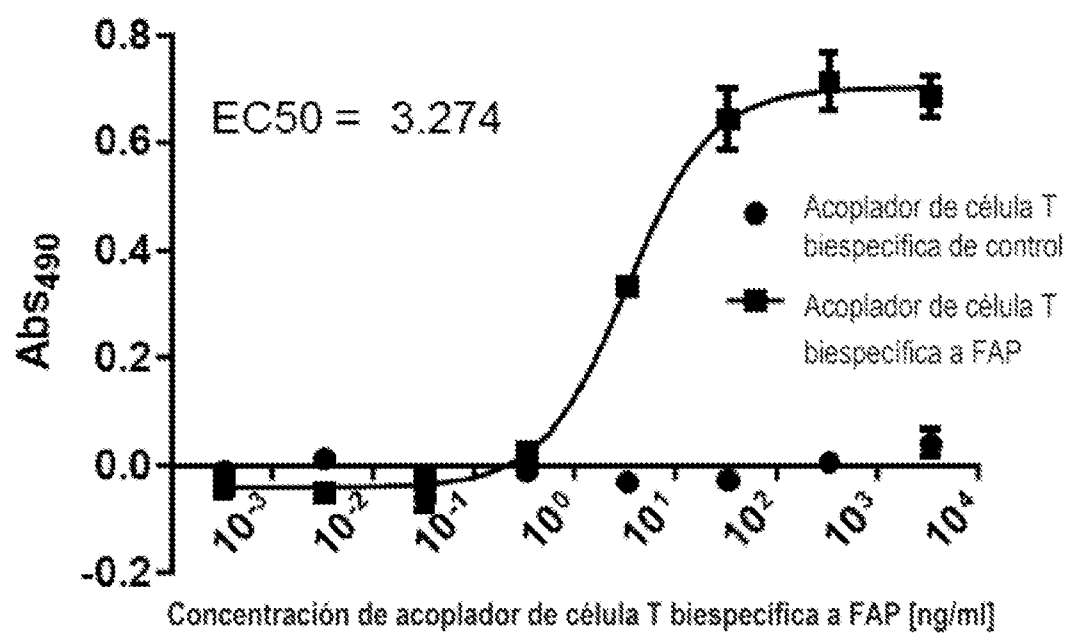


Figura 8B

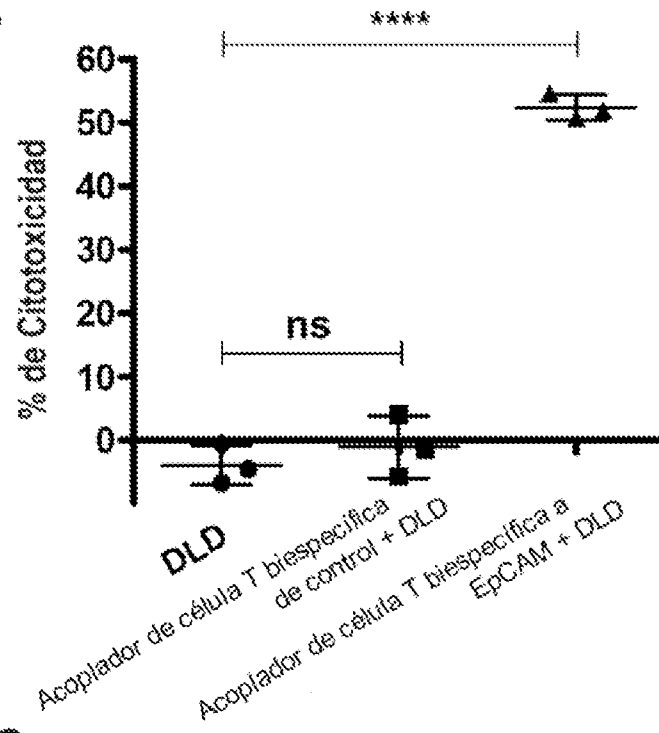
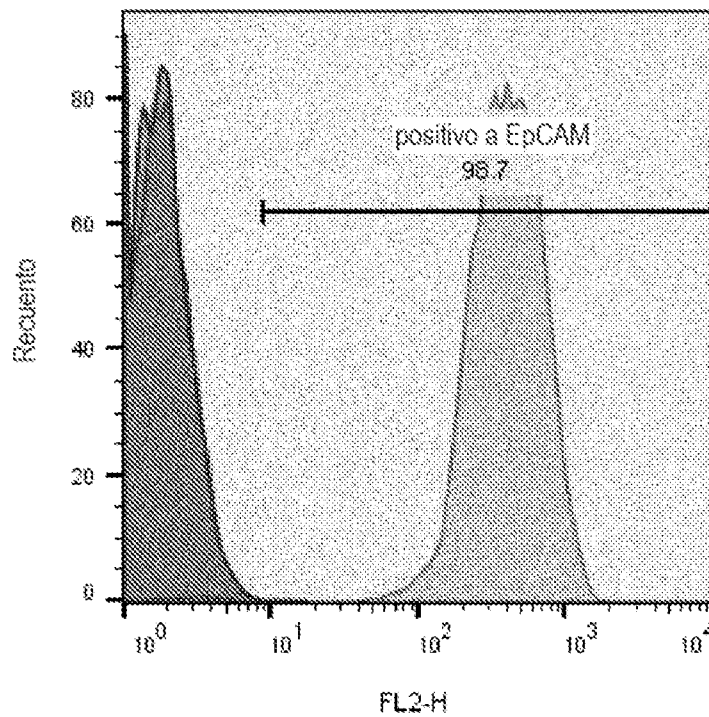
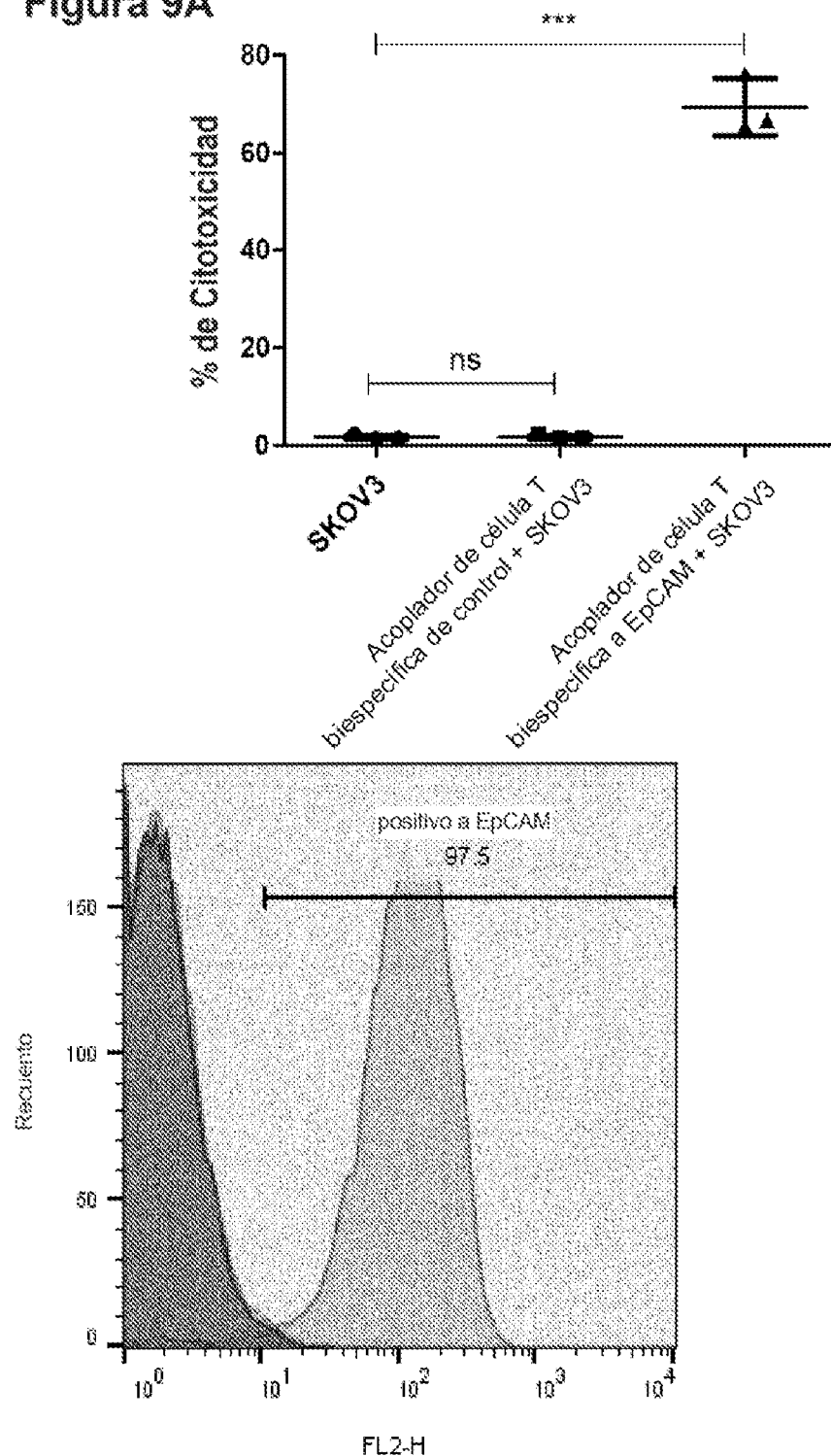


Figura 8C



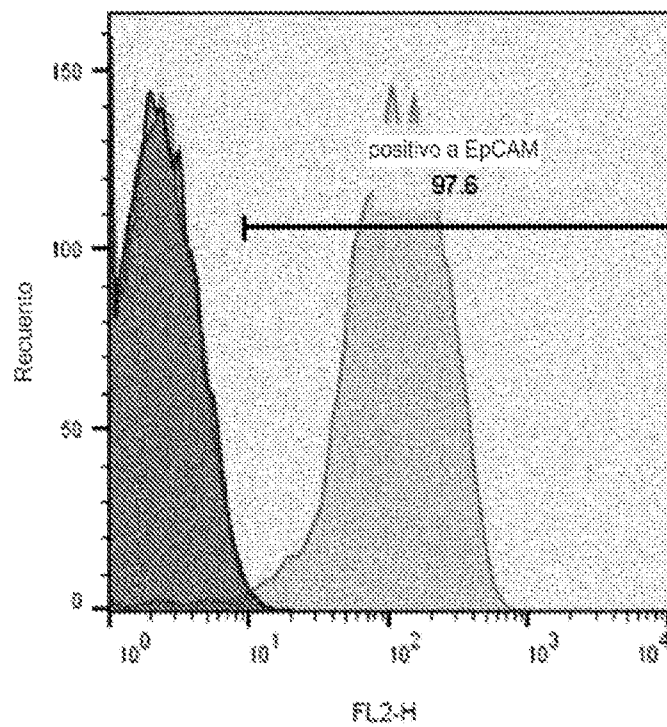
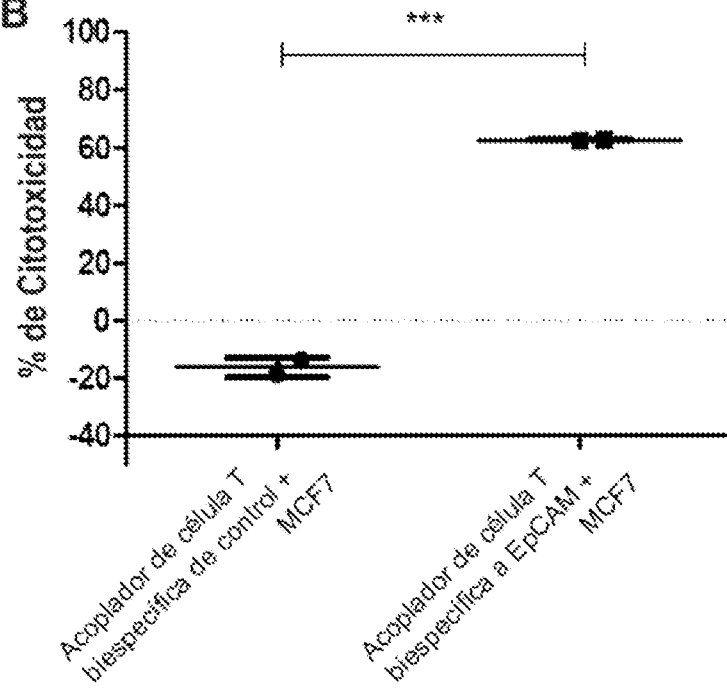
	Nombre de muestra	Positivo a EpCAM: frec. de Parental	Media geométrica: FL2-H
	[DLD sin tñir.021]	0.40	1.77
	[DLD iso.022]	0.26	1.81
	[DLD ep.023]	98.7	361

Figura 9A



	Nombre de muestra	Positivo a EpCAM: frec. de Parental	Media geométrica: FL2-H
	[SKov sin teñir.024]	1.48	1.99
	[SKov iso.025]	1.53	2.00
	[SKov ep.026]	97.5	103

Figura 9B



	Nombre de muestra	Positivo a EpCAM: frec. de Parental	Media geométrica: FL2-H
	[MCF7sin teñir.018]	0.84	2.24
	[MCF7 iso.018]	0.86	2.21
	[MCF7 ep.020]	97.6	101

Figura 10

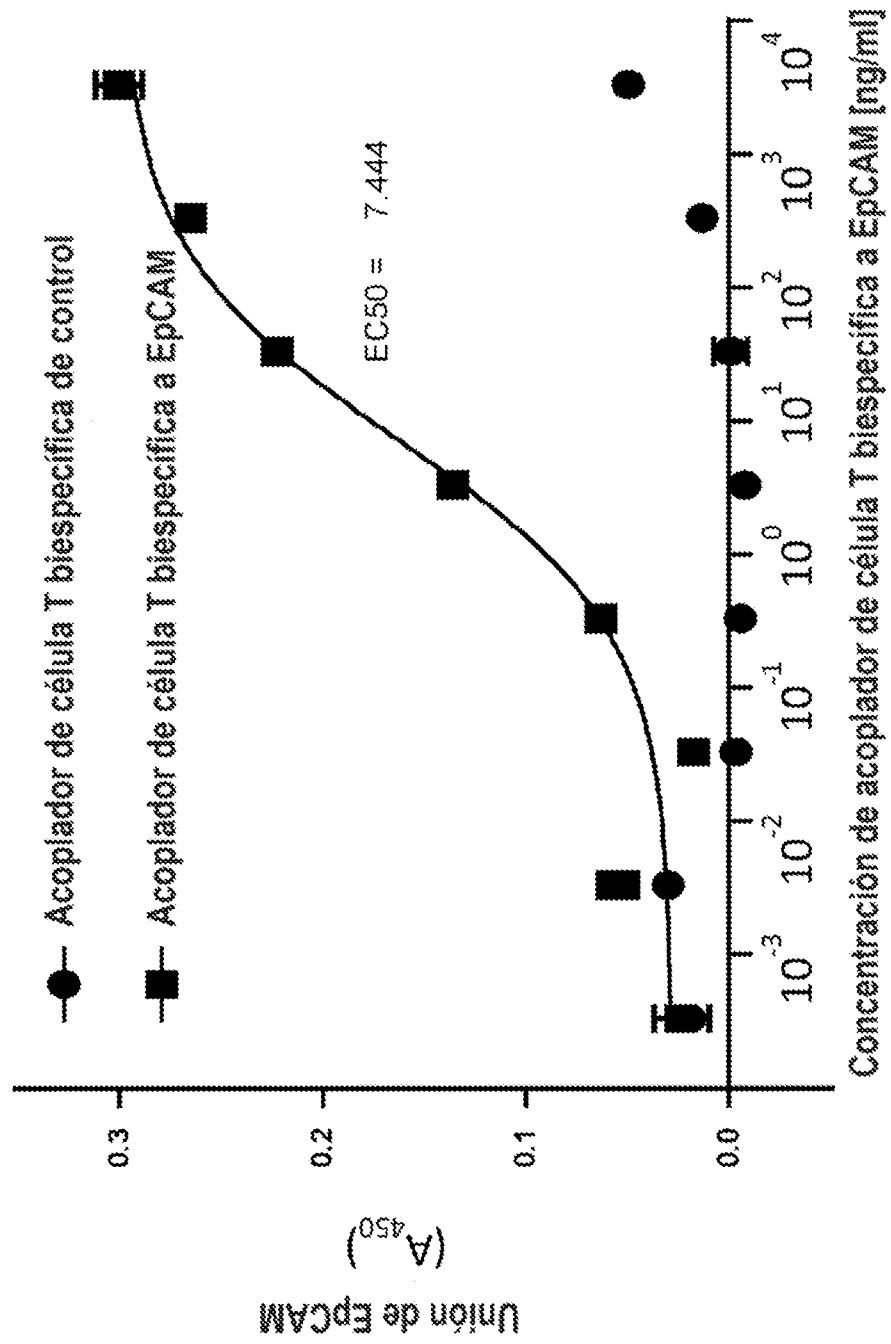


Figura 11A

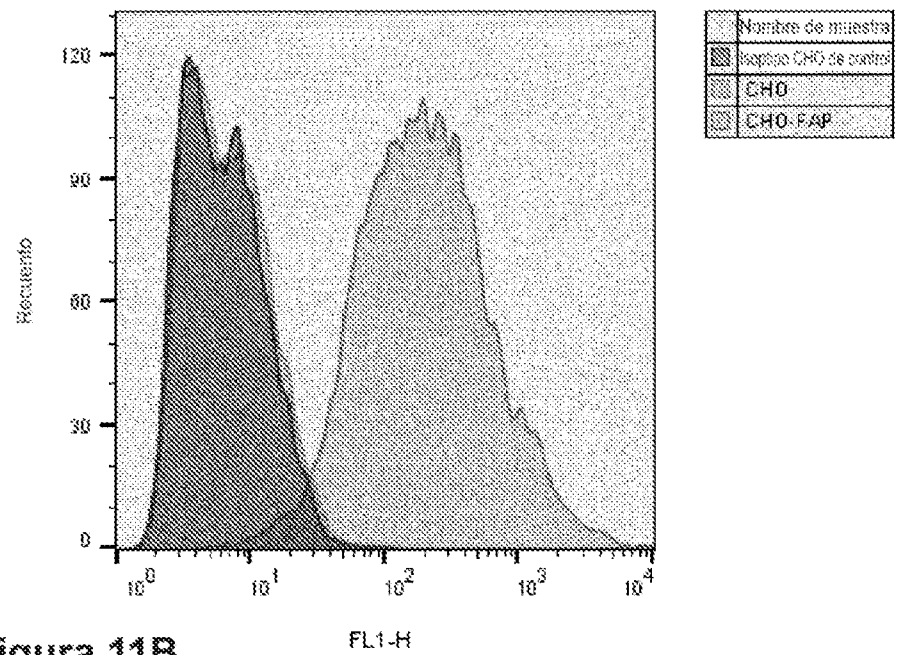


Figura 11B

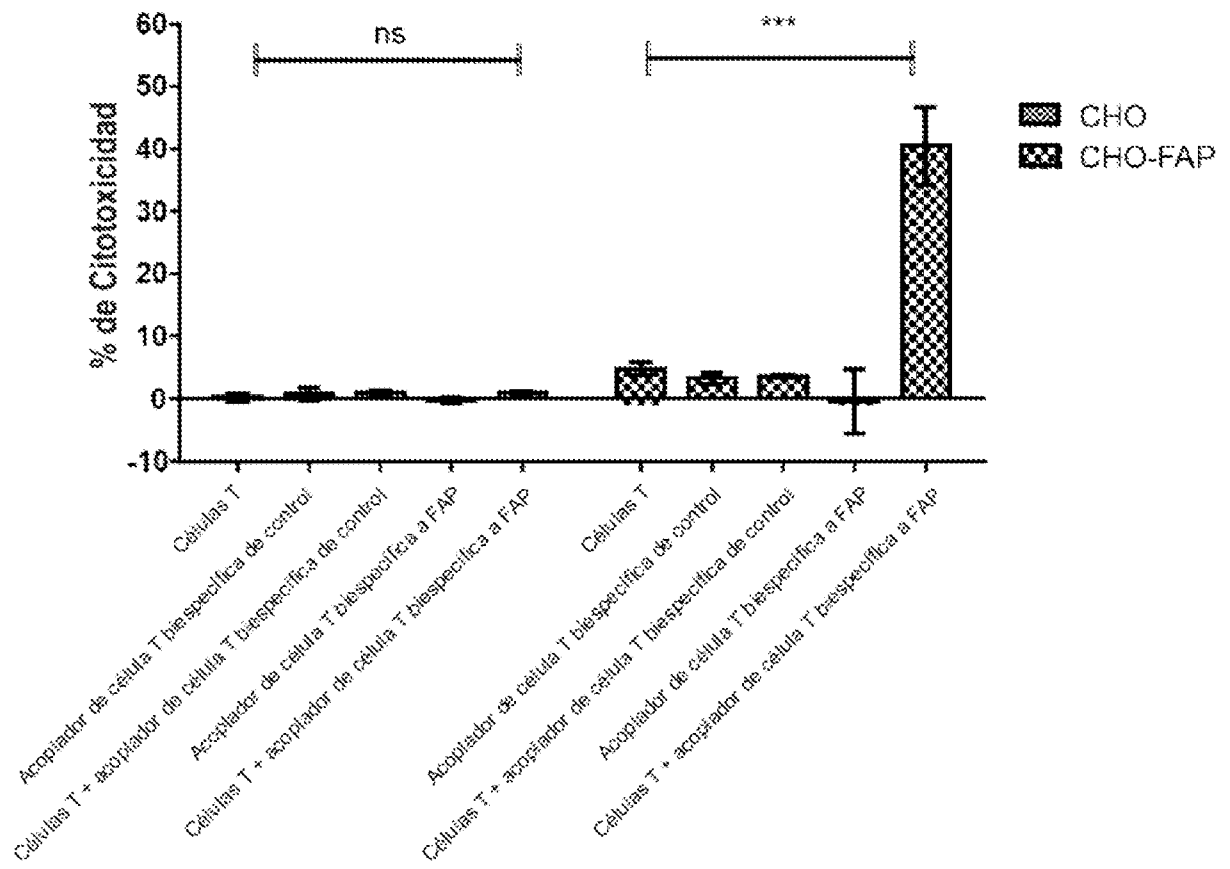


Figura 12

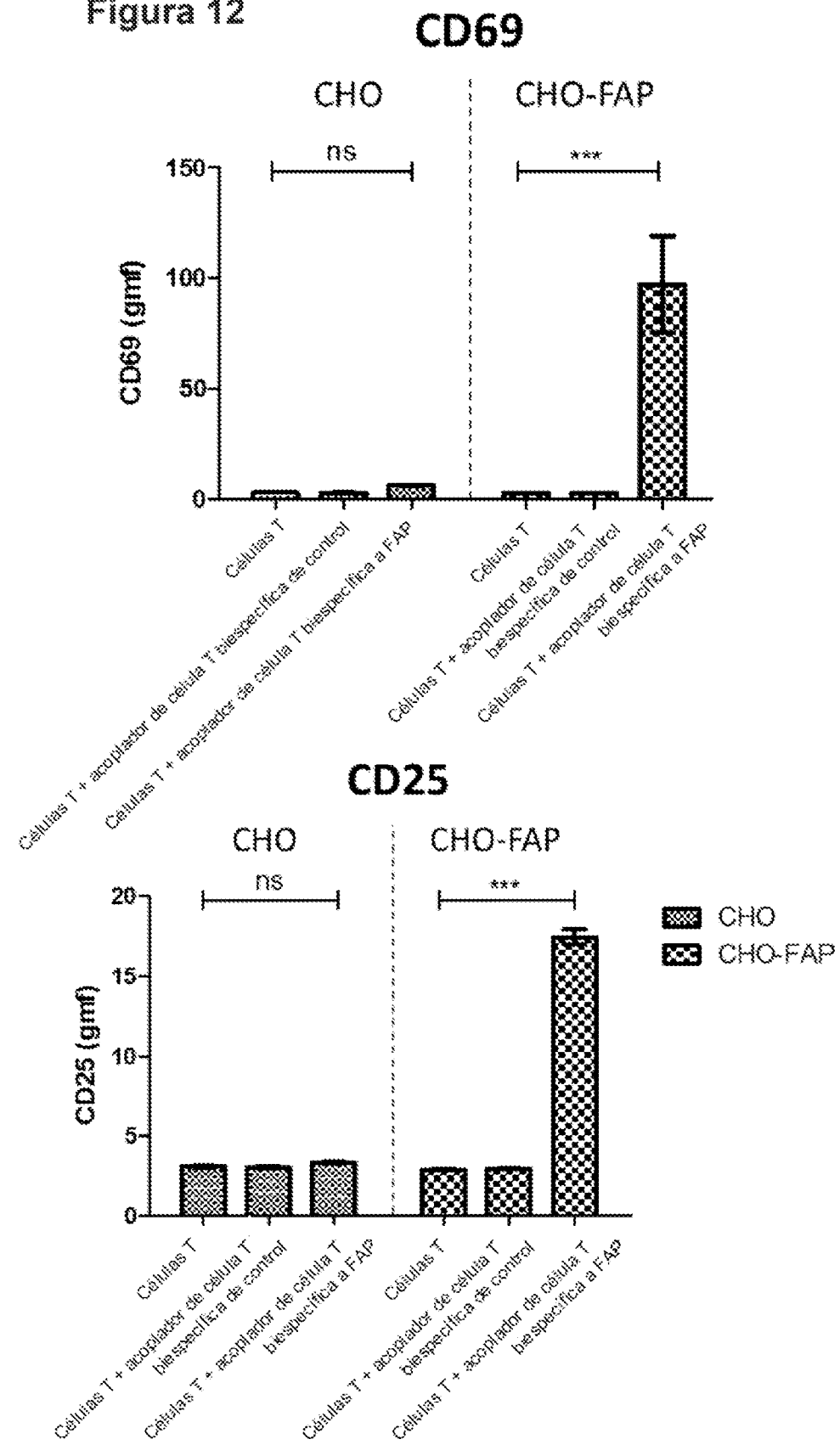
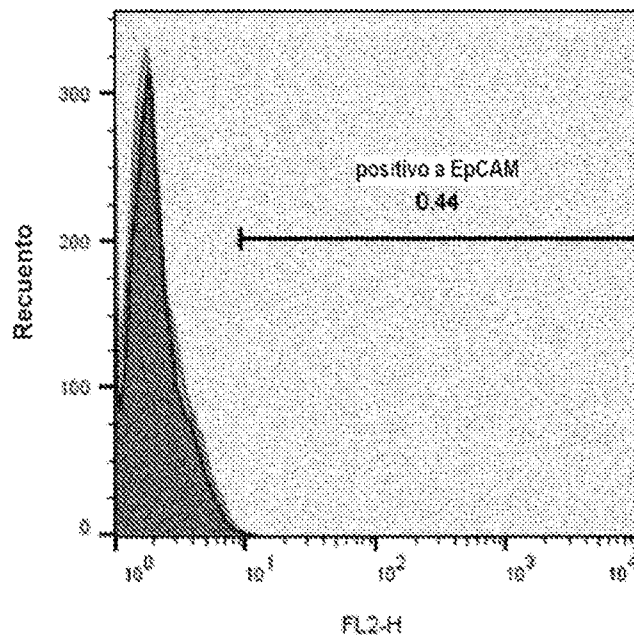
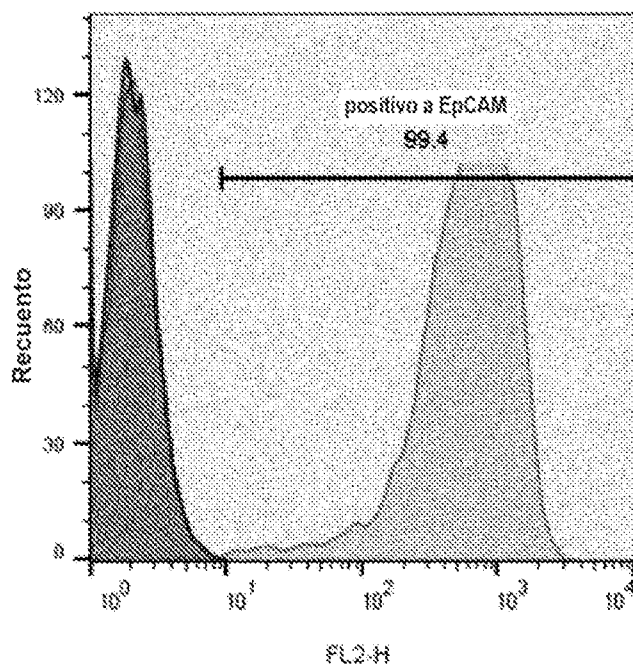


Figura 13A



	Nombre de muestra	Positivo a EpCAM: frec. de Parental	Media geométrica: FL2-H
	[CHO sin teñir.036]	0.39	2.06
	[CHO iso.037]	0.42	2.09
	[CHO ep.038]	0.44	2.02



	Nombre de muestra	Positivo a EpCAM: frec. de Parental	Media geométrica: FL2-H
	[CHO.epcam sin teñir.039]	0.093	2.03
	[CHO-epcam iso.040]	0.15	2.05
	[CHO-epcam ep.041]	99.4	613

Figura 13B

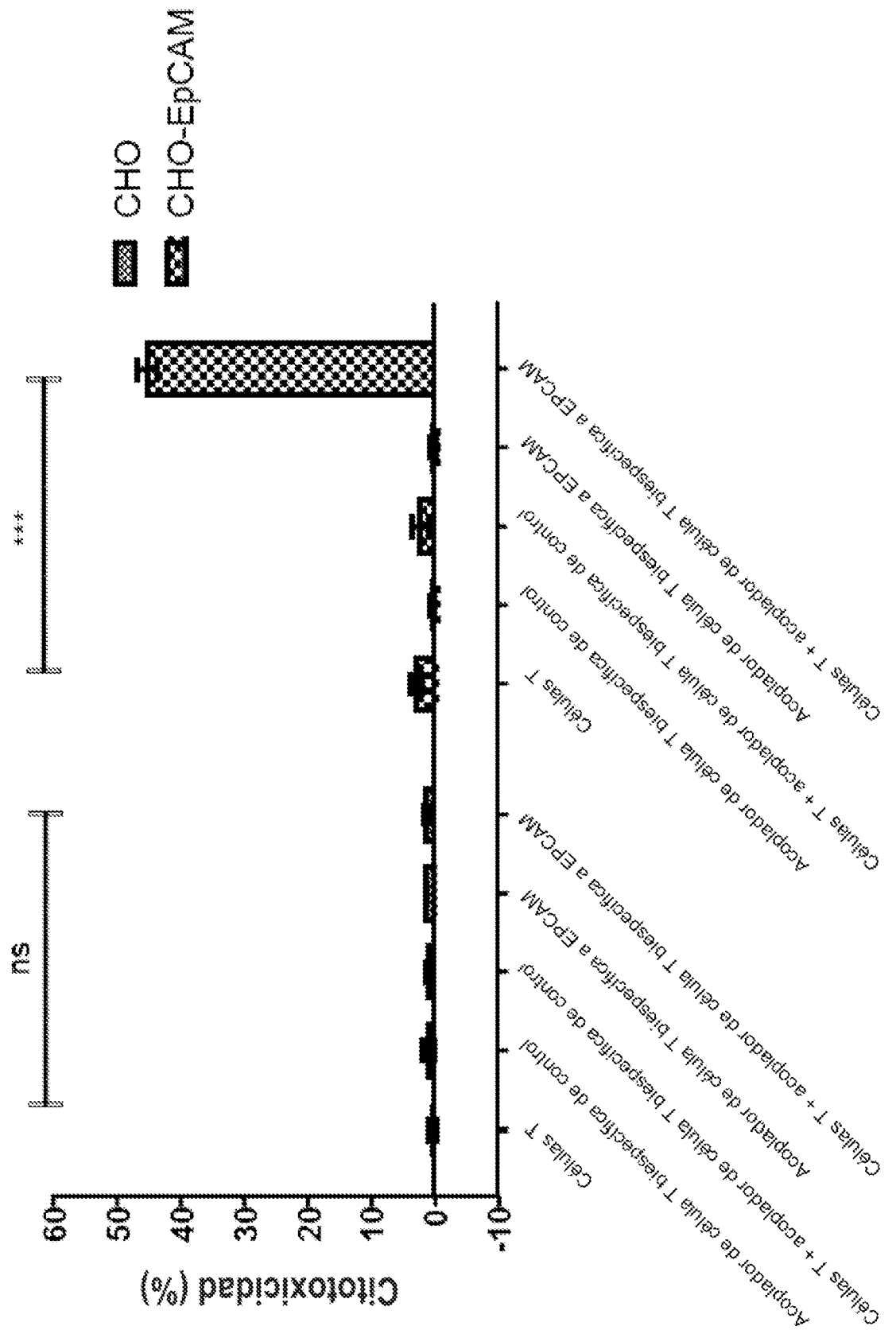


Figura 14

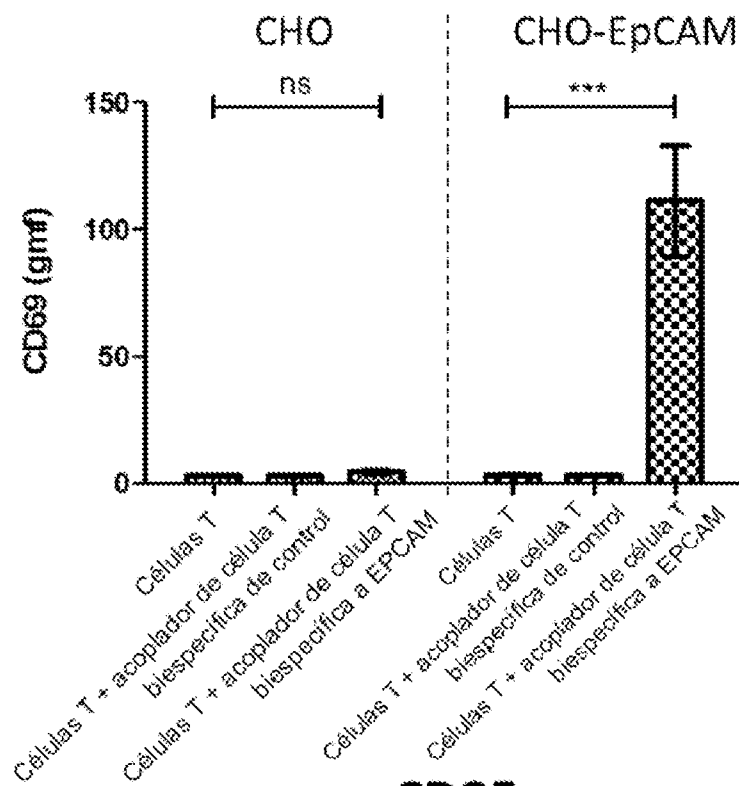
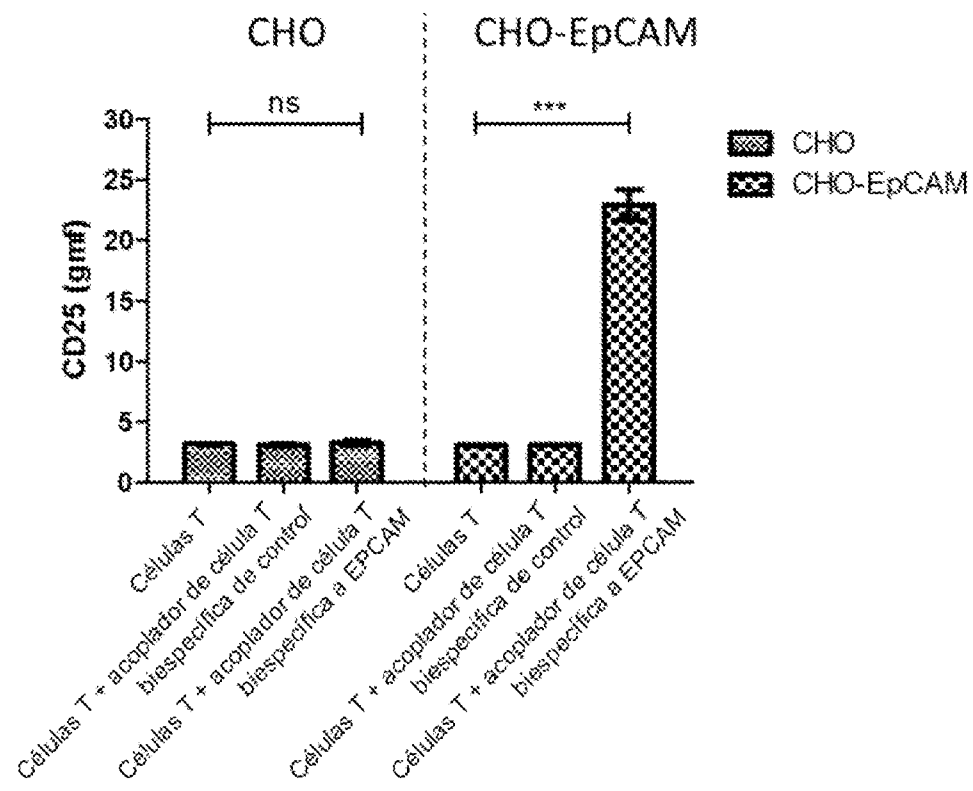
CD69**CD25**

Figura 15

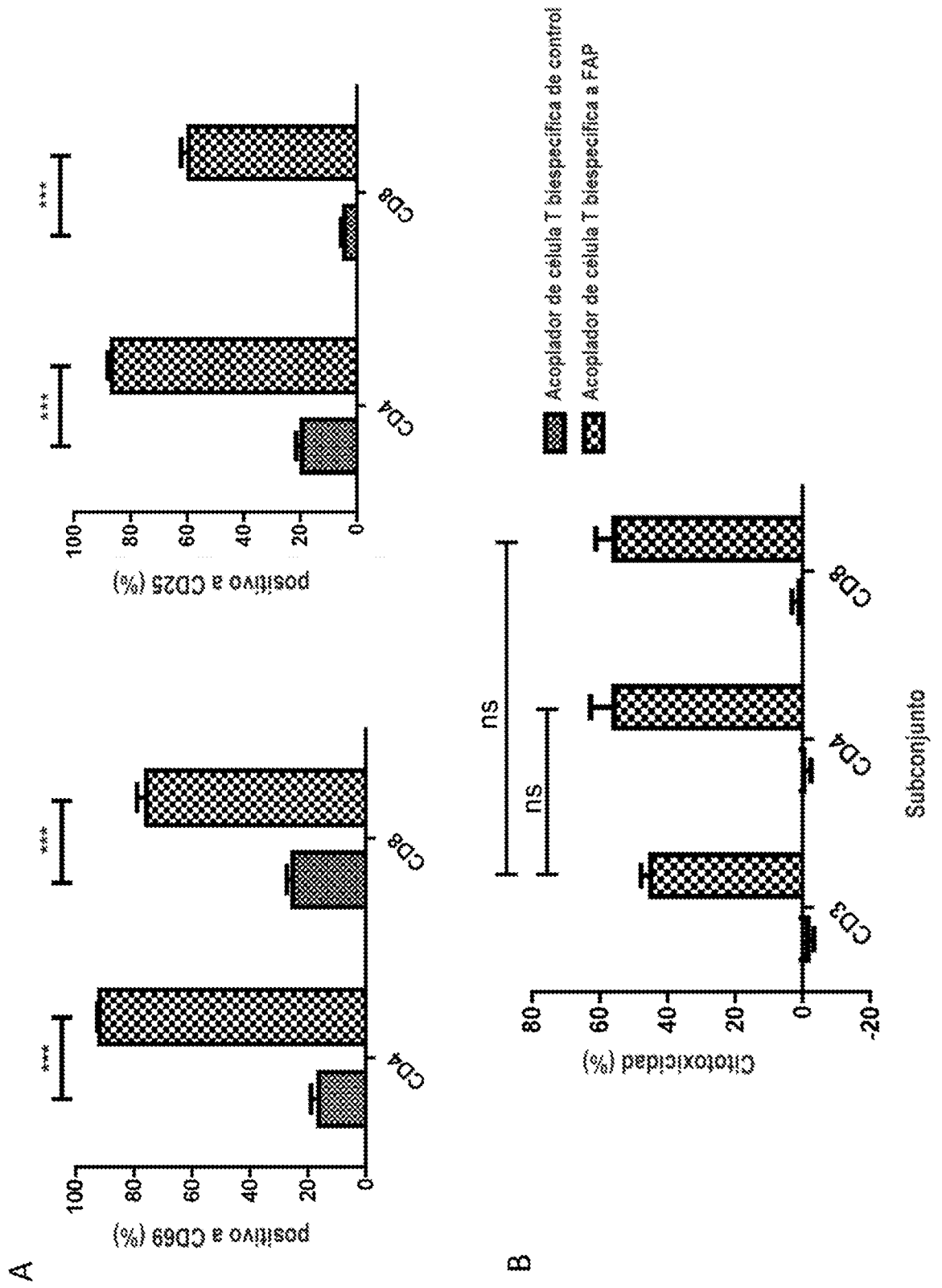


Figura 17

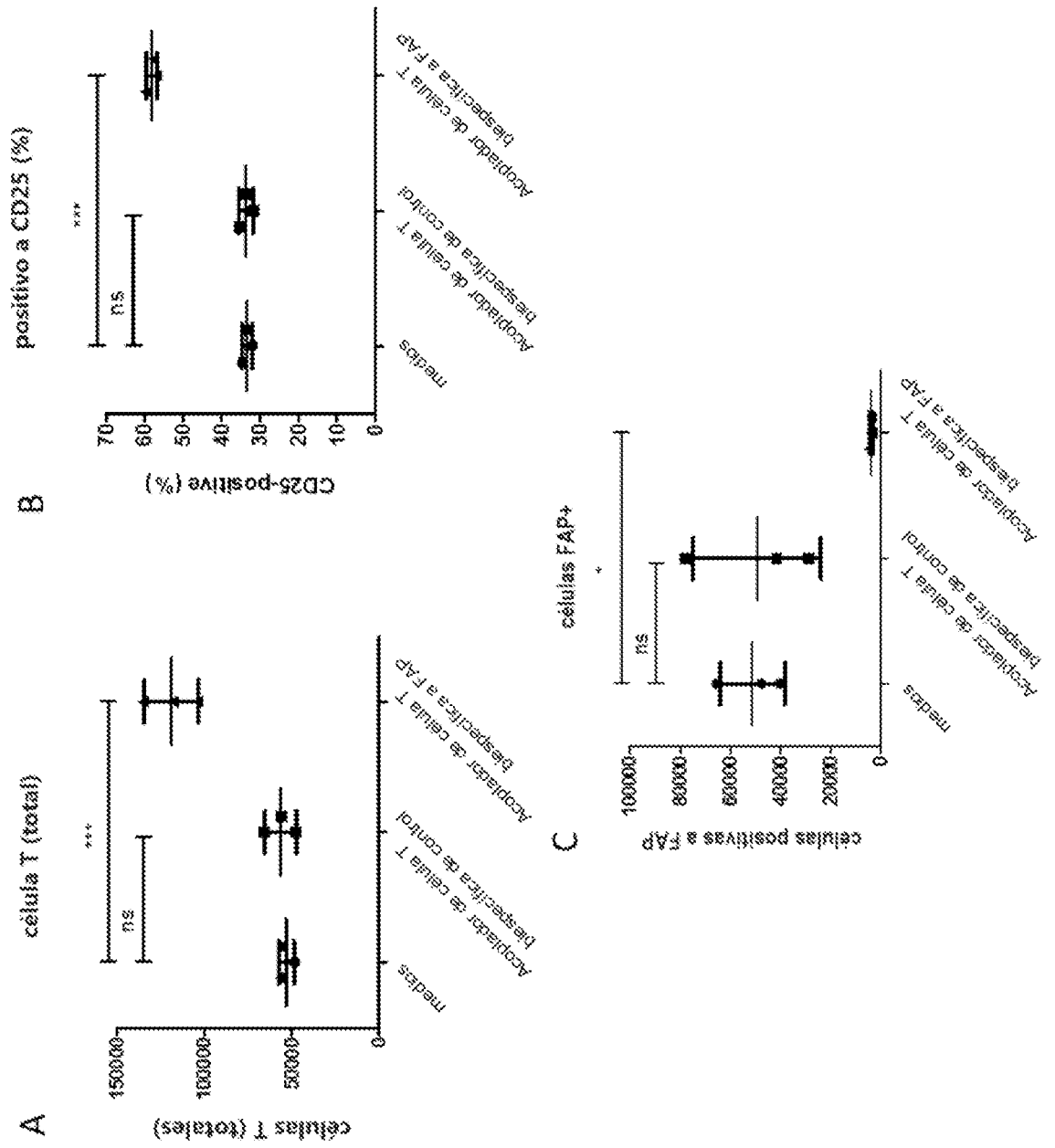


Figura 18

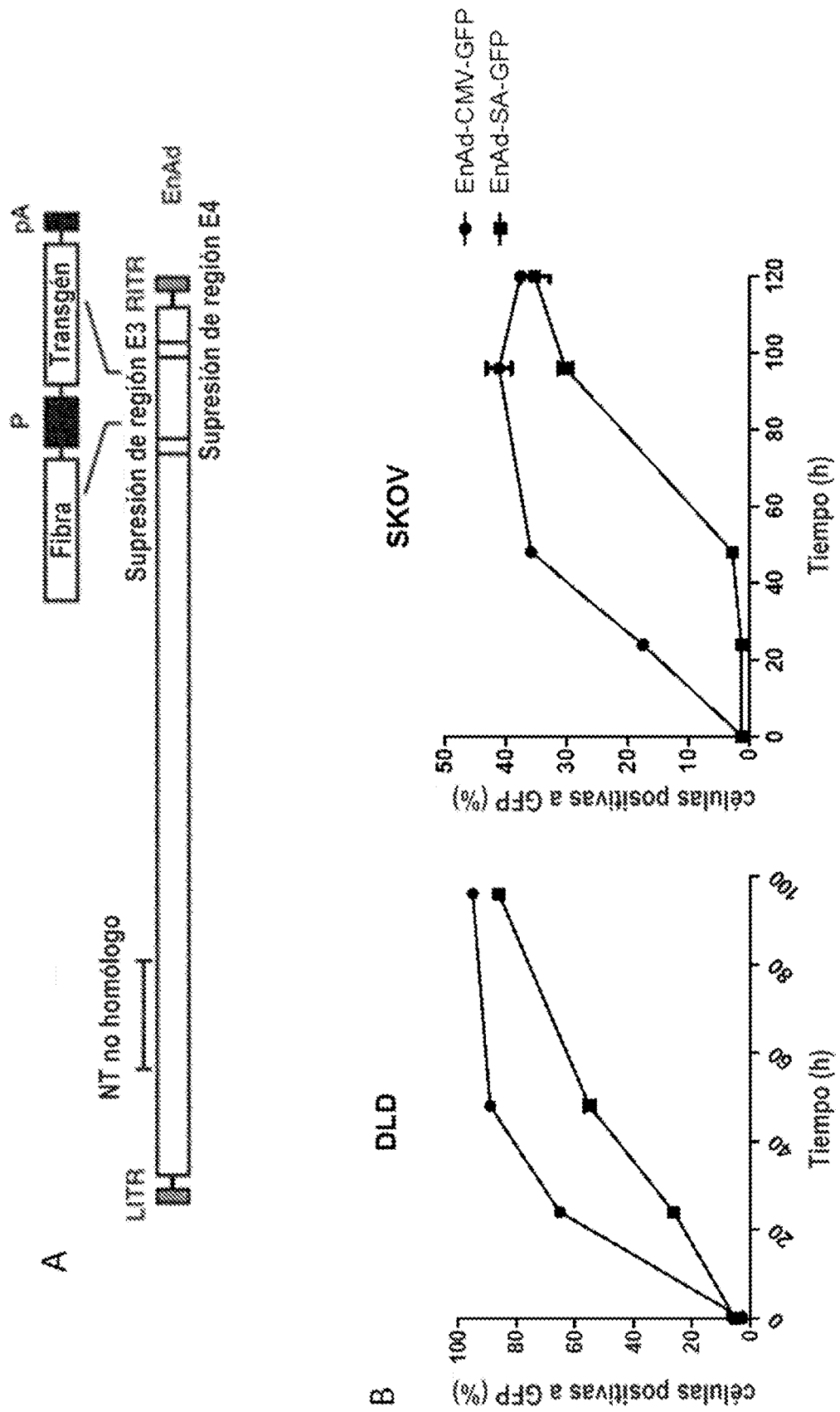


Figura 19

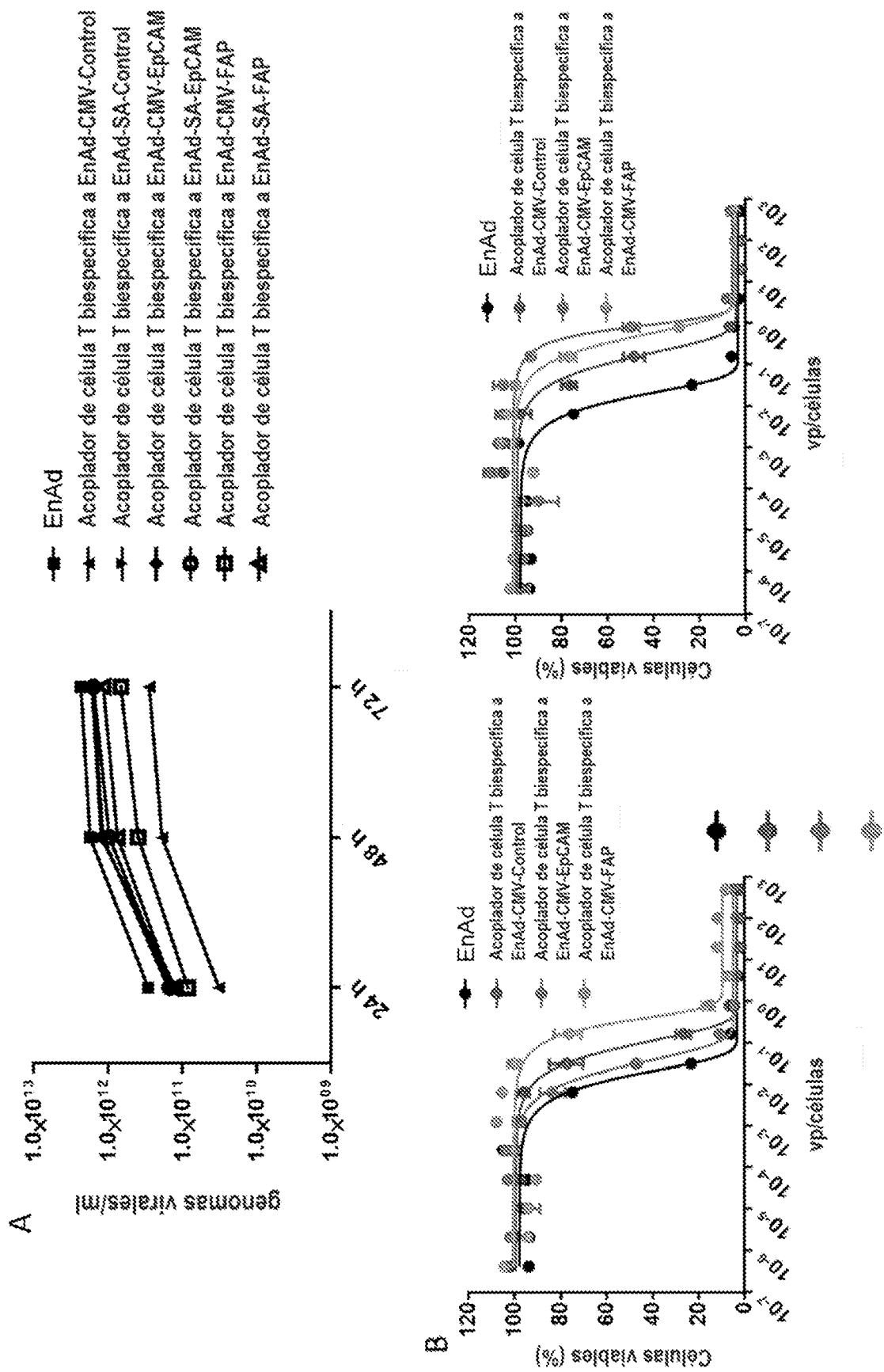


Figura 20A

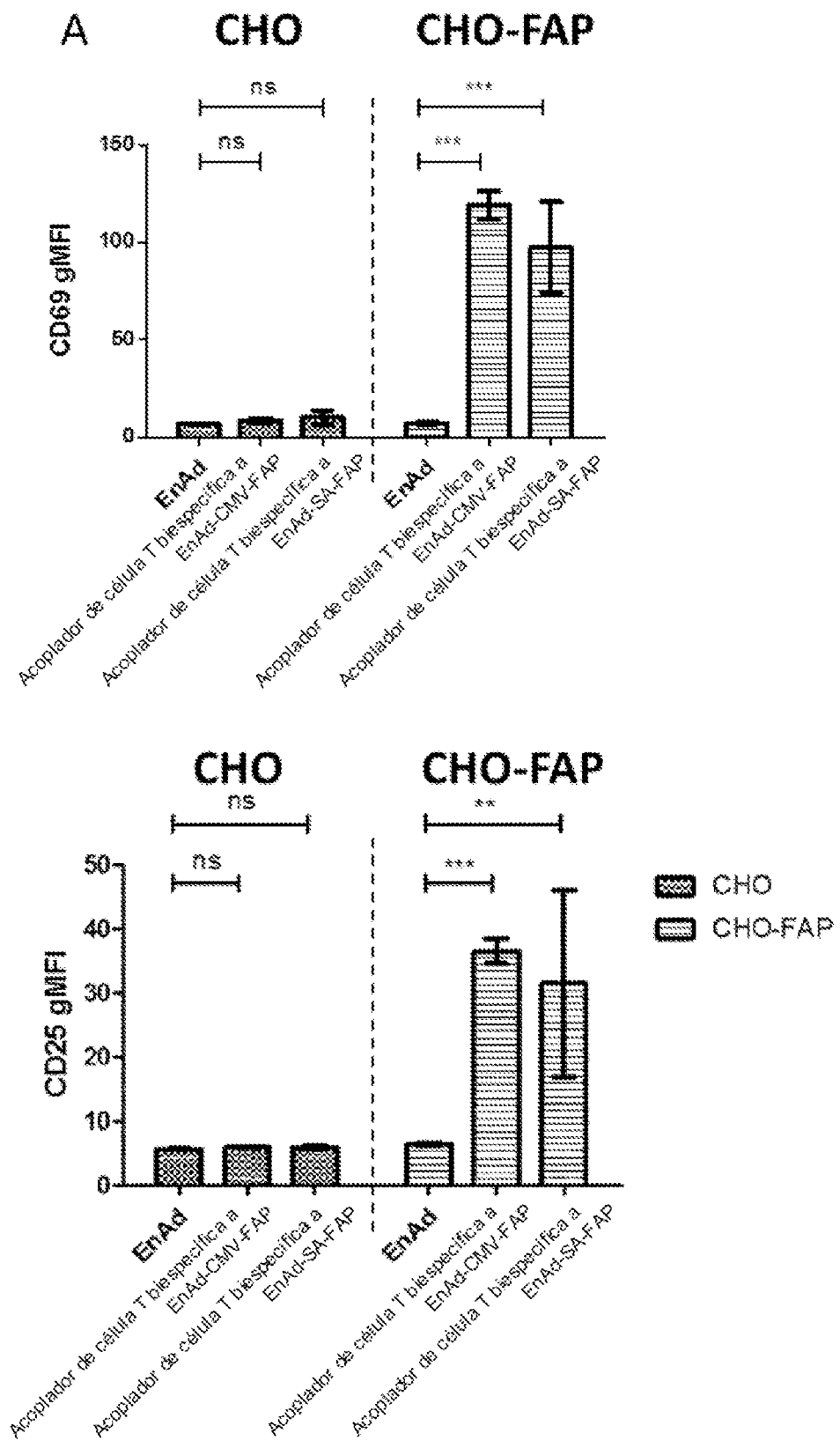


Figura 20B

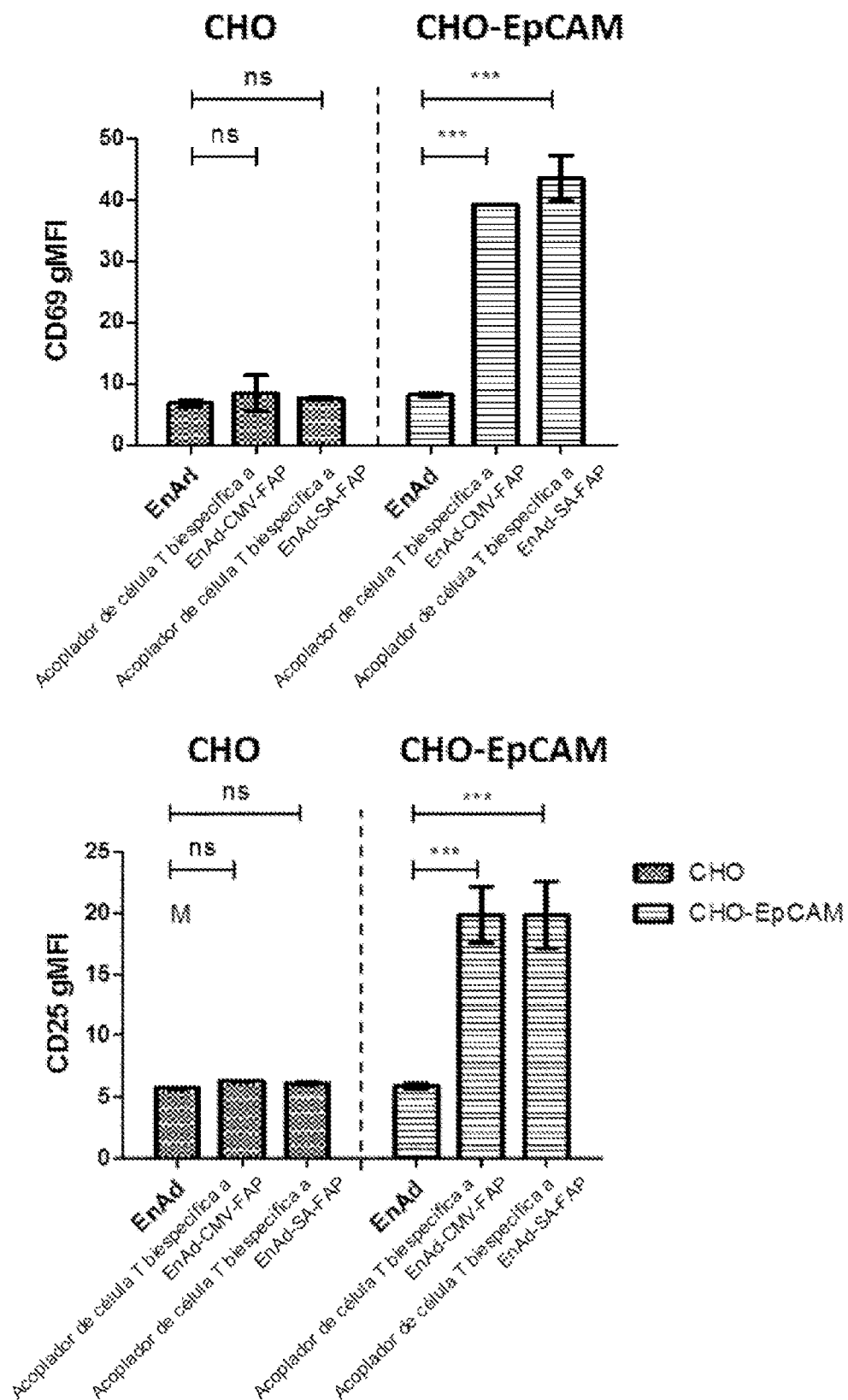


Figura 21

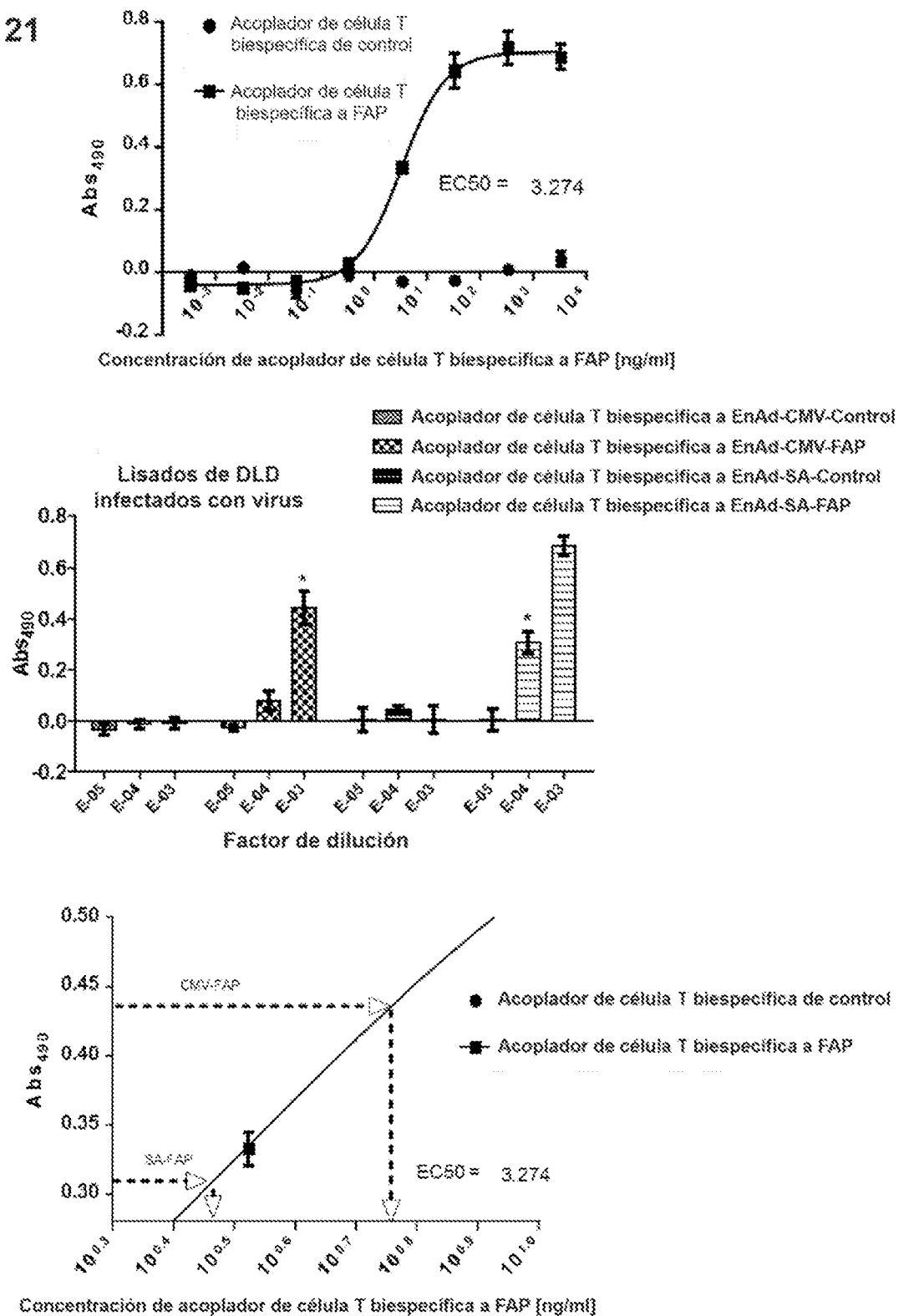


Figura 22

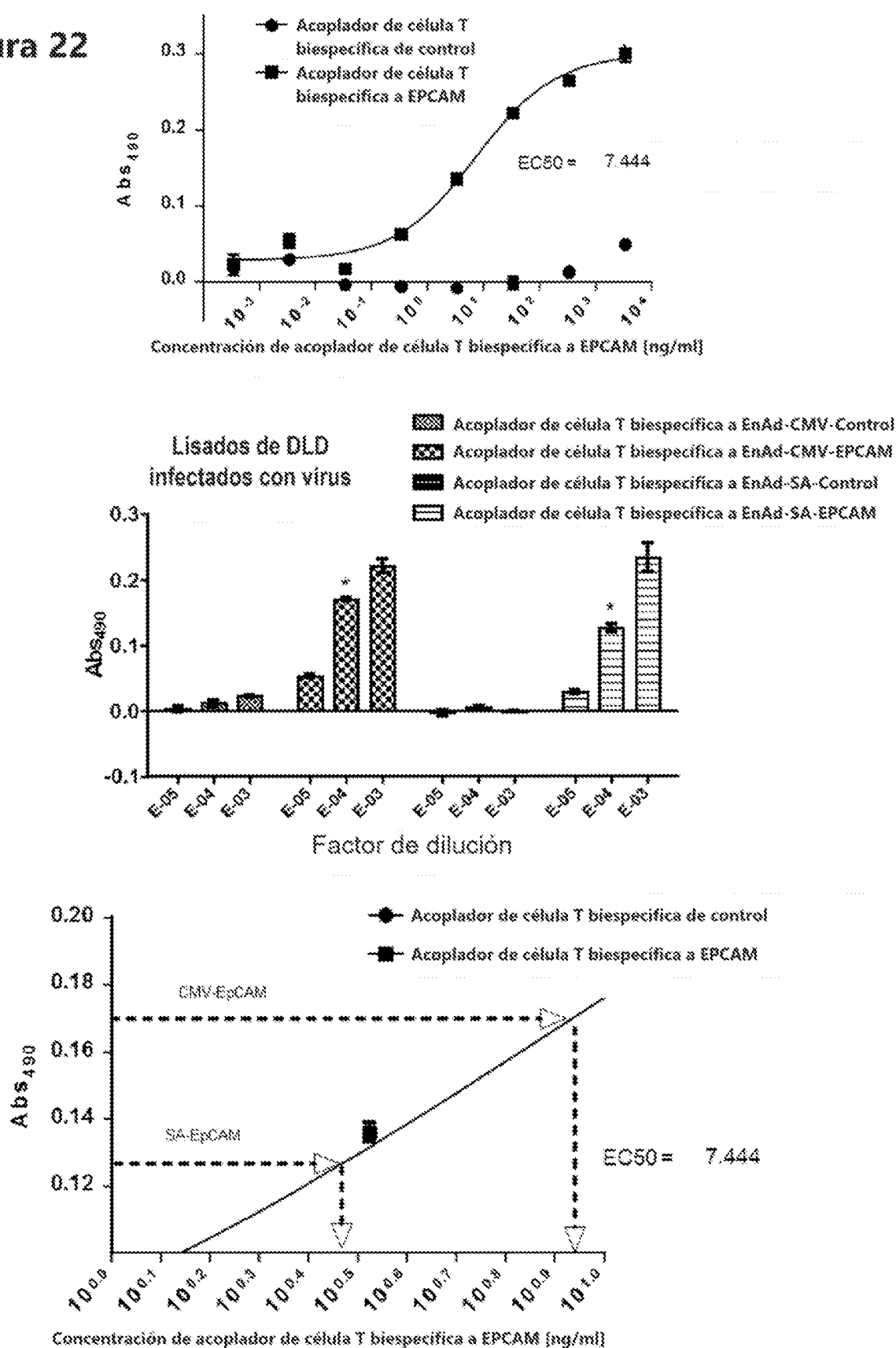


Figura 23

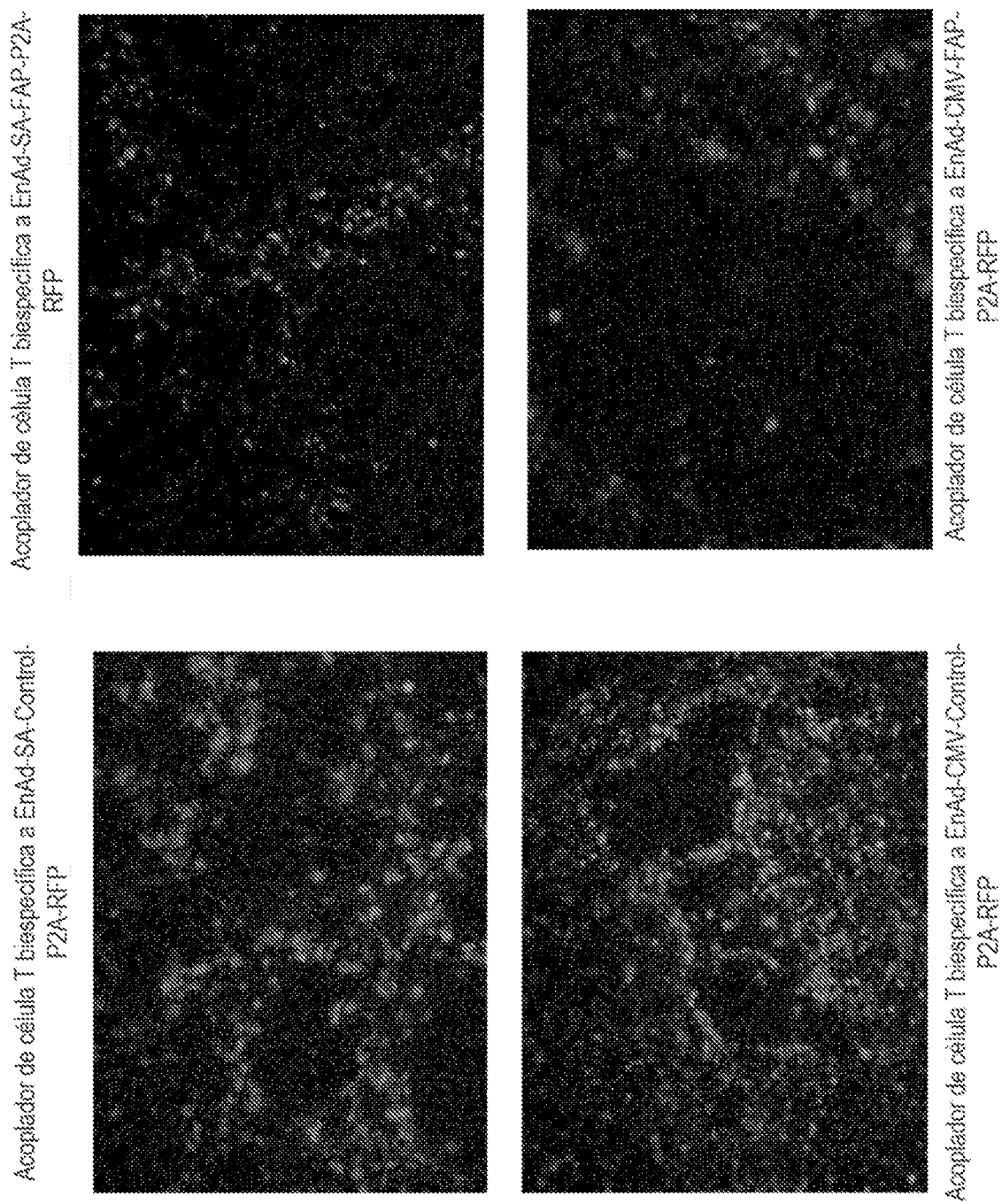


Figura 24

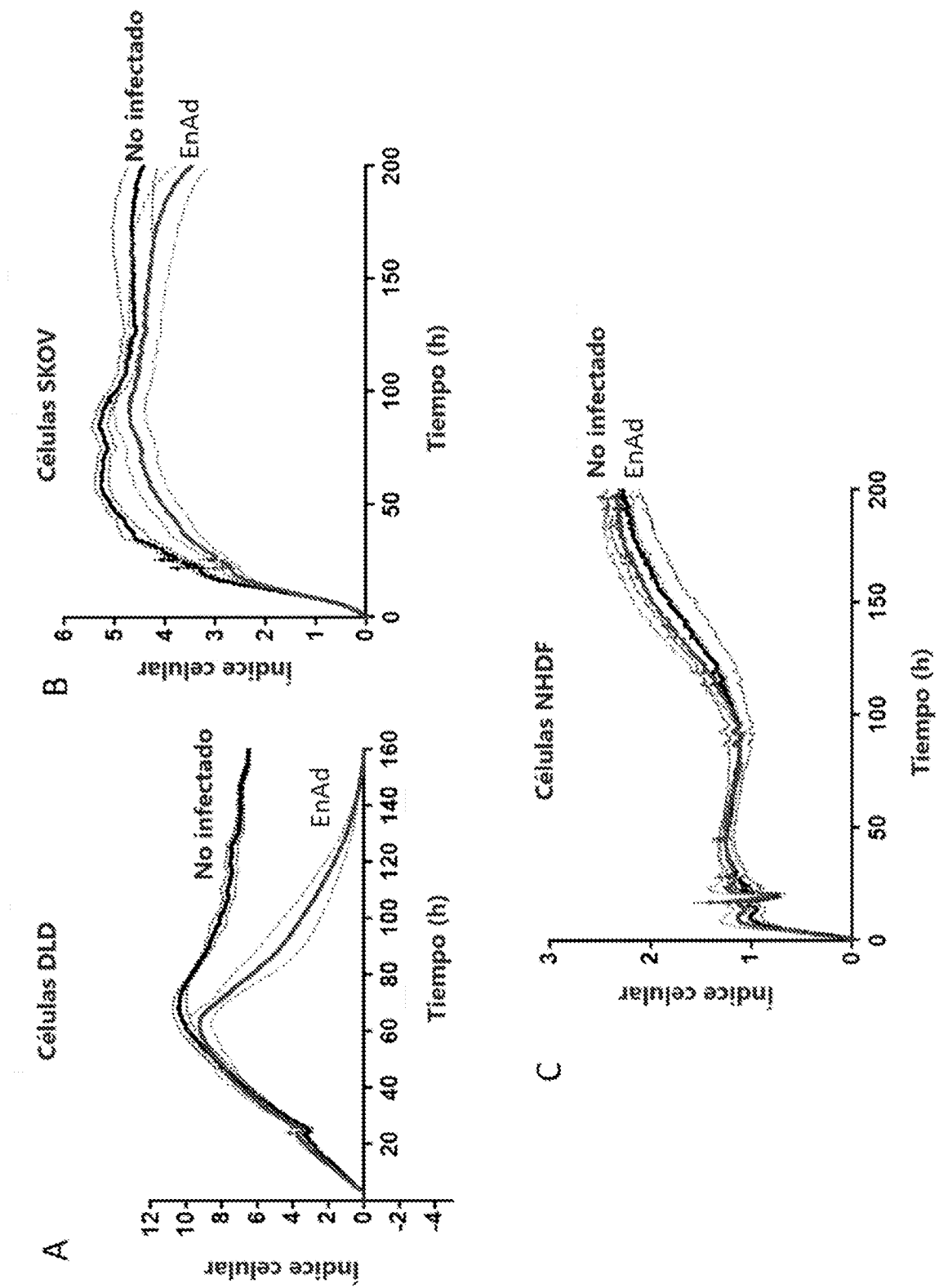


Figura 25A

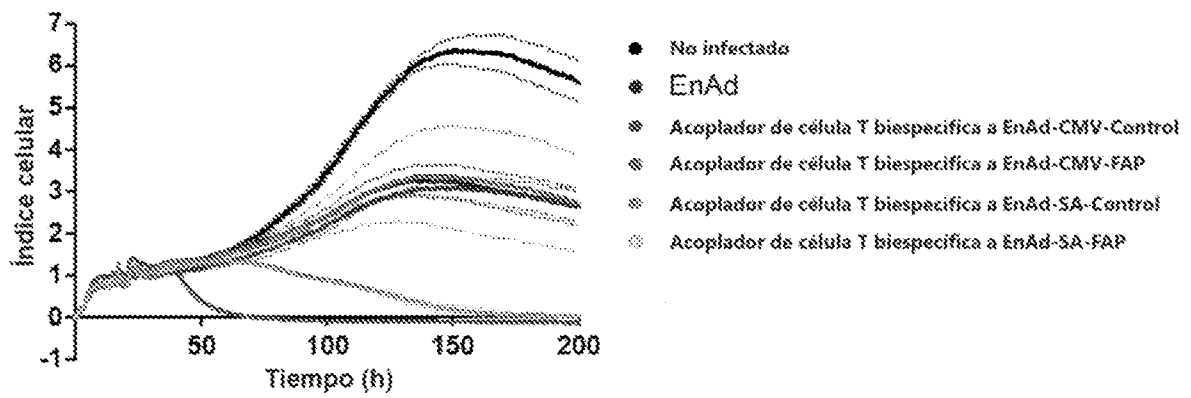


Figura 25B

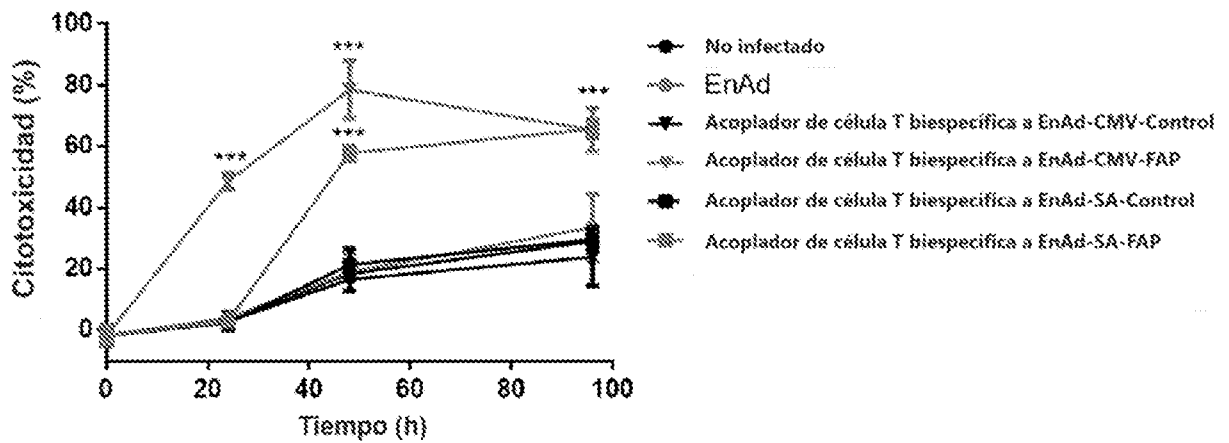


Figura 26

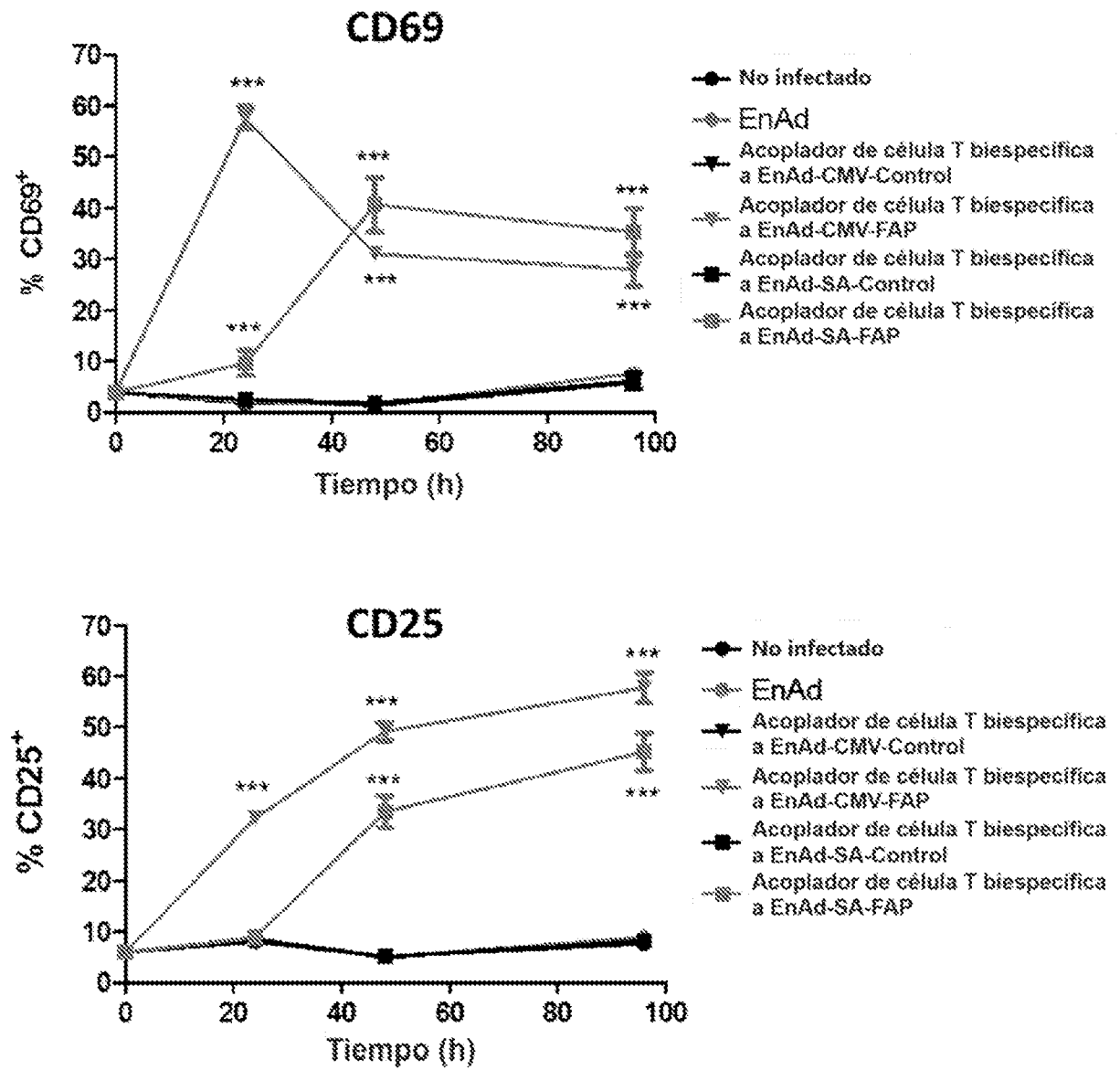


Figura 27

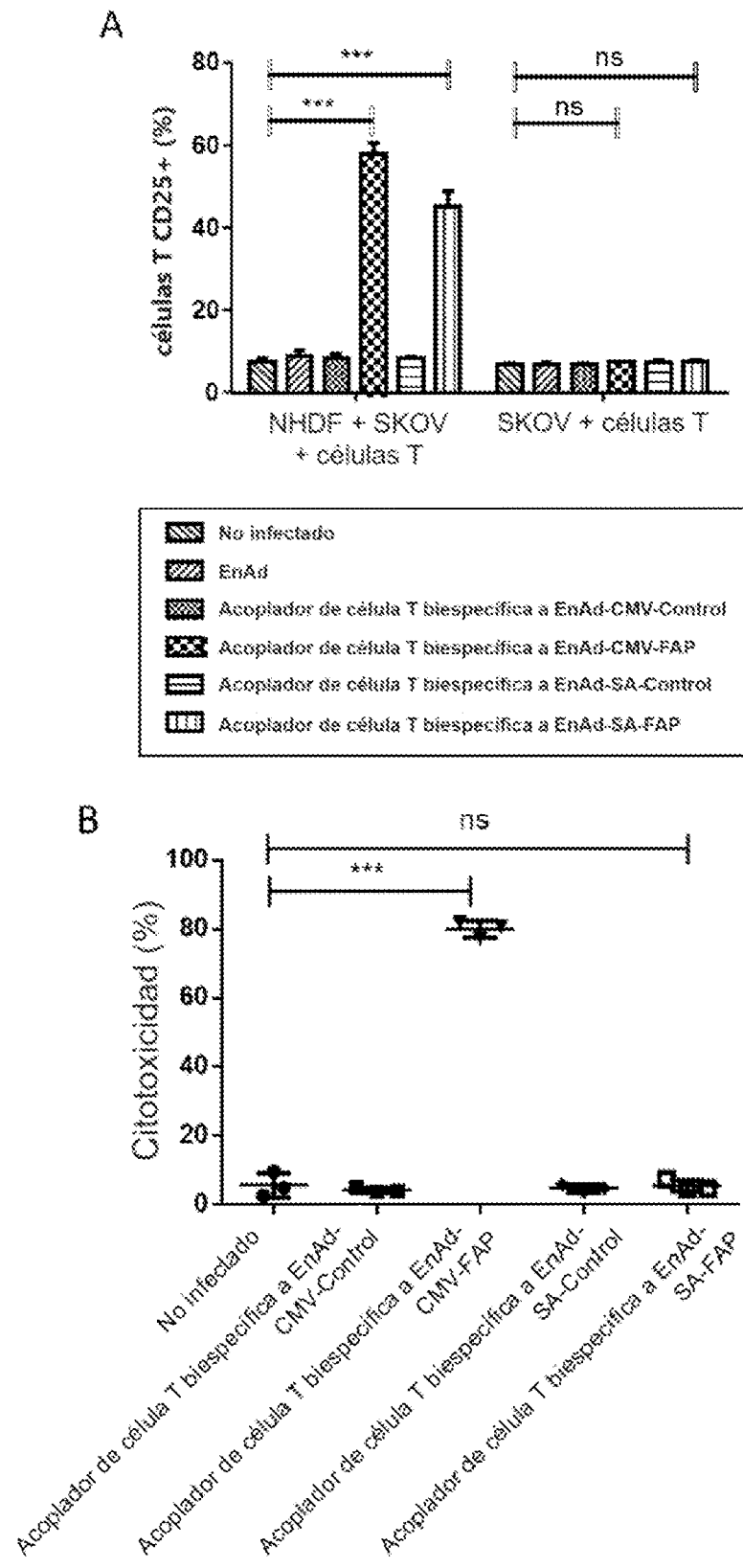


Figura 28

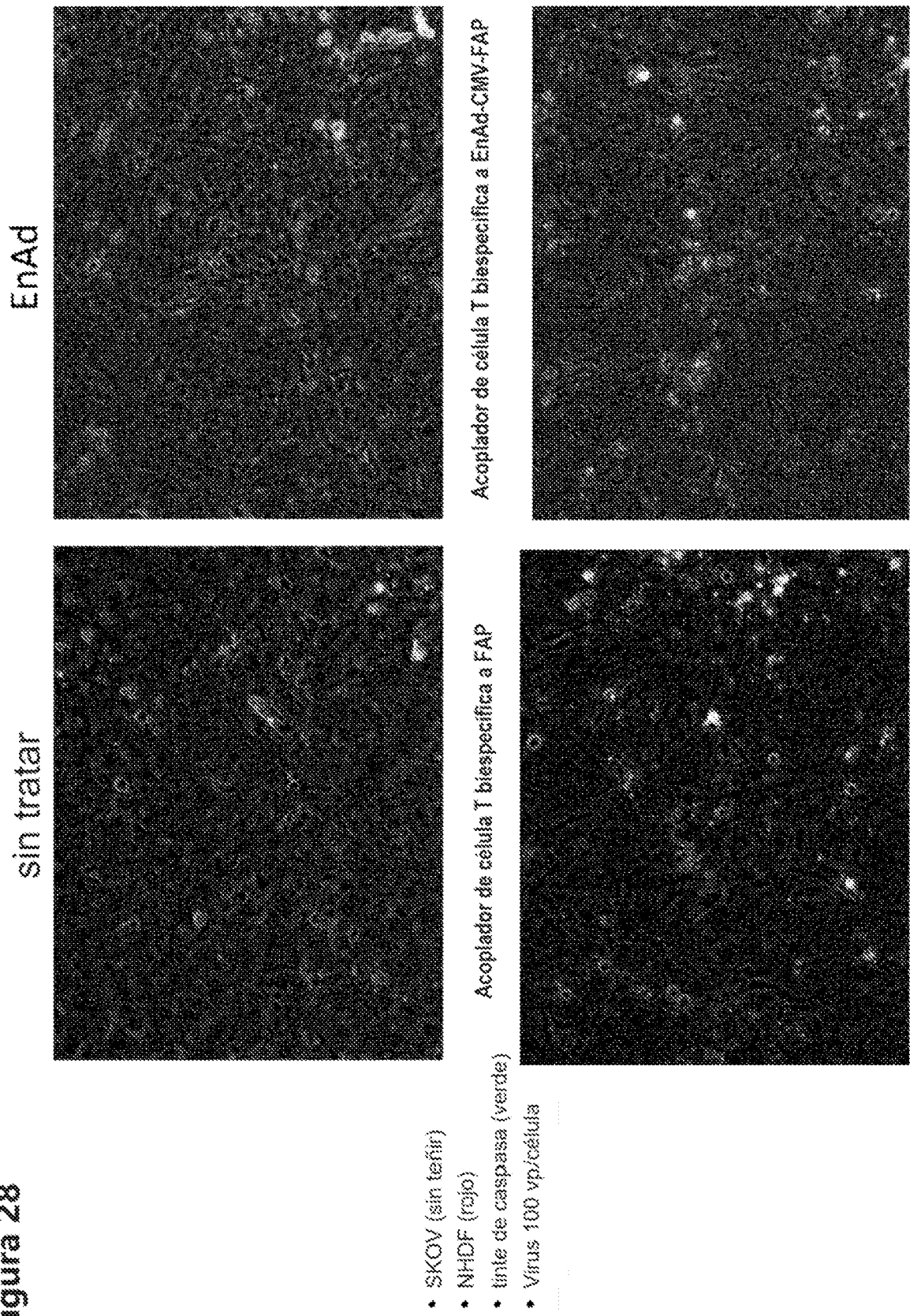


Figura 29

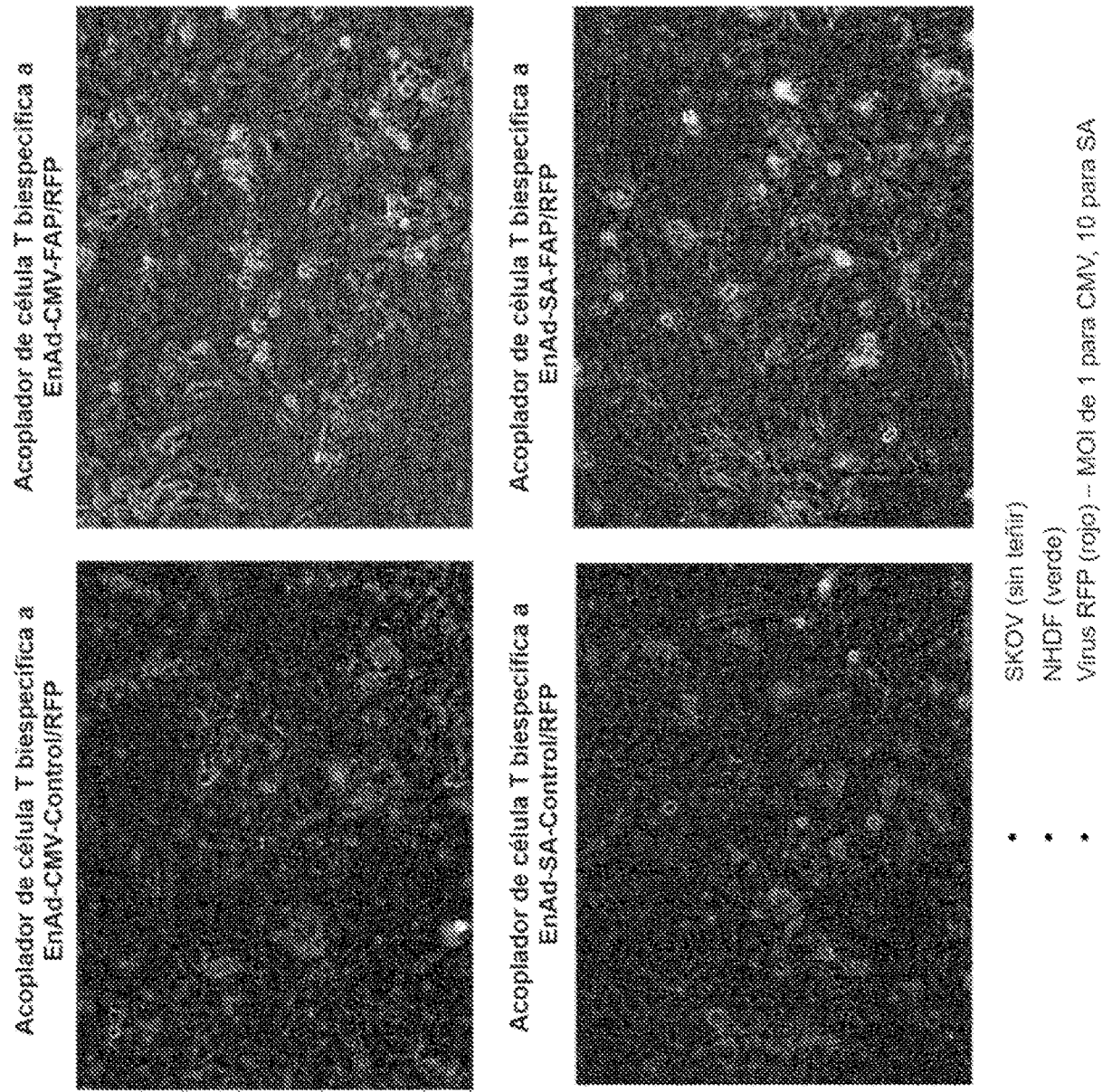


Figura 30

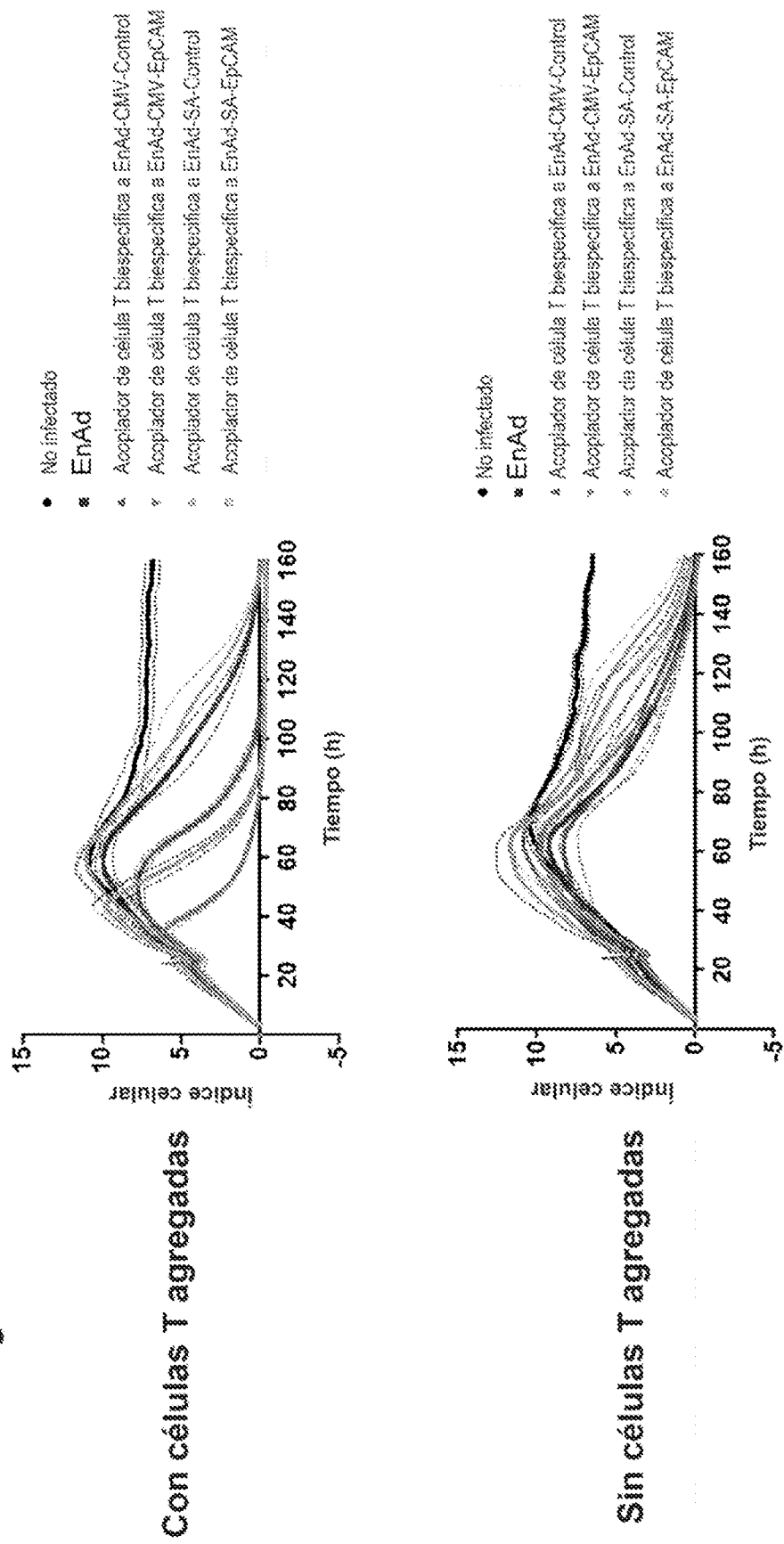


Figura 31

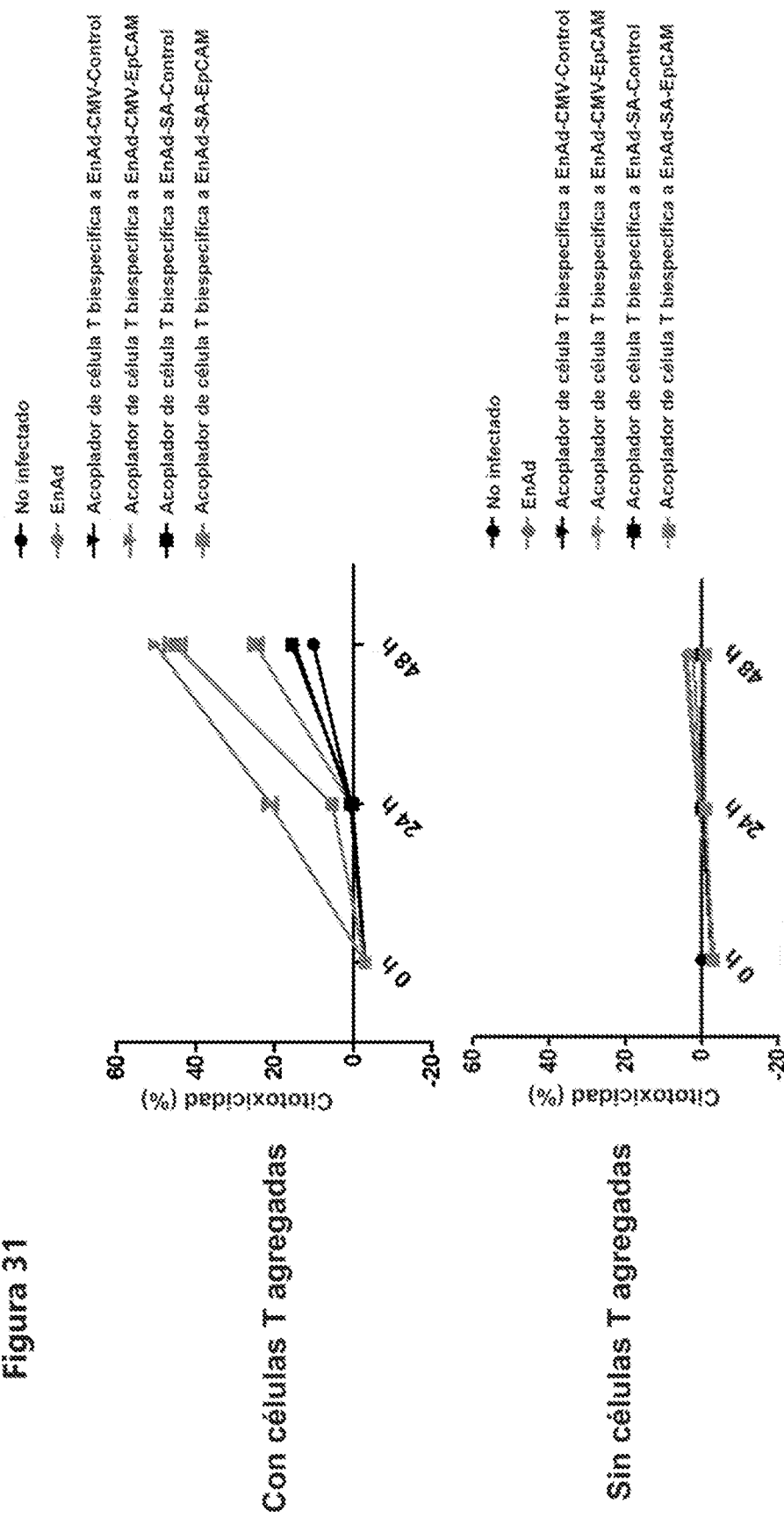


Figura 32

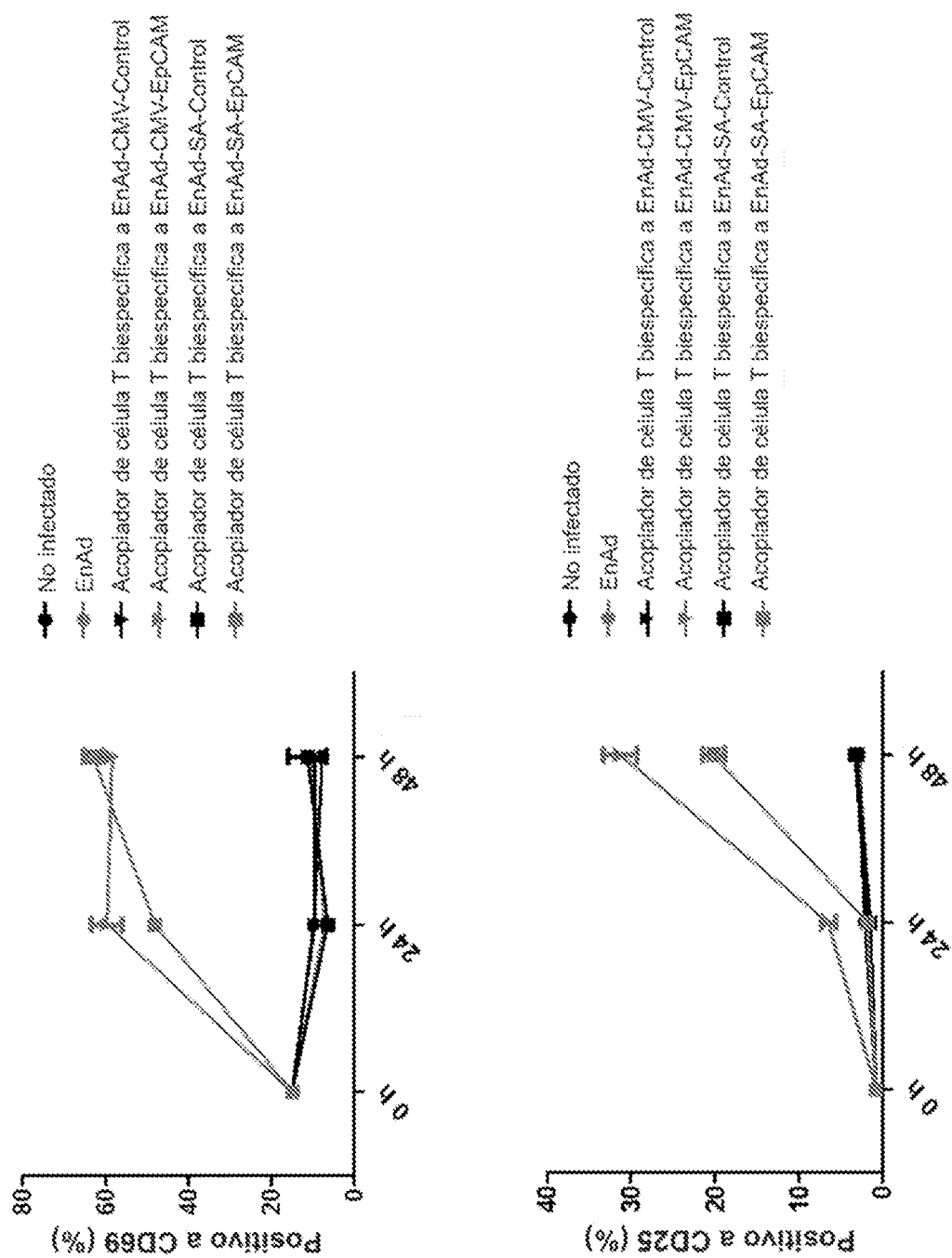


Figura 33

MOI: 10

Gris claro --
sin células T agregadas

Gris oscuro --
con células T agregadas

MOI: 1

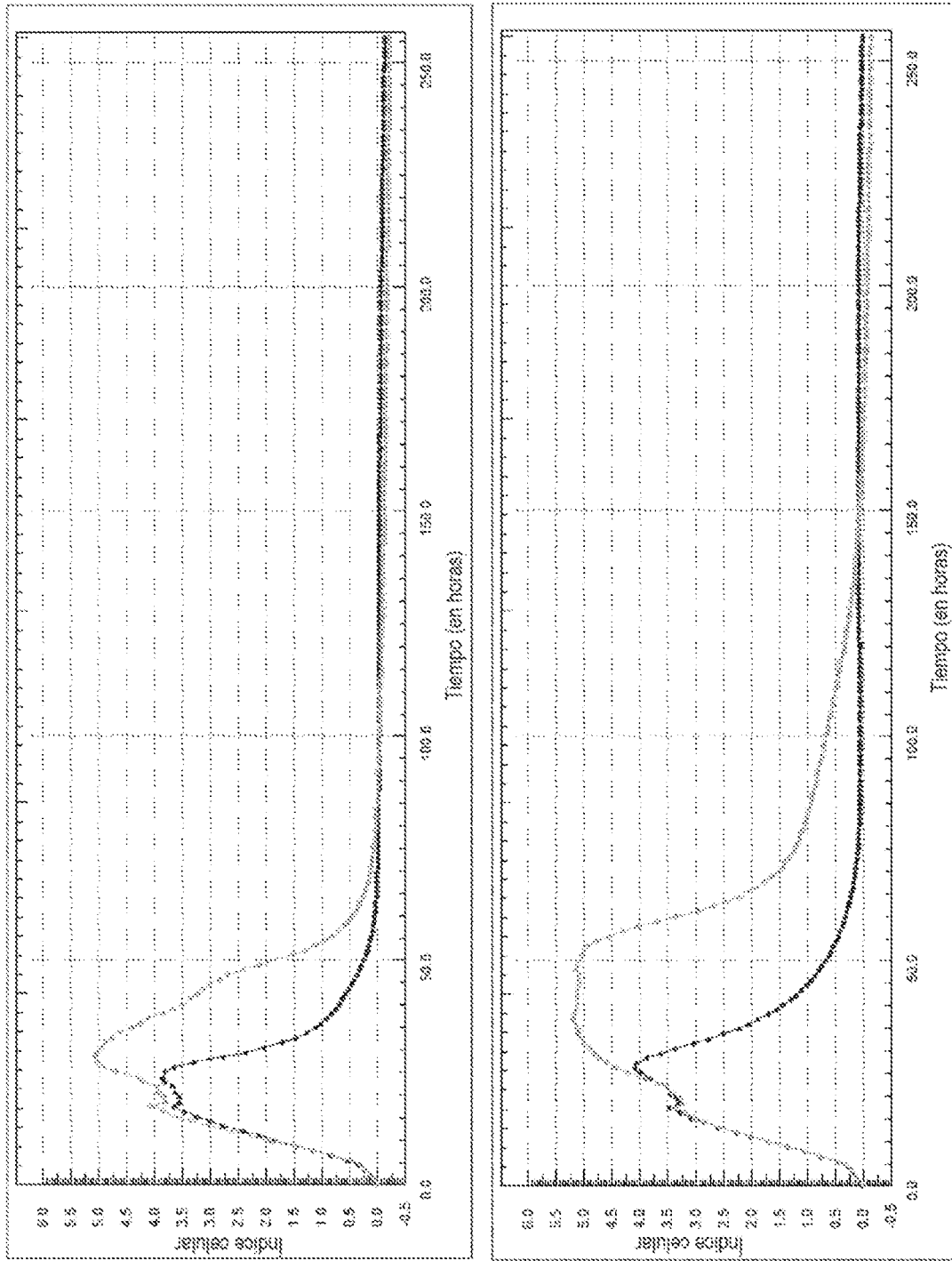
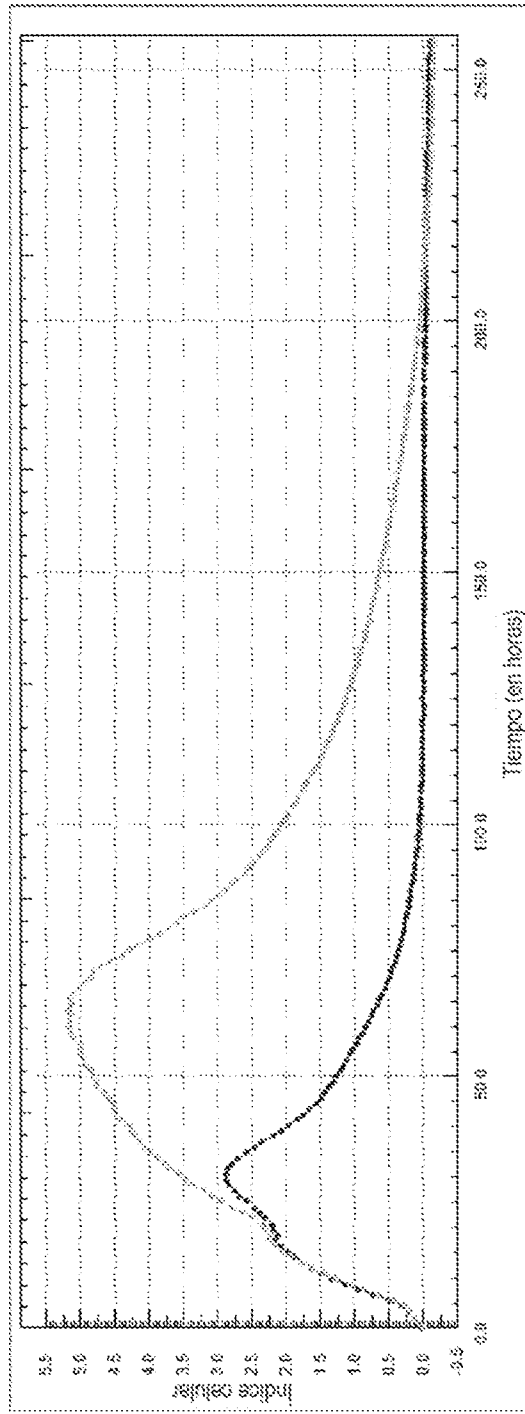


Figura 33 continuación

MOI: 0.1



Gris claro --
sin células T agregadas

Gris oscuro --
con células T agregadas

MOI: 0.01

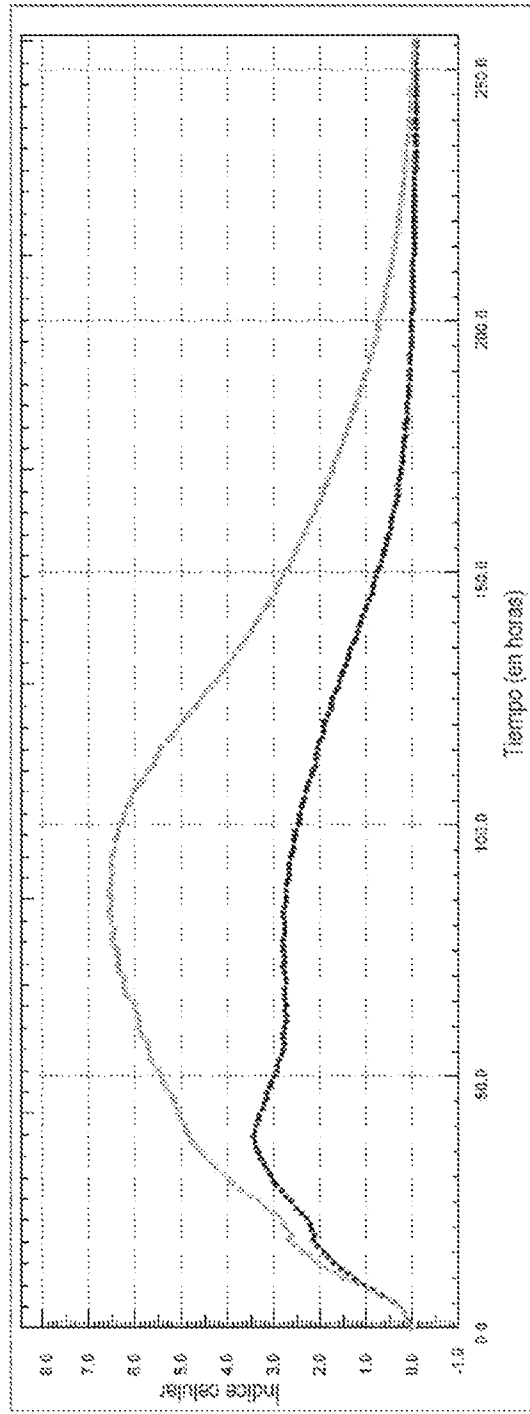


Figura 33 continuación

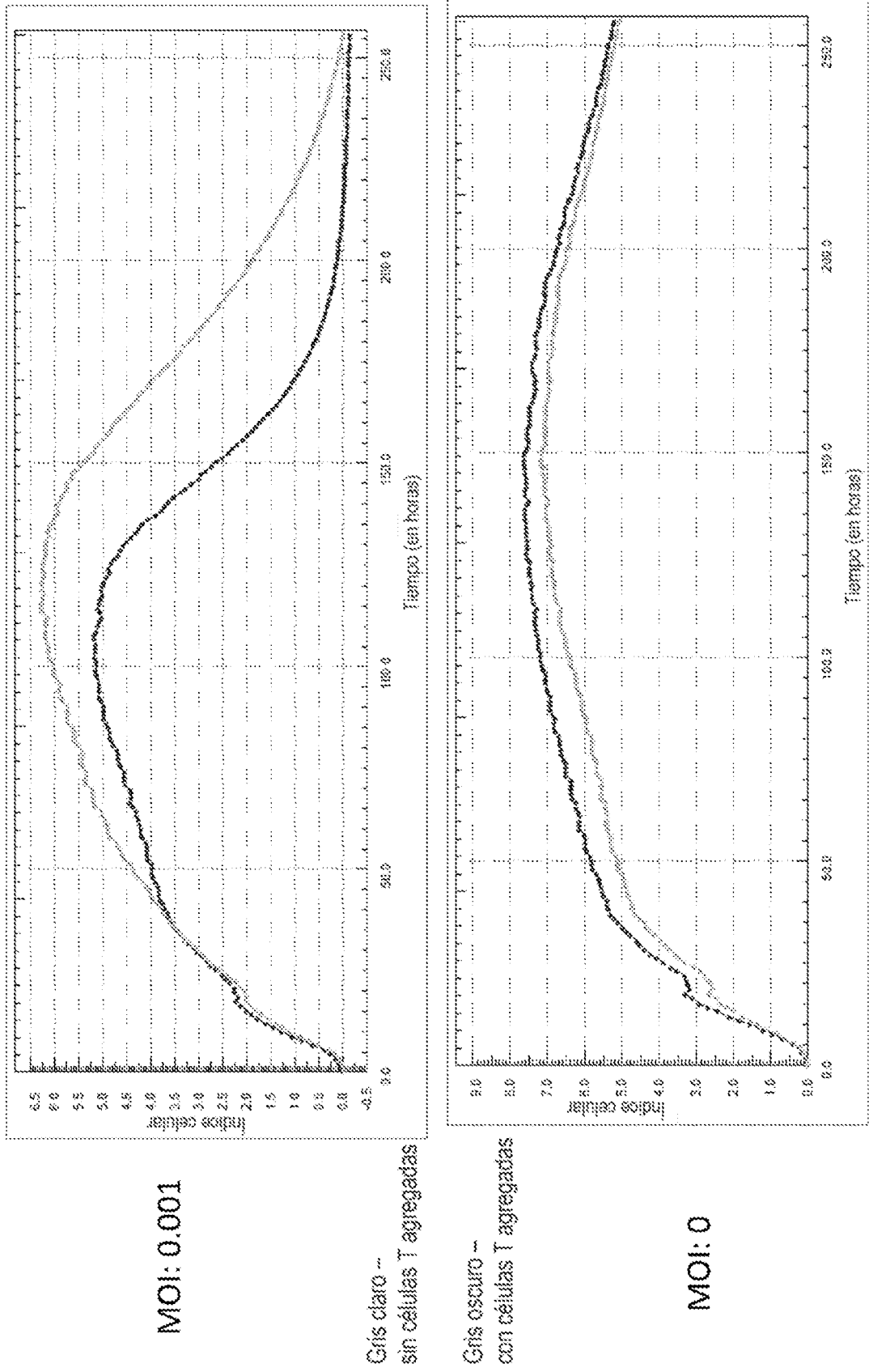
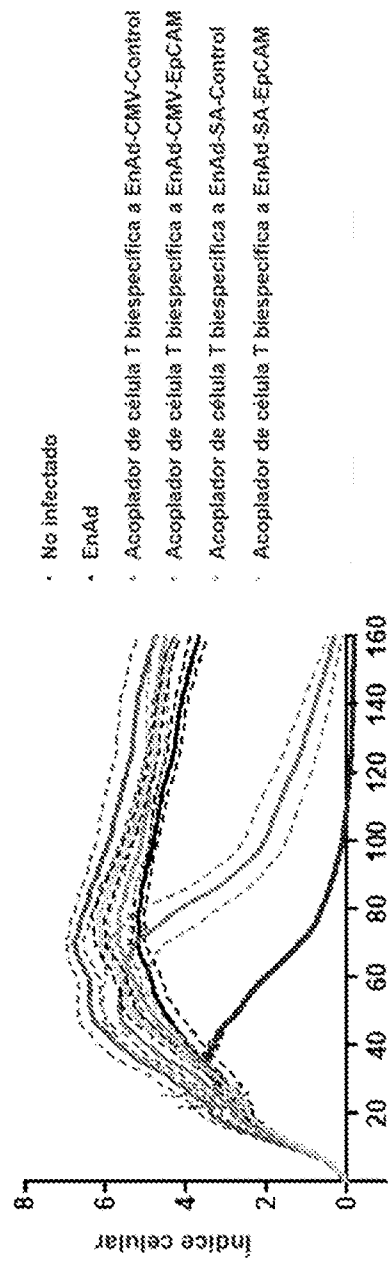


Figura 34

Con células T agregadas



Sin células T agregadas

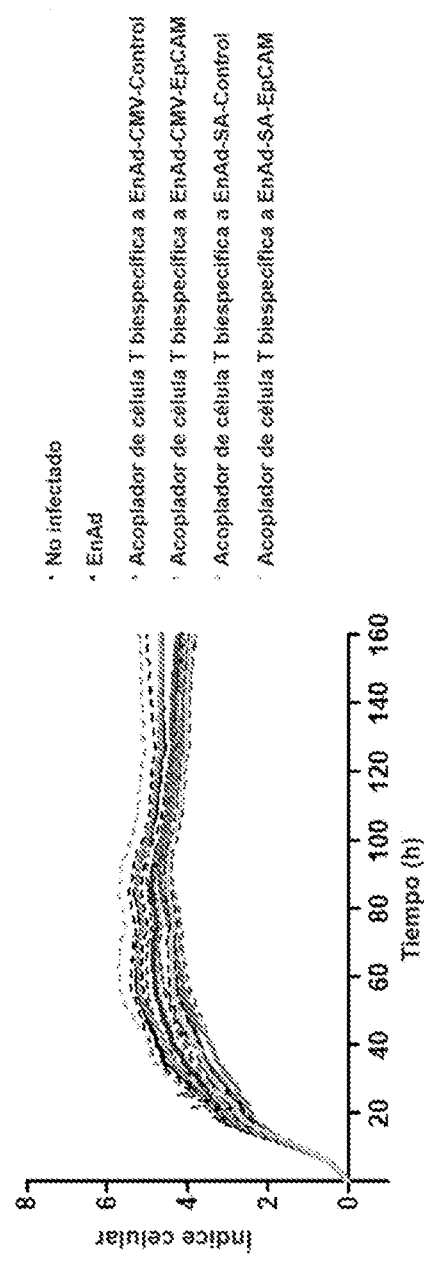


Figura 35

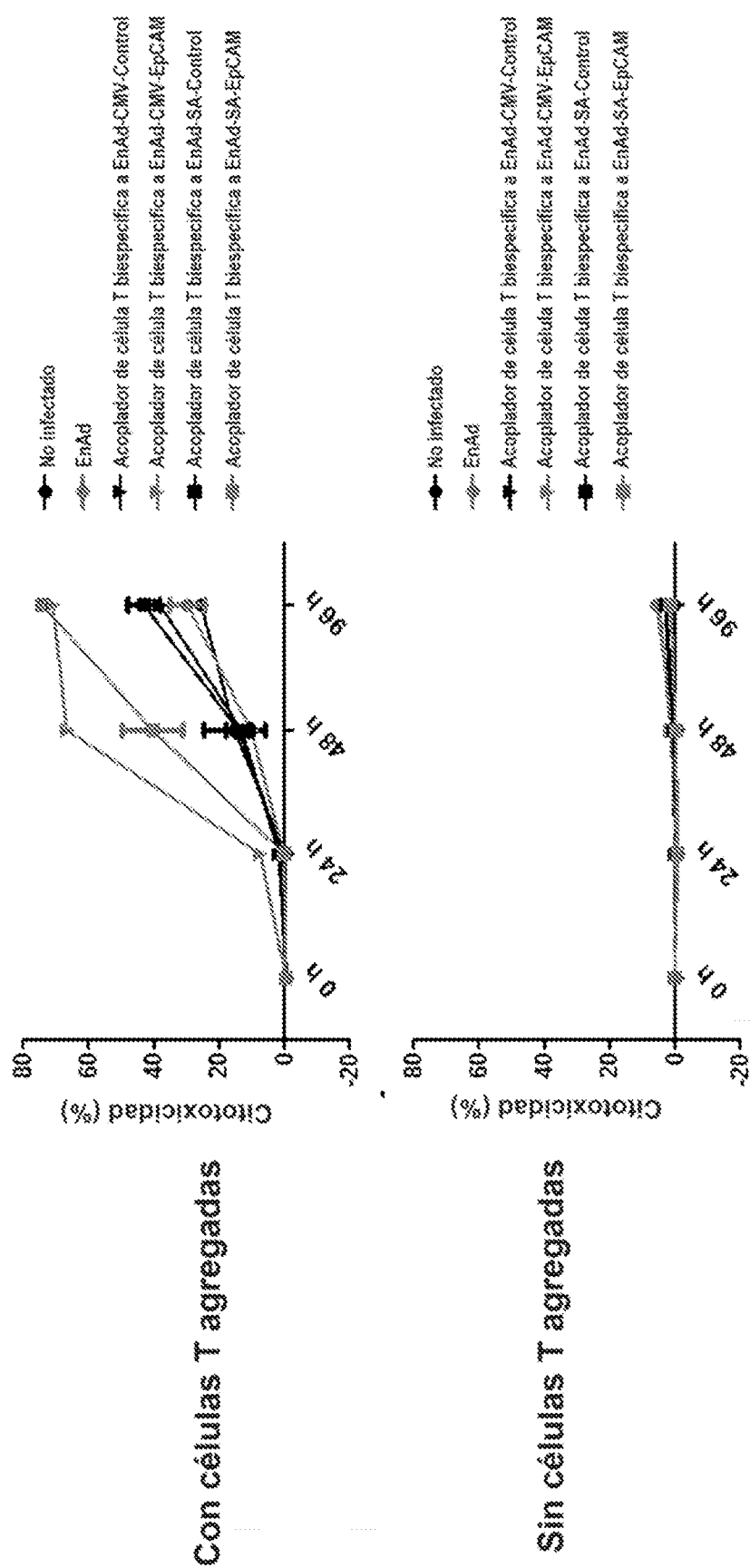


Figura 36

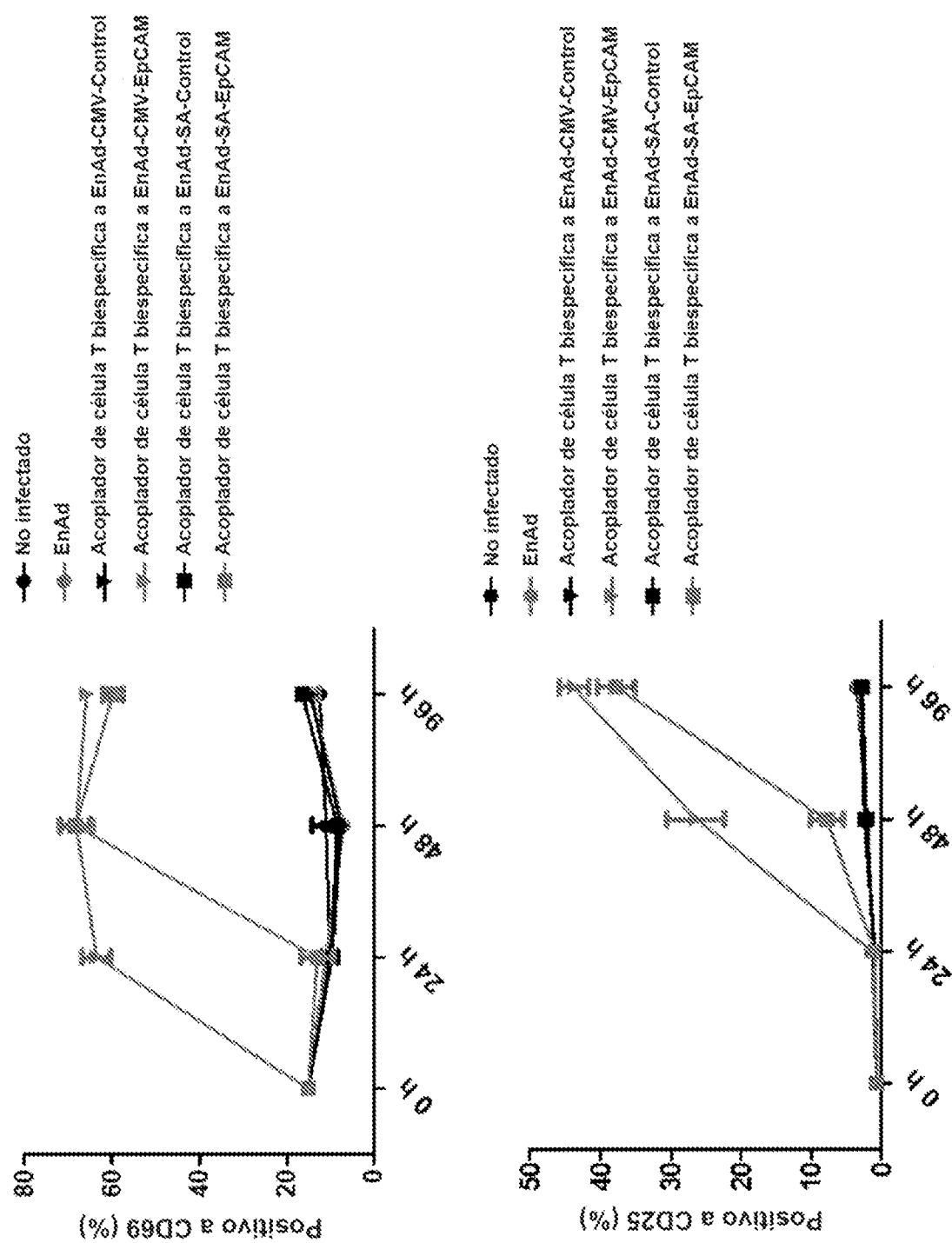


Figura 37

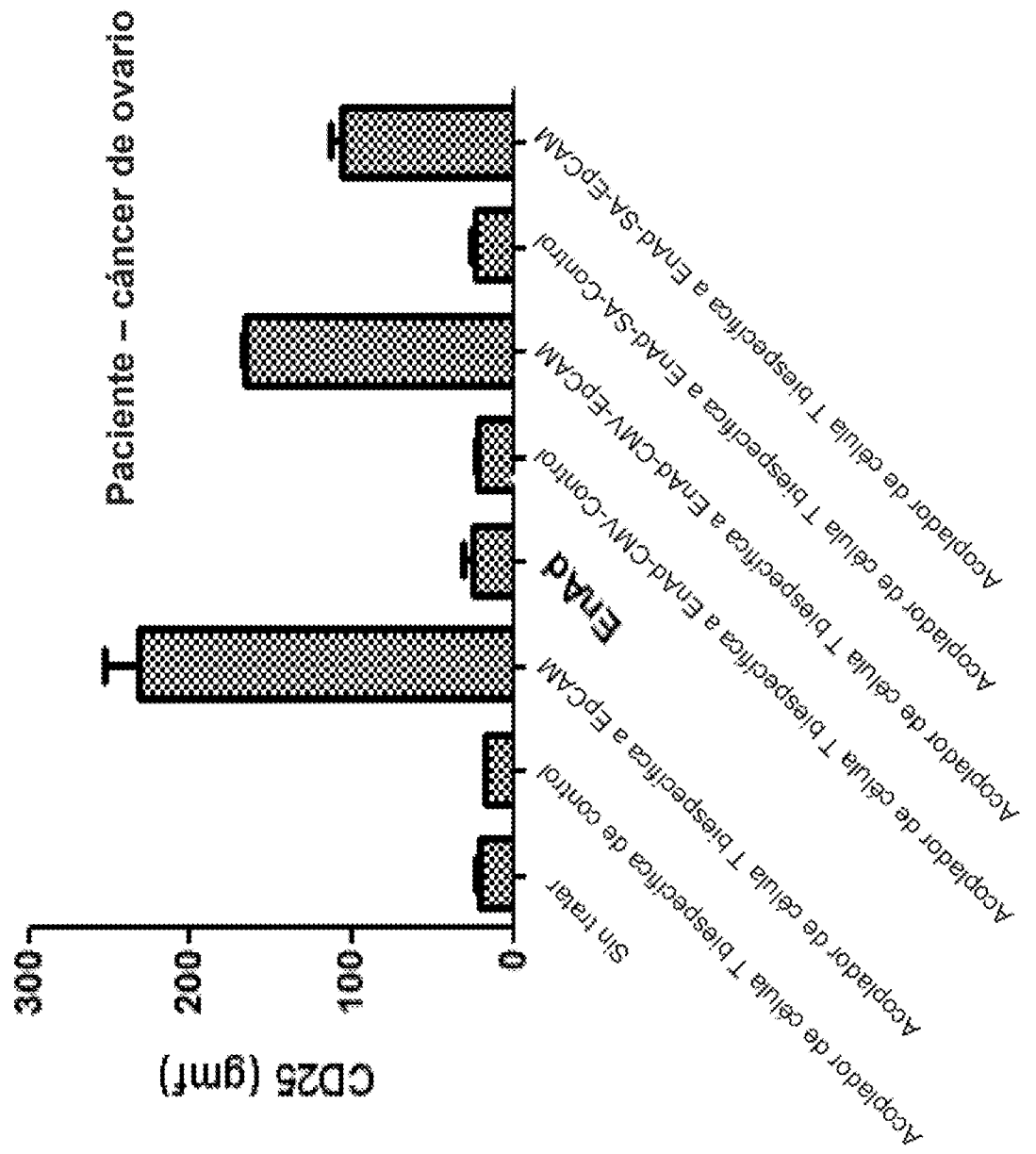


Figura 38

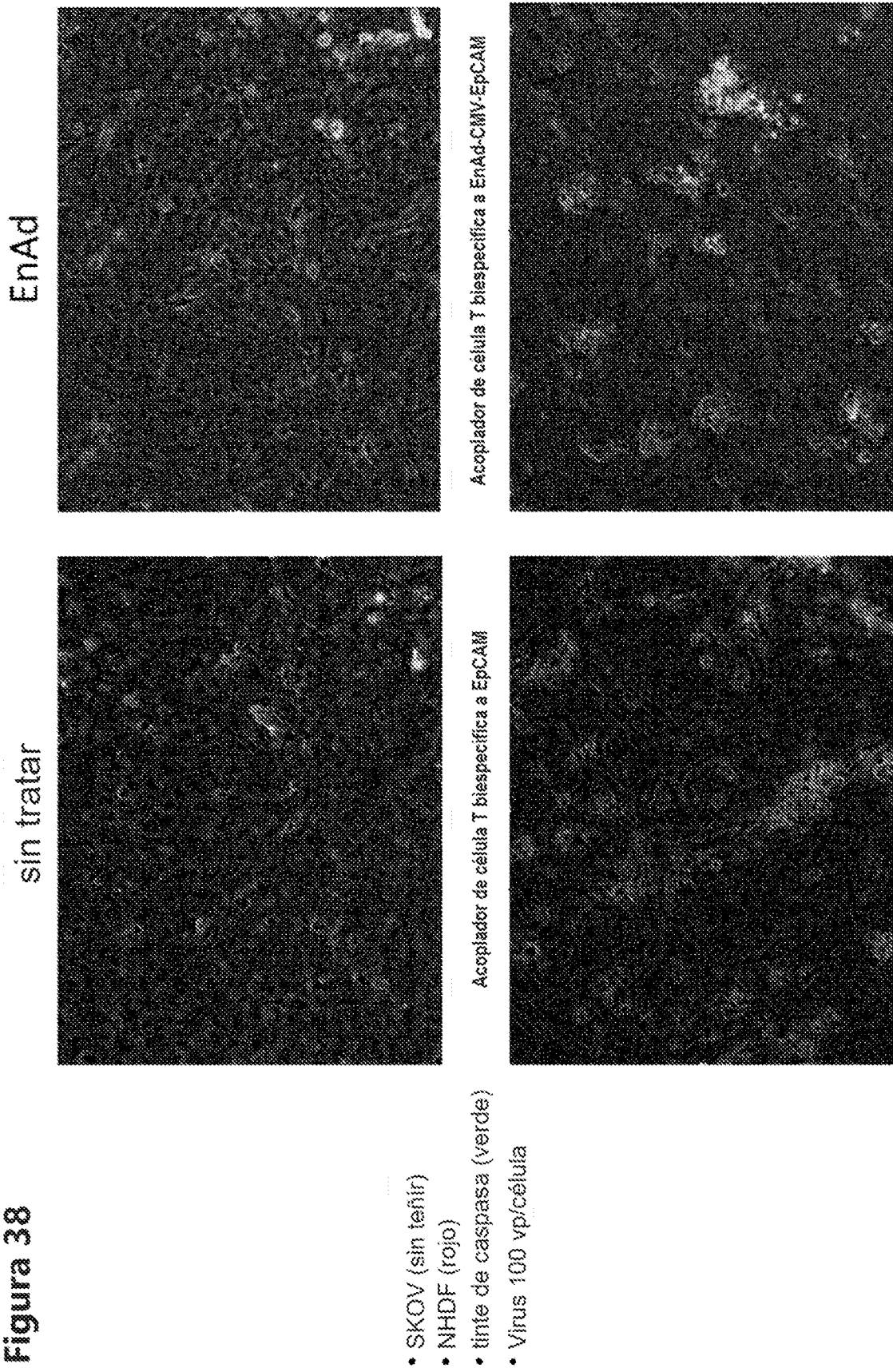


Figura 39

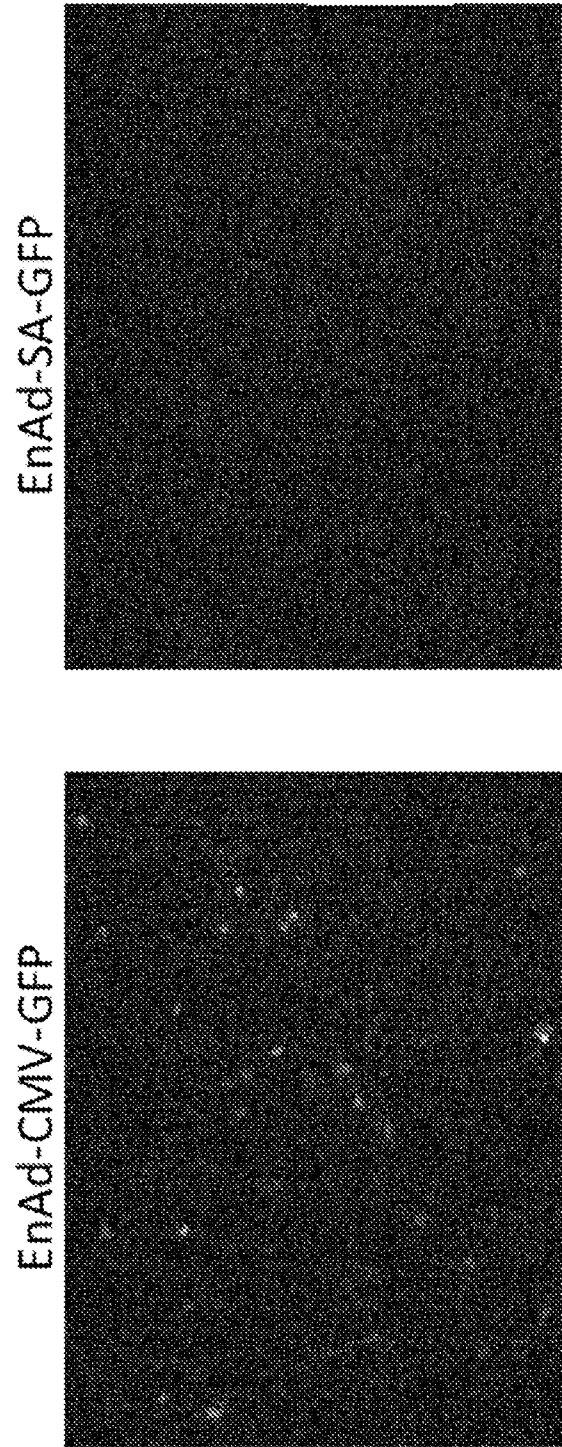
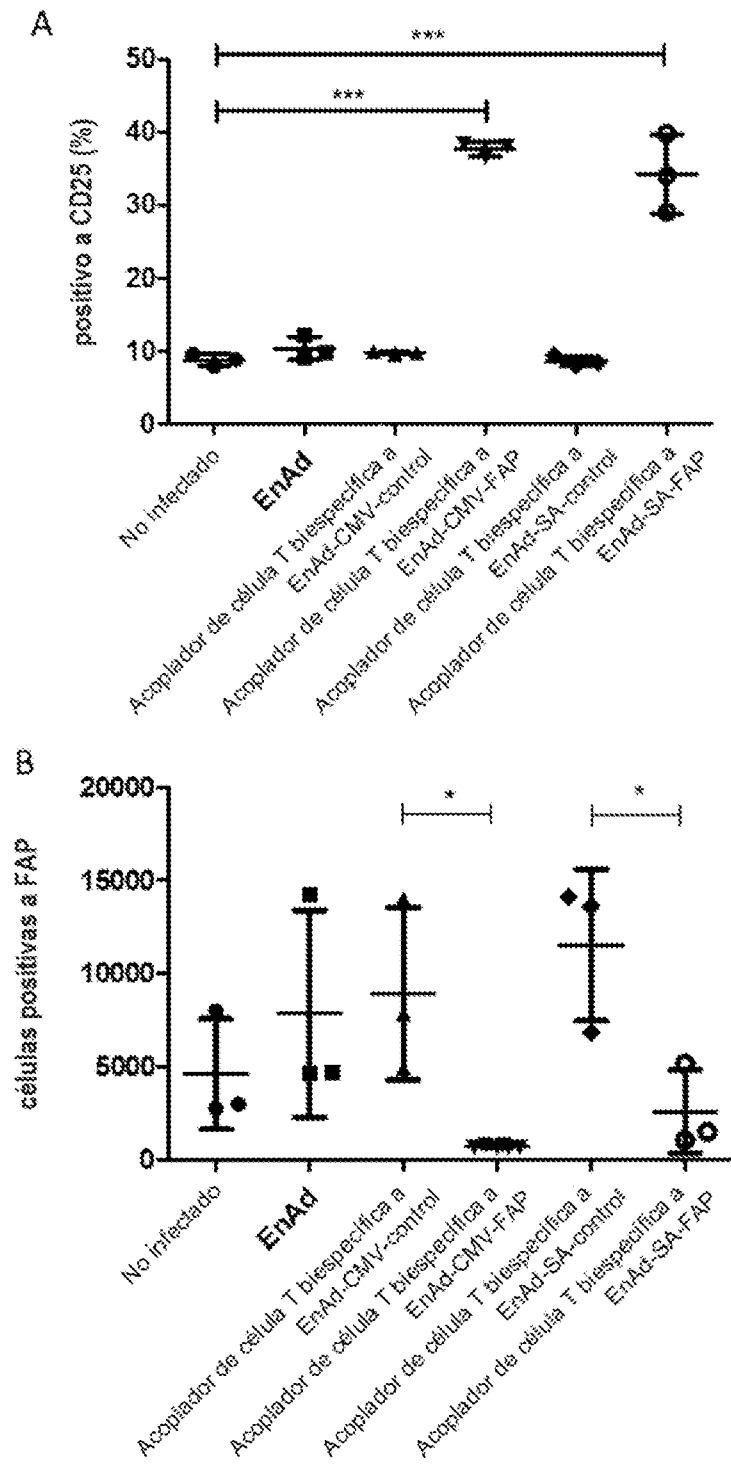
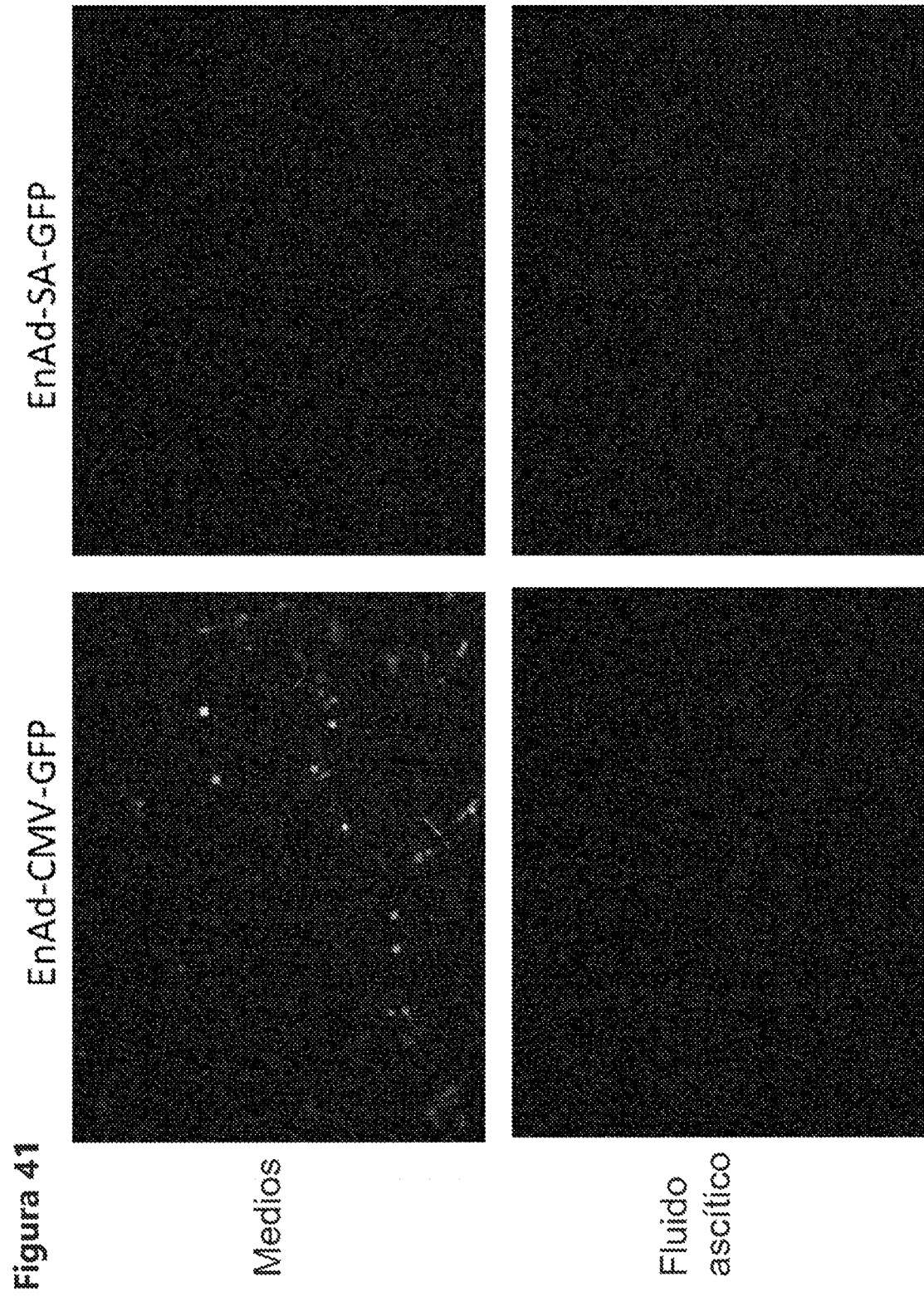
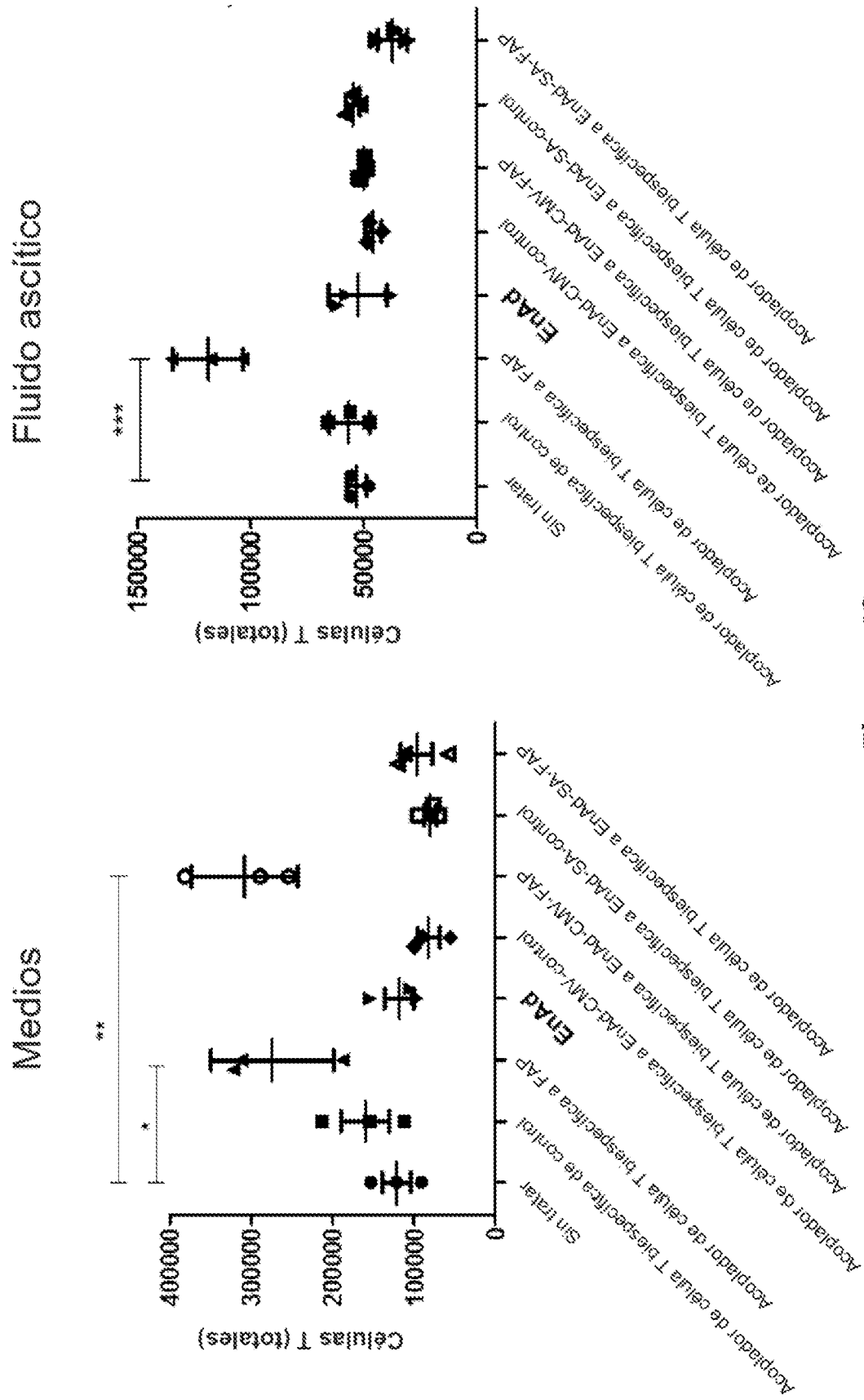
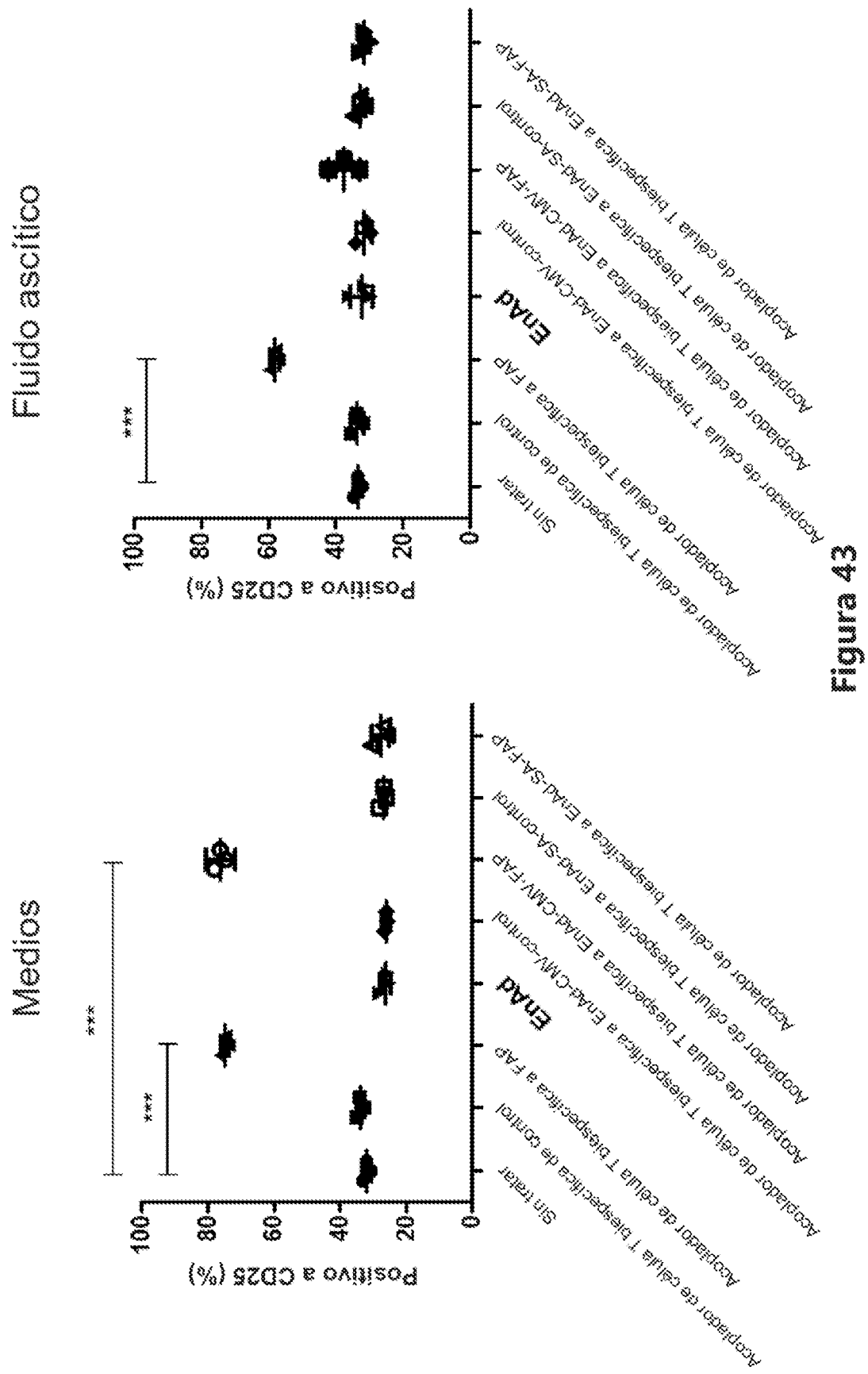


Figura 40









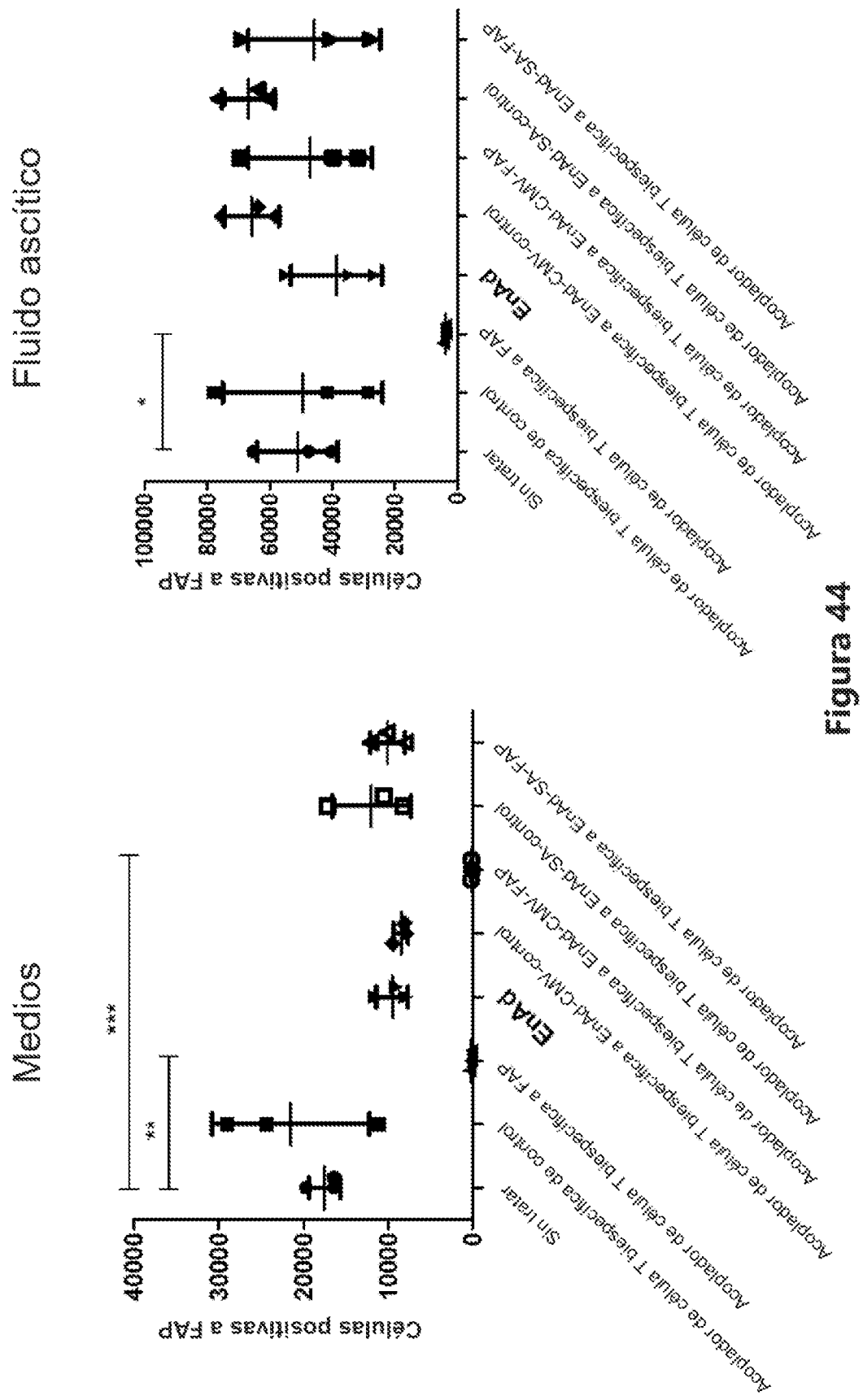
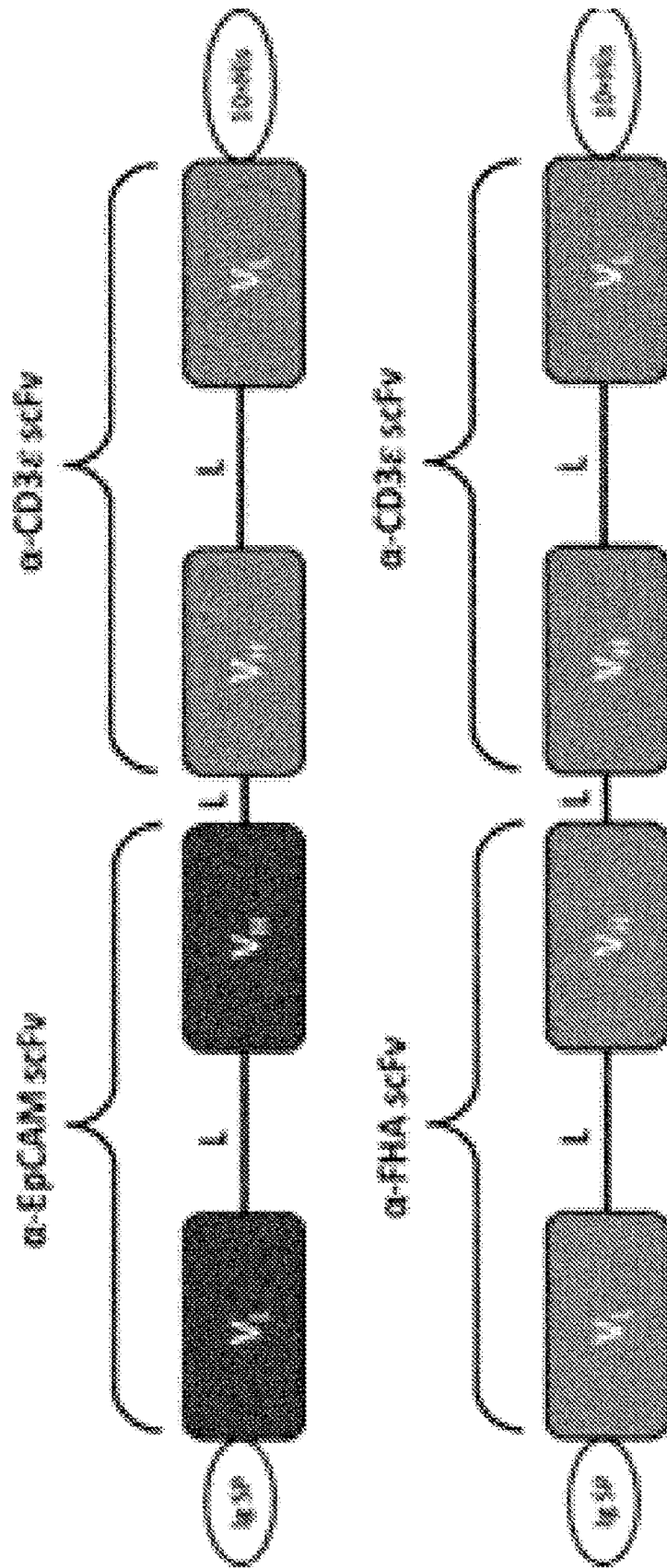
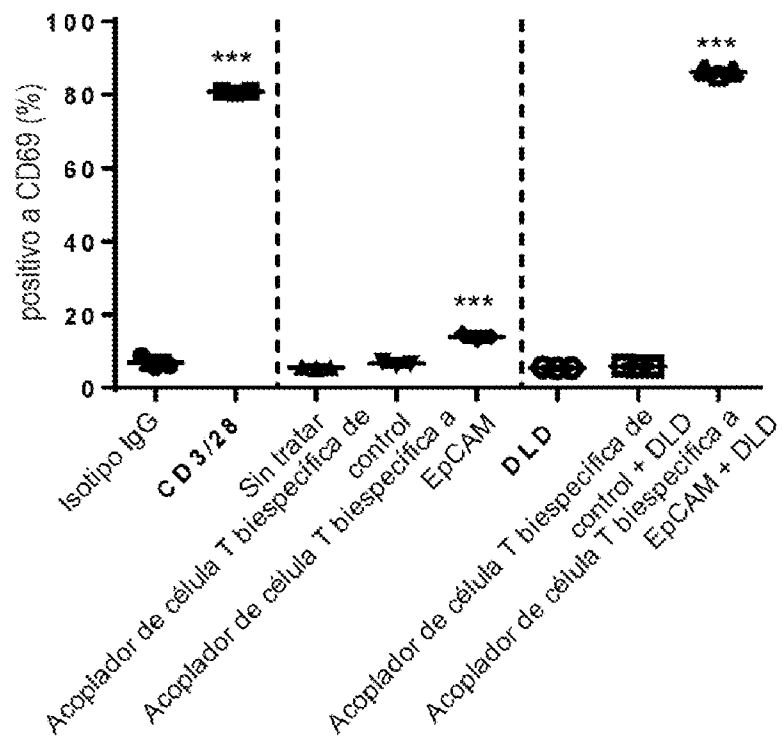


Figura 45A



B



C

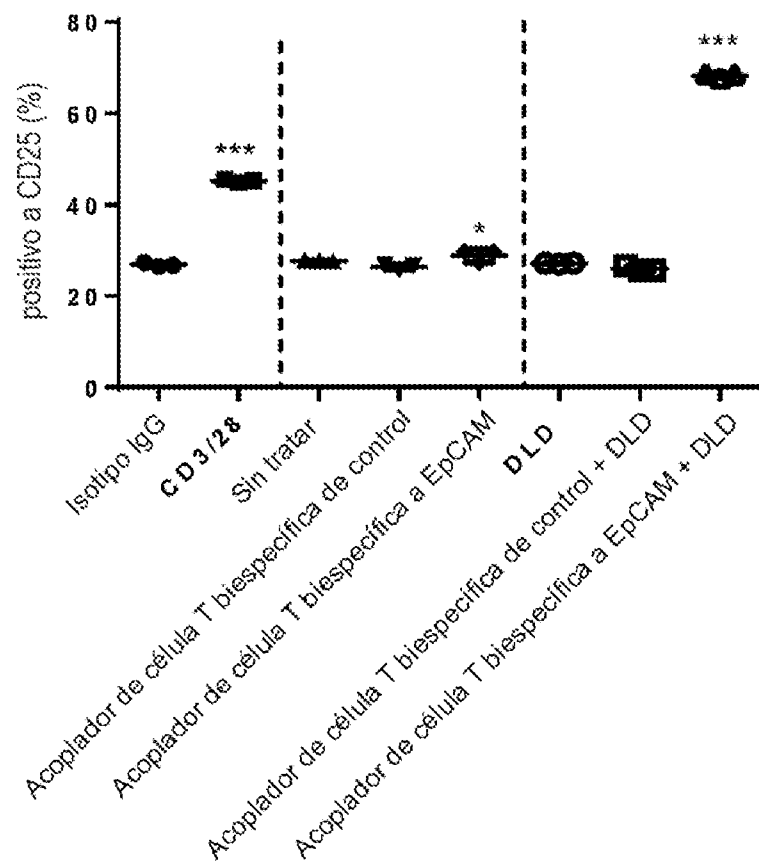


Figura 45 continuación

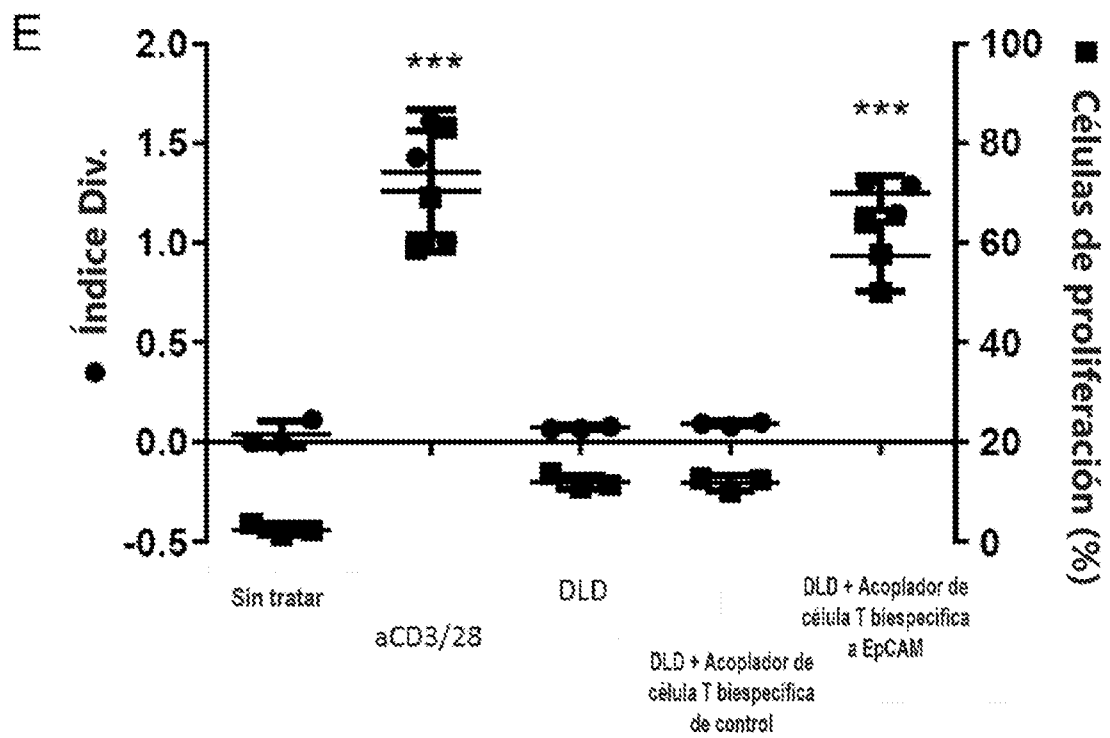
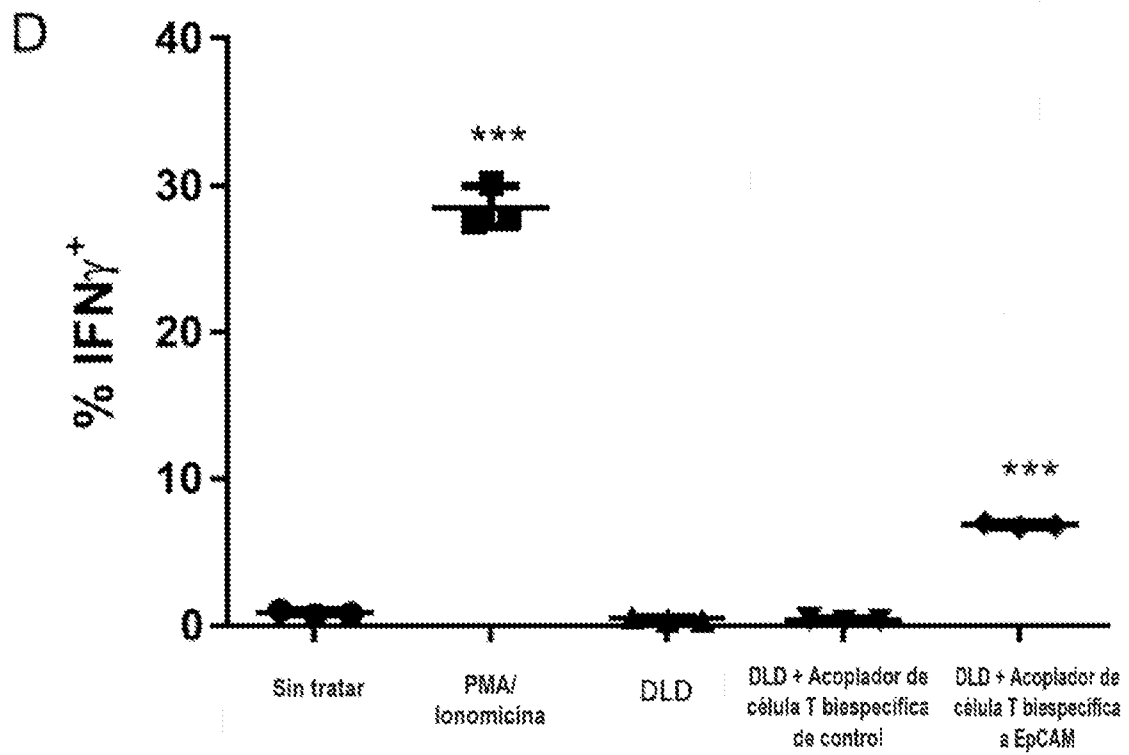


Figura 45 continuación

Figura 45 continuación

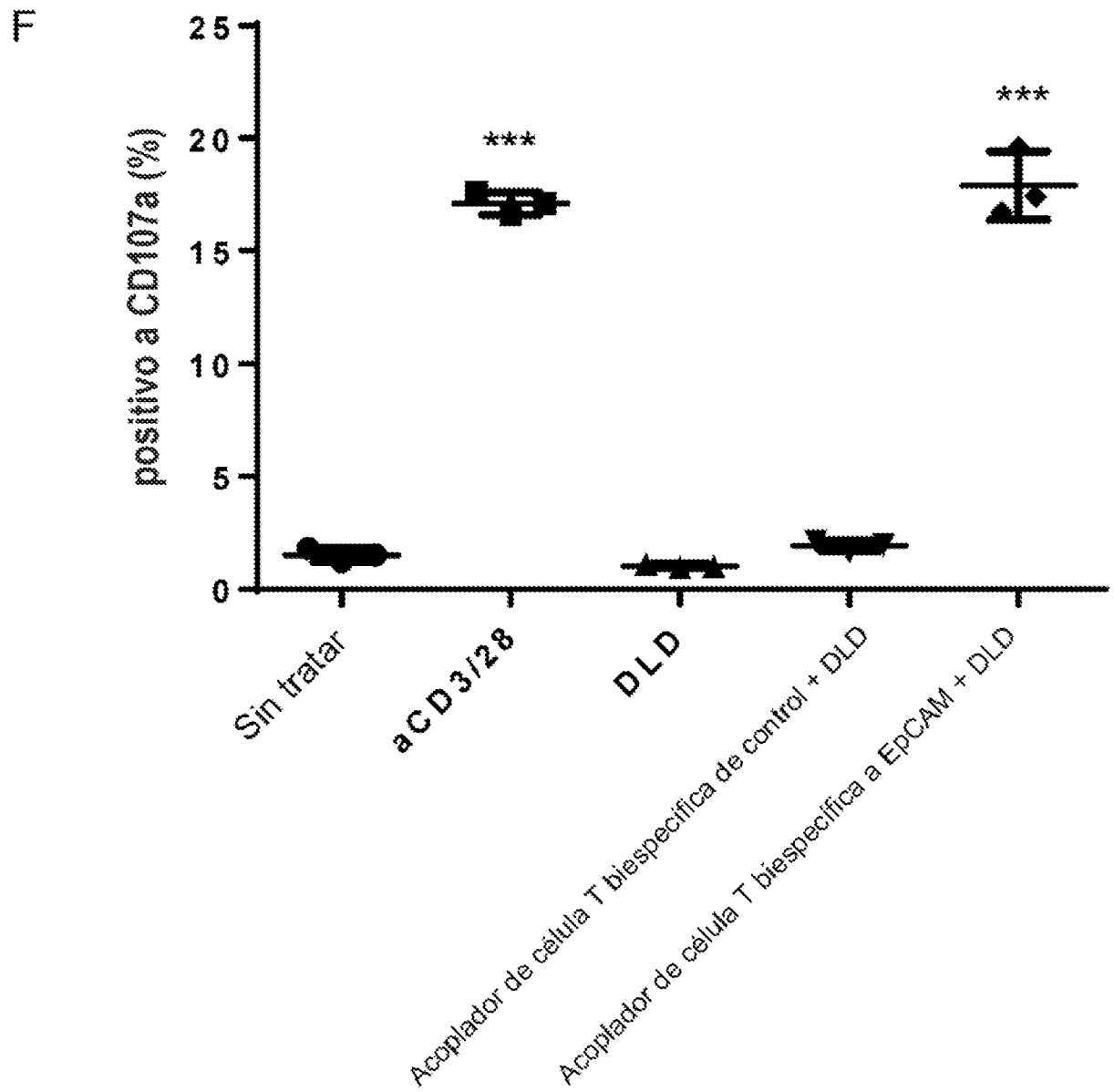
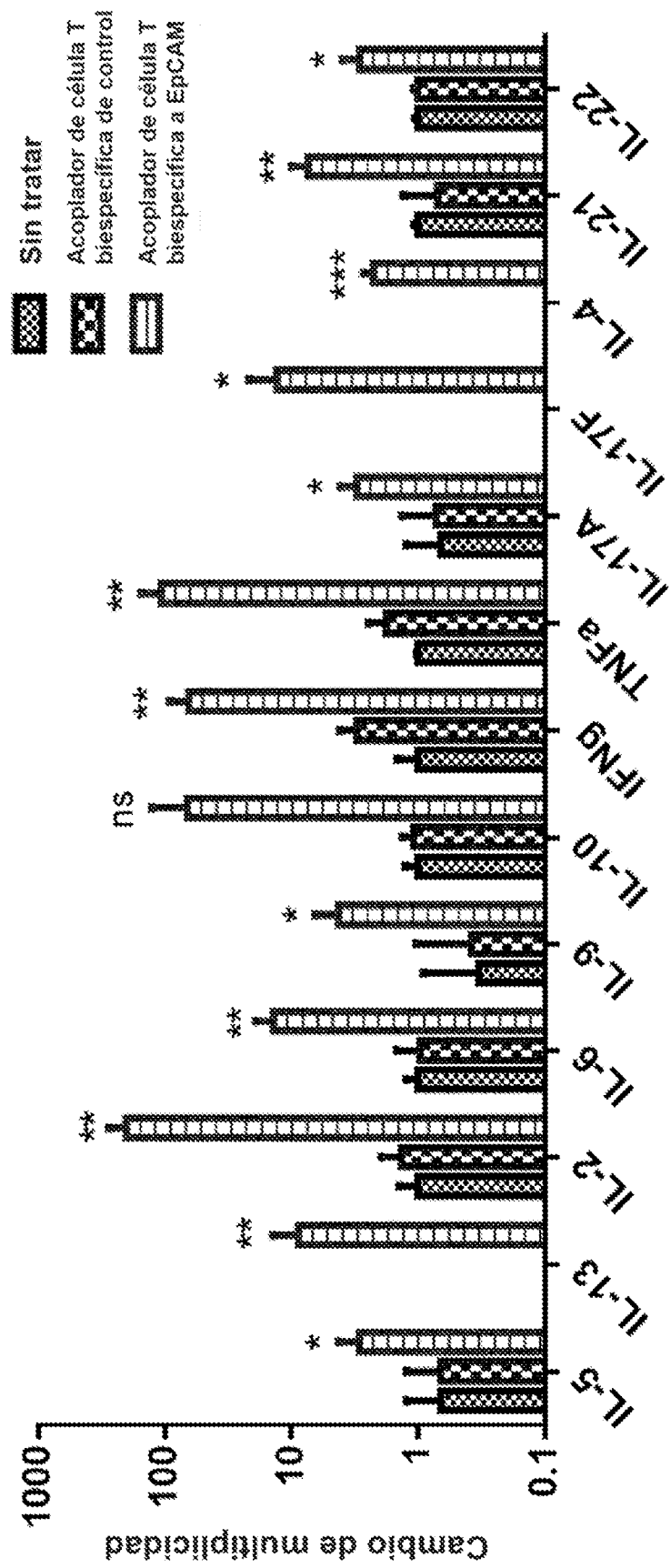
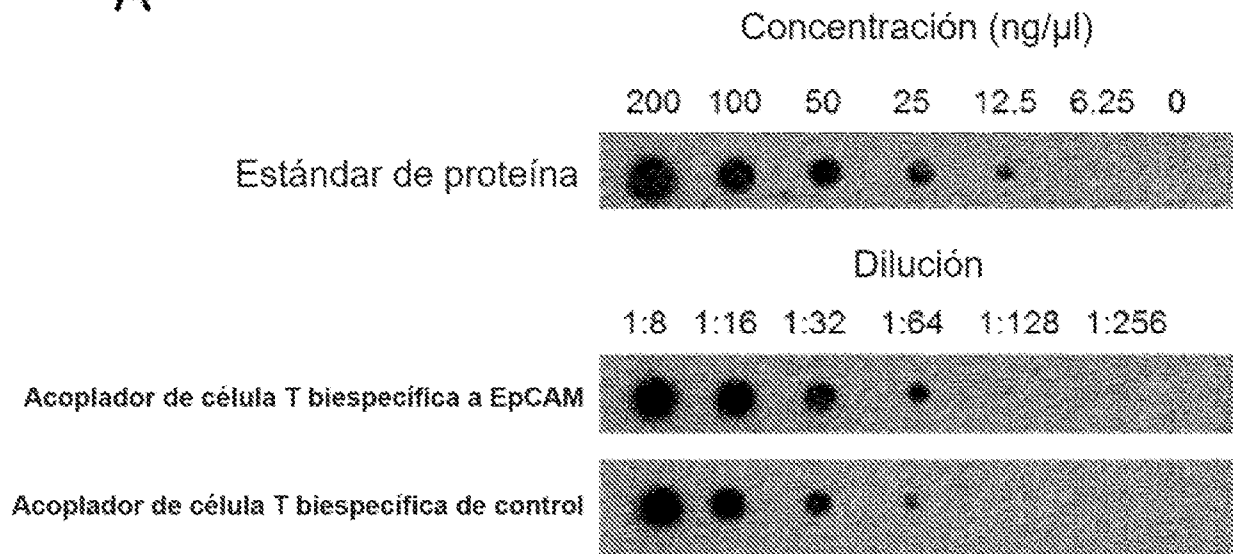


Figura 45G



A



B

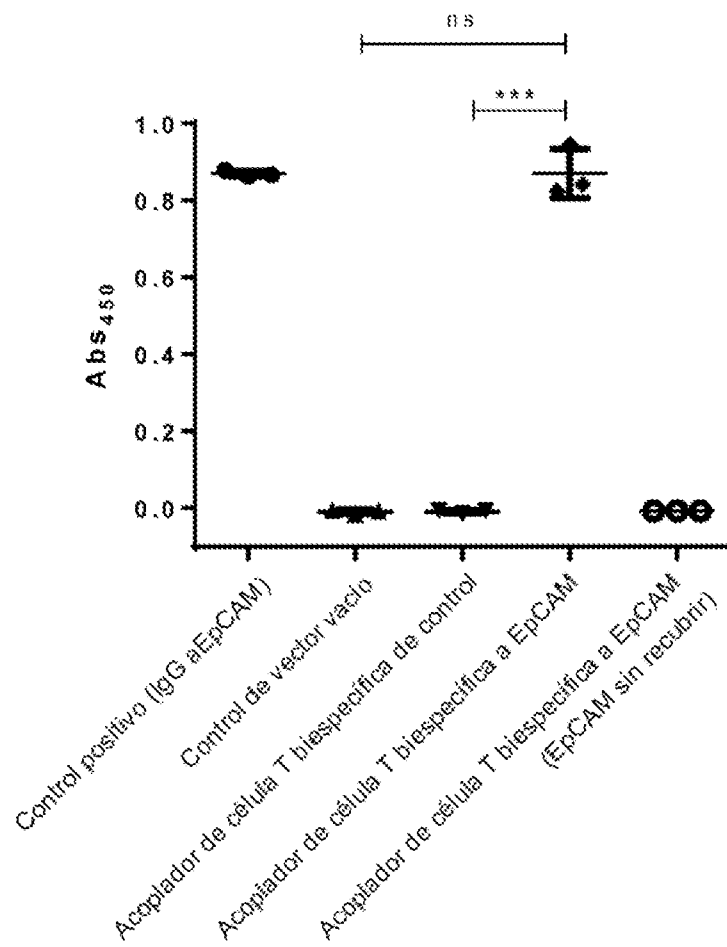


Figura 46

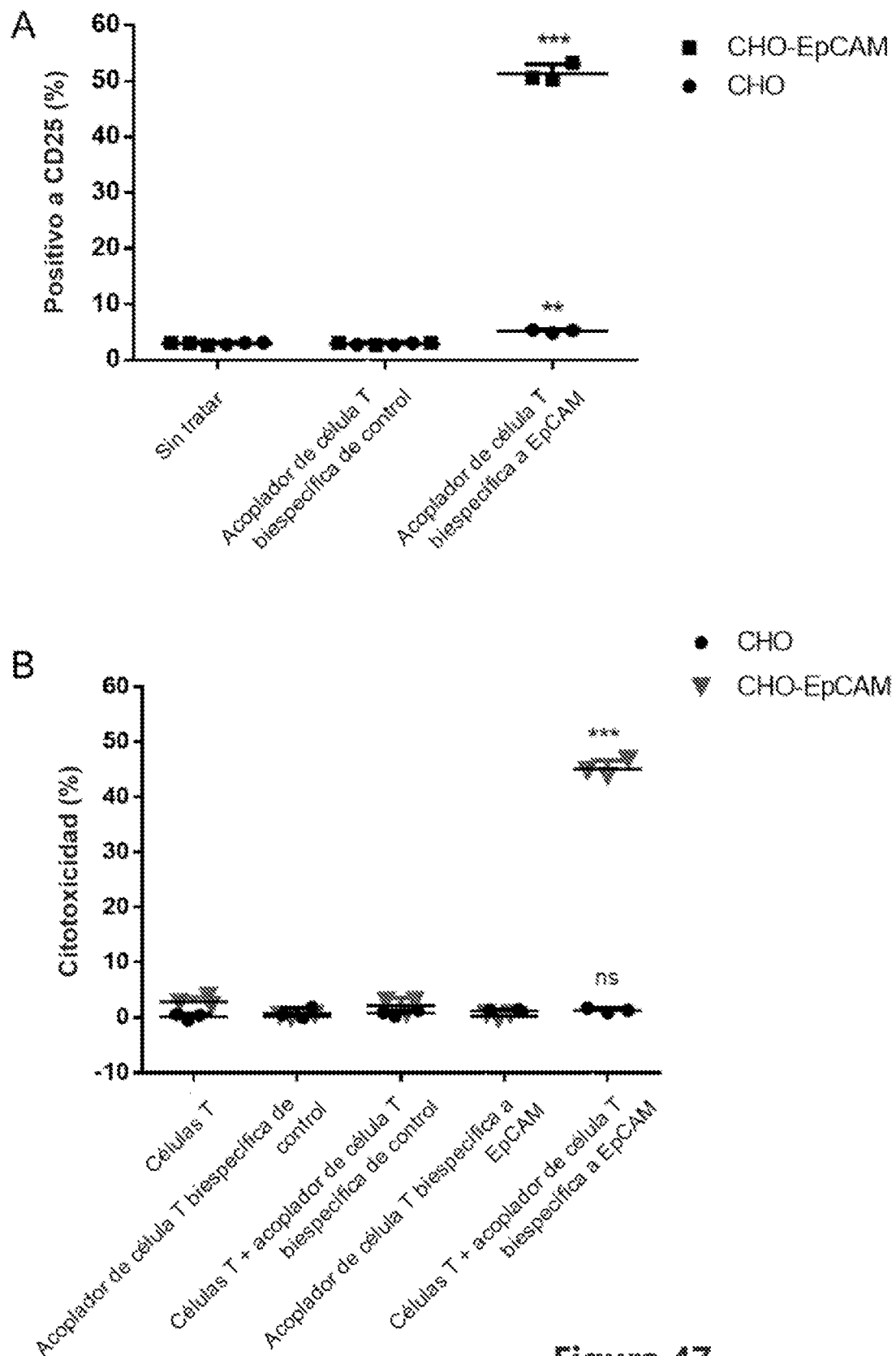


Figura 47

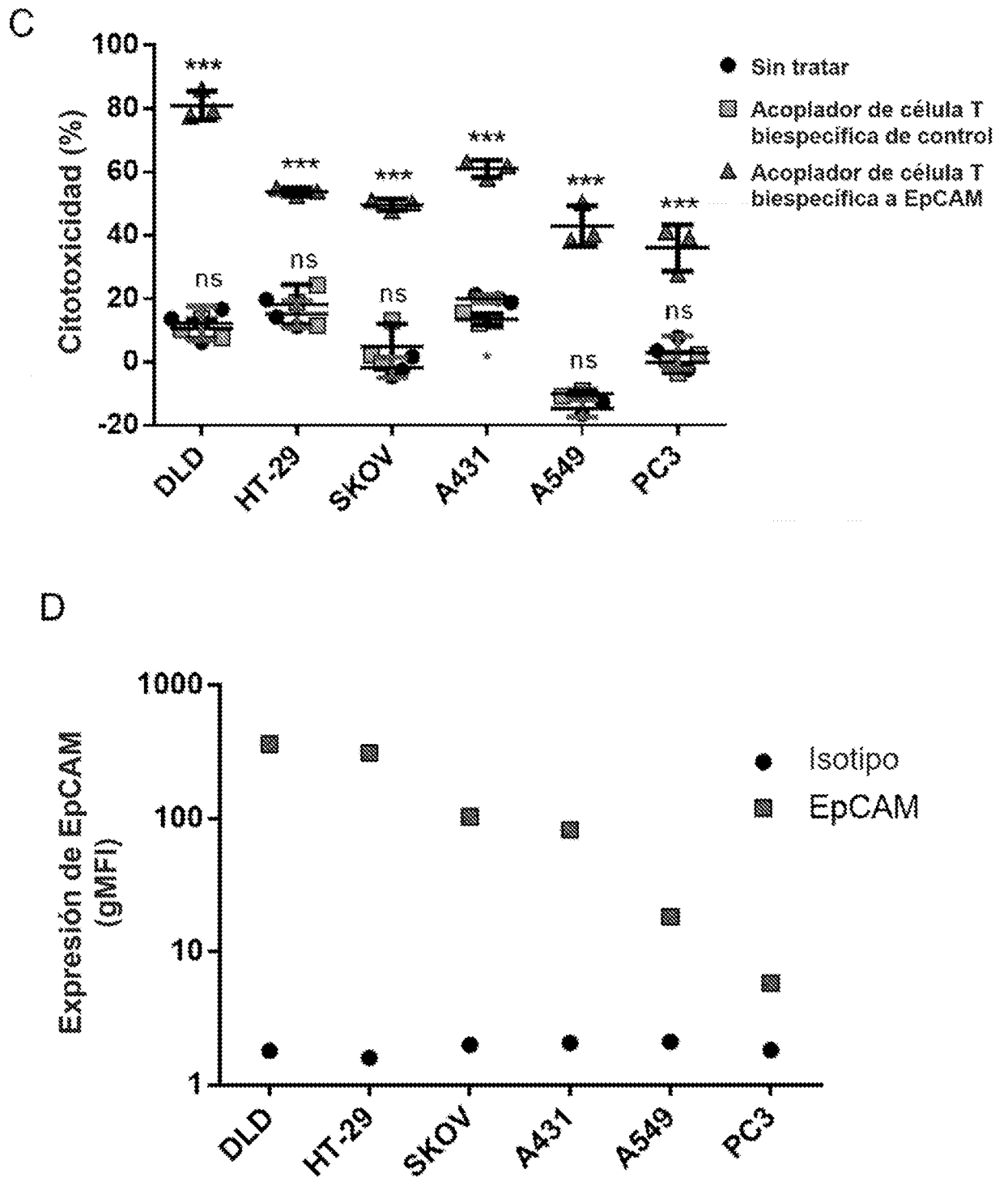


Figura 47 continuación

Figura 48

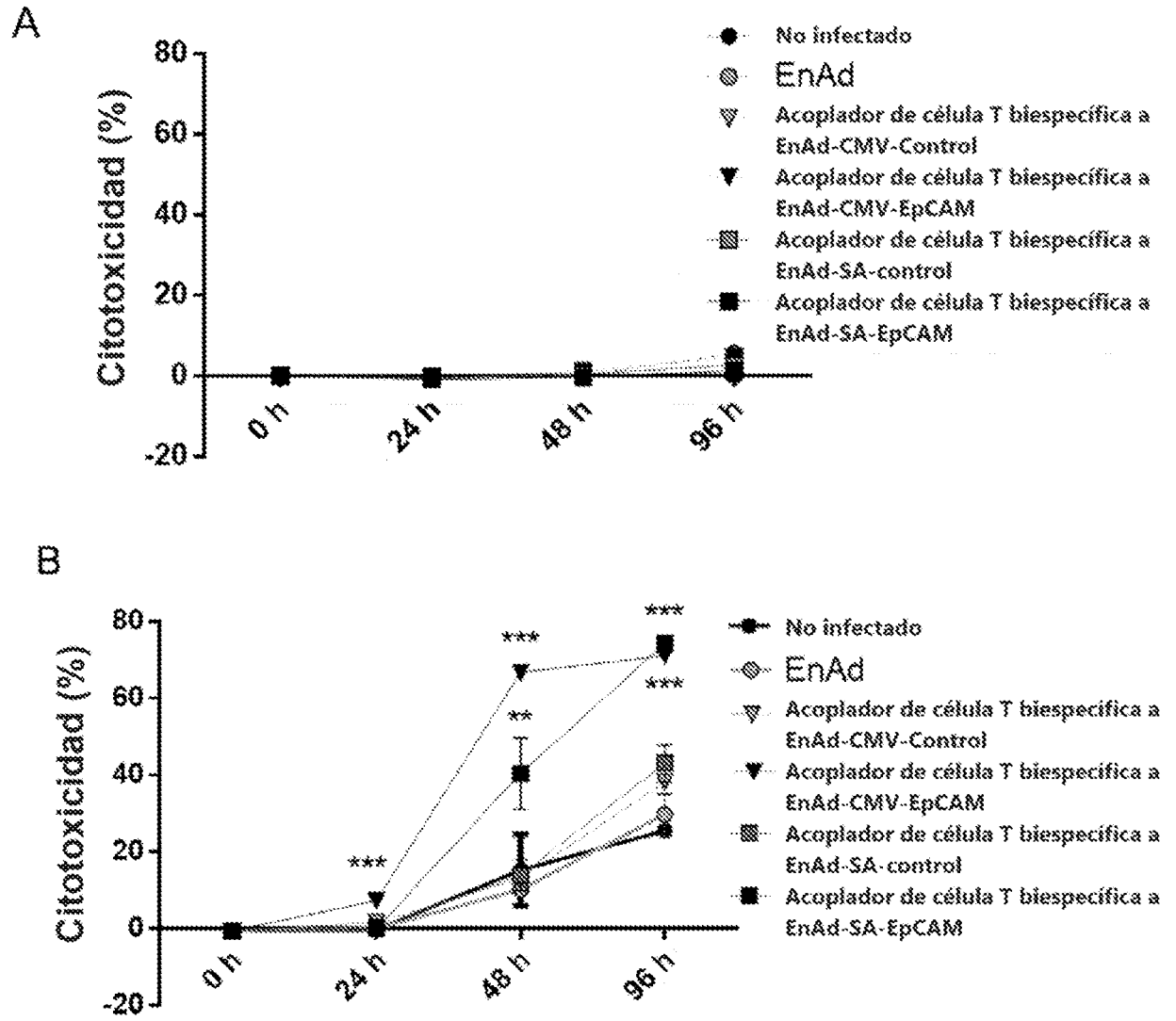
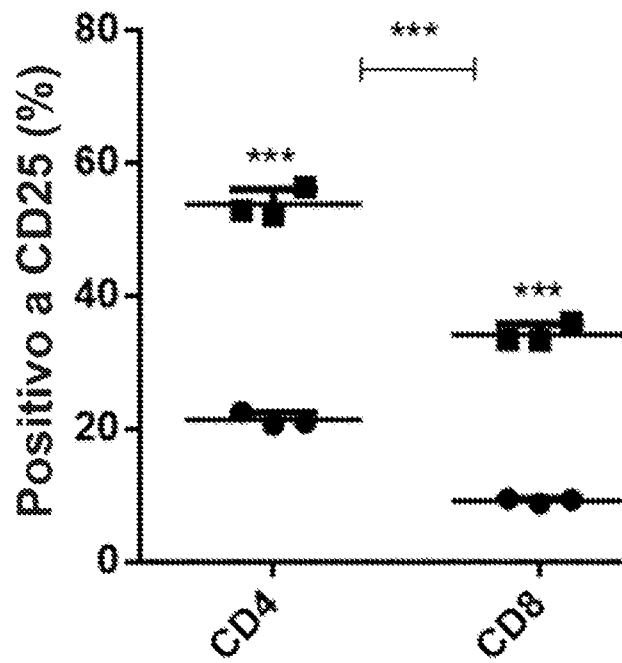
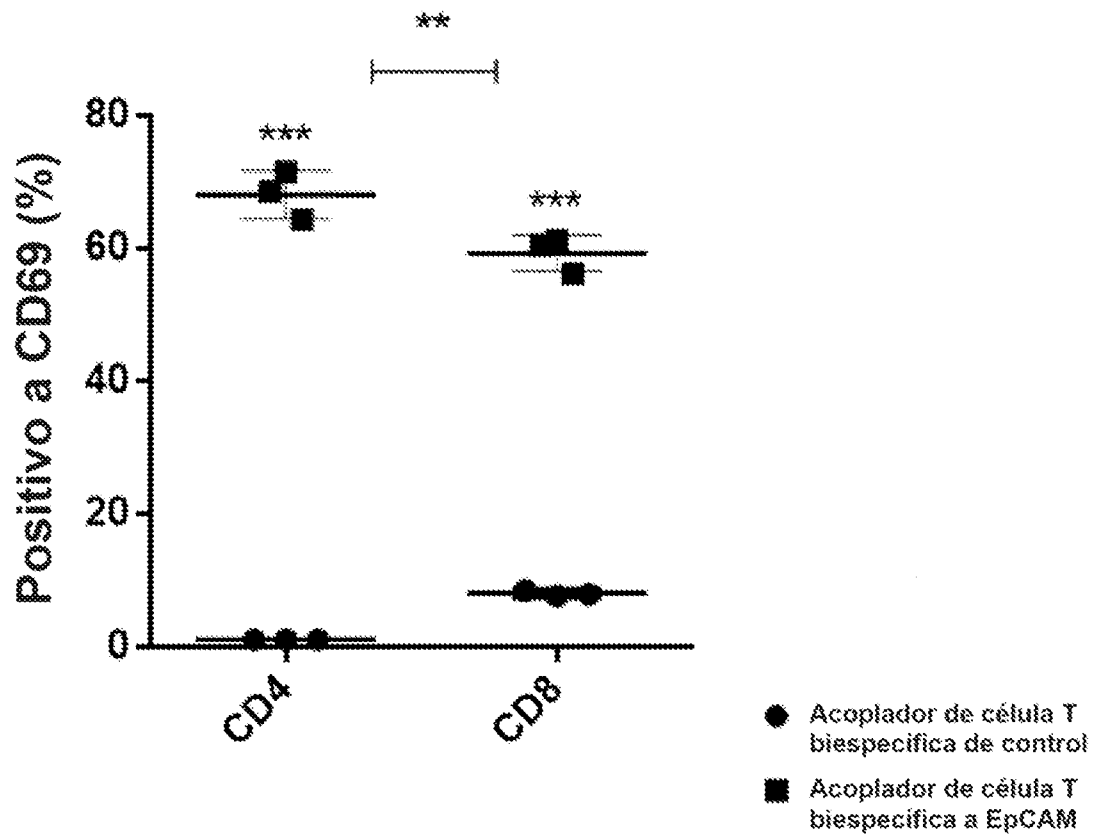


Figura 49A



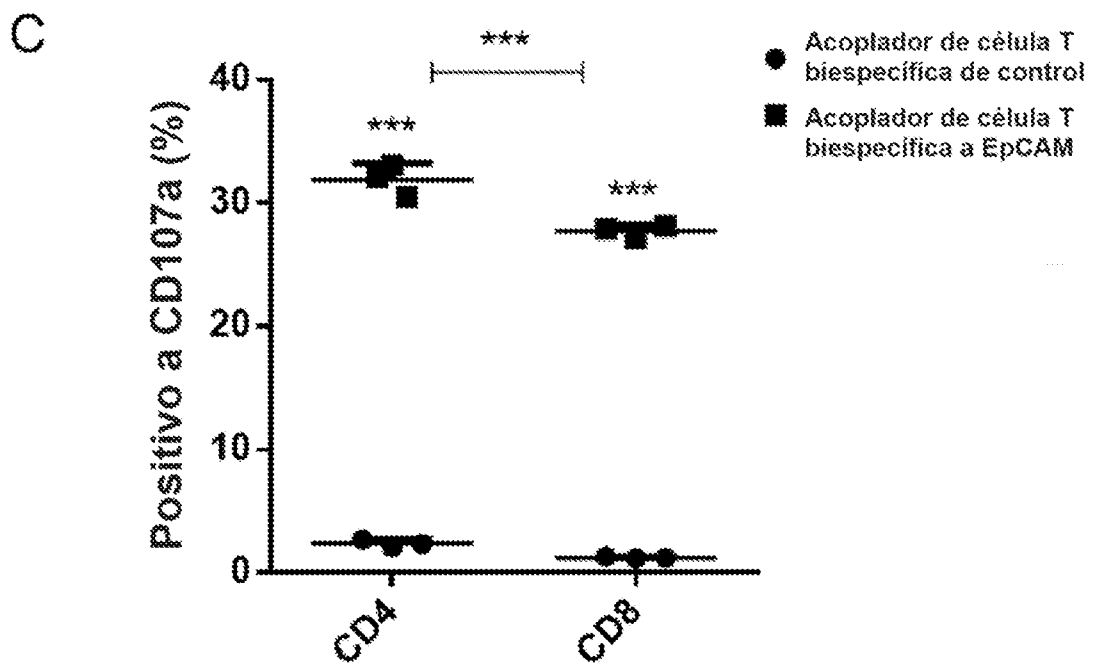
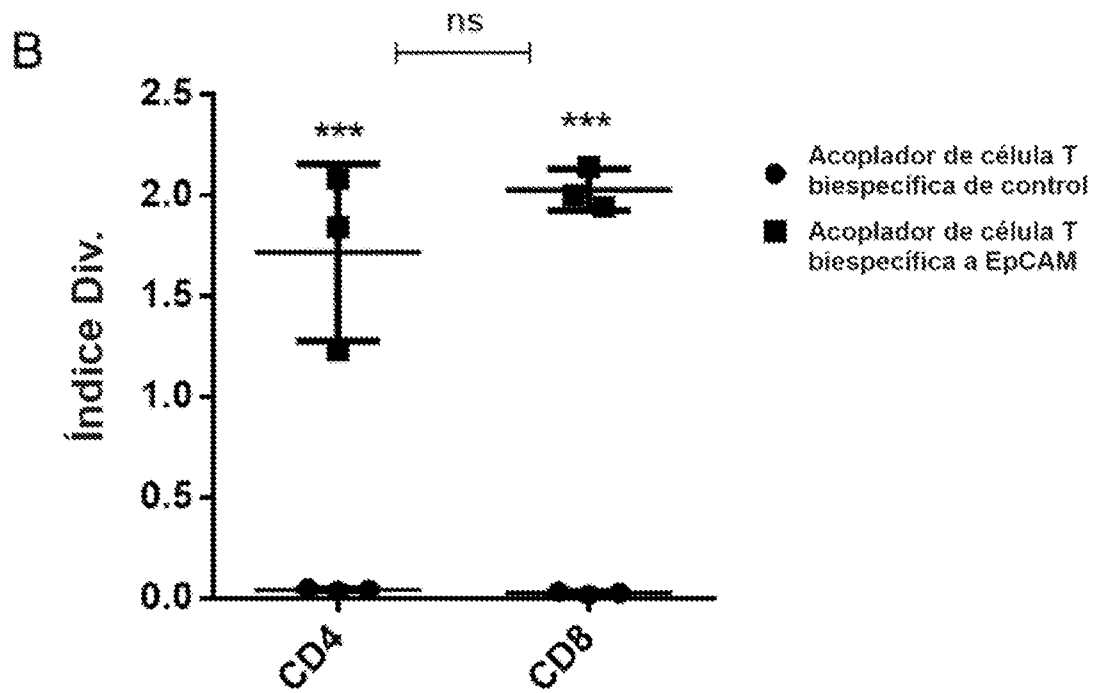


Figura 49 continuación

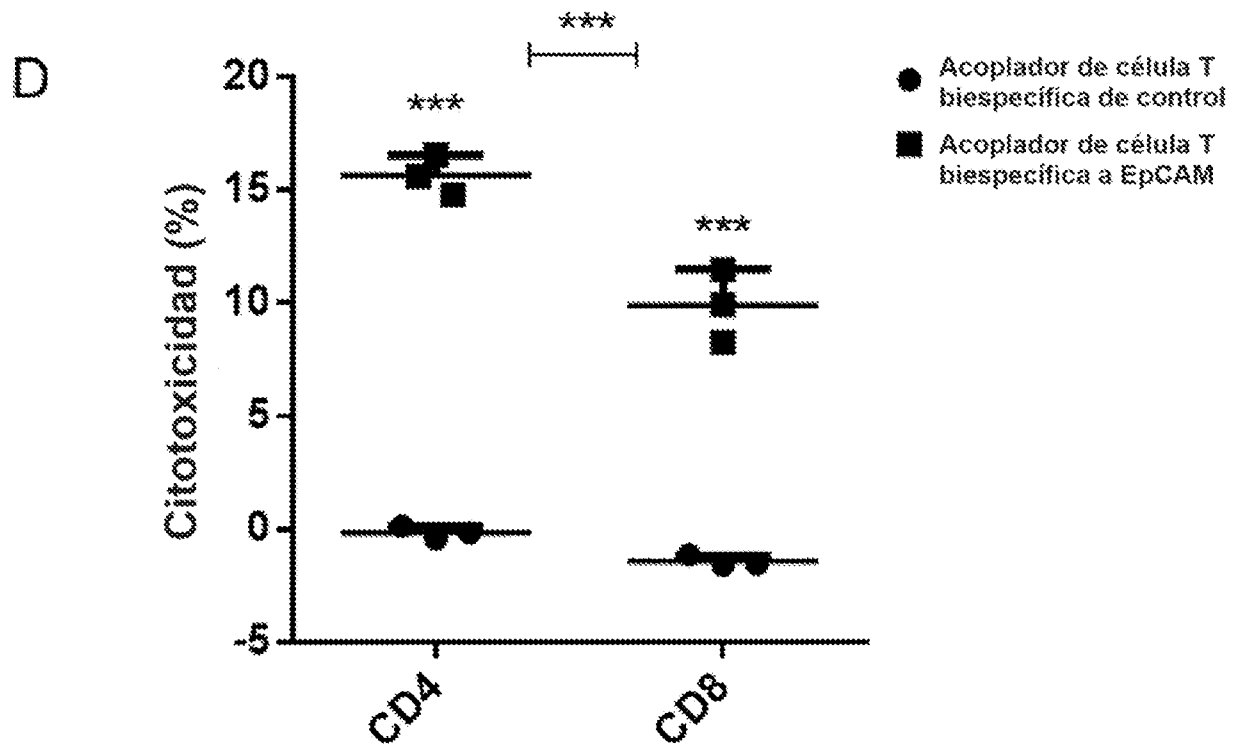


Figura 49 continuación

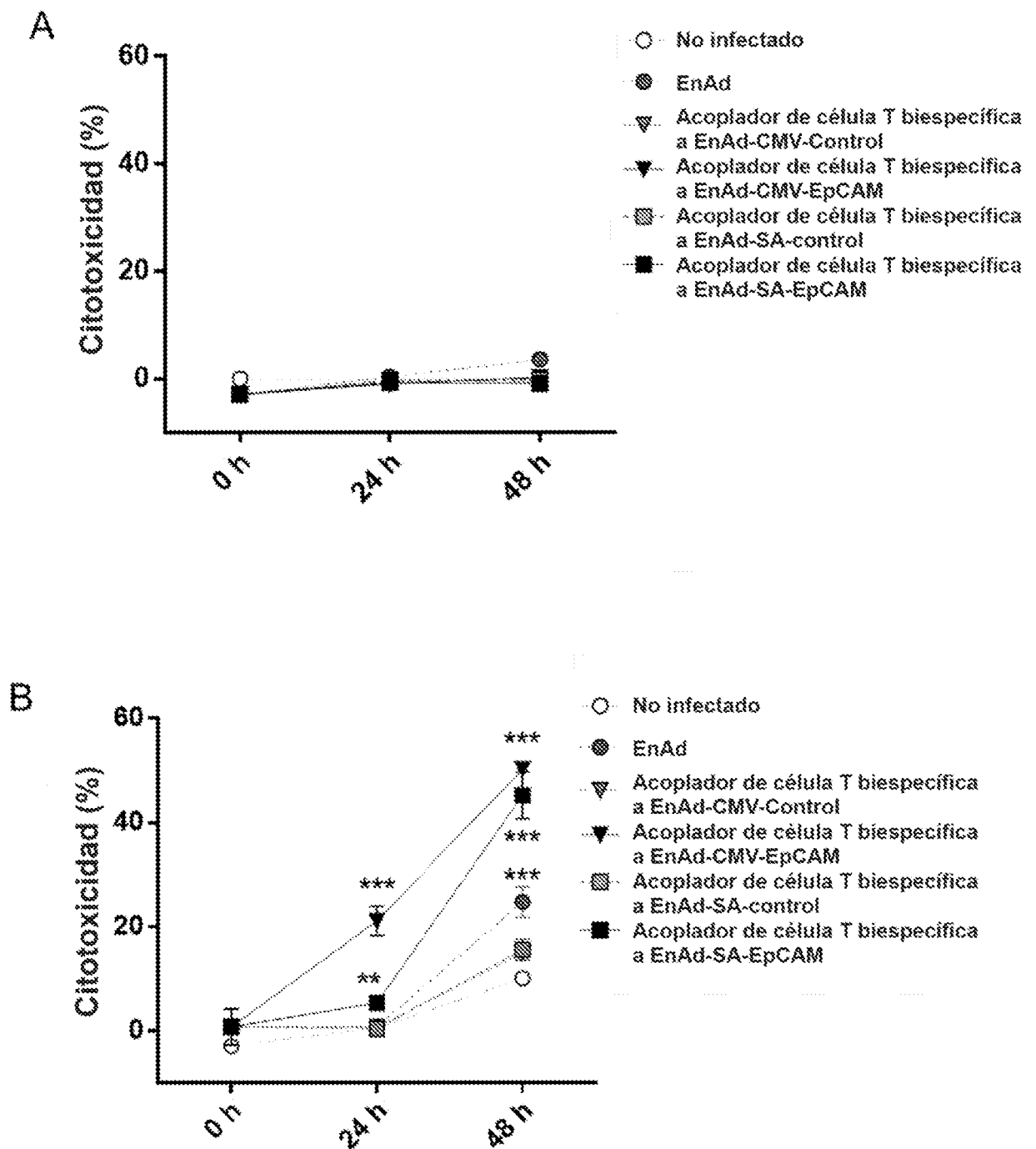


Figura 50

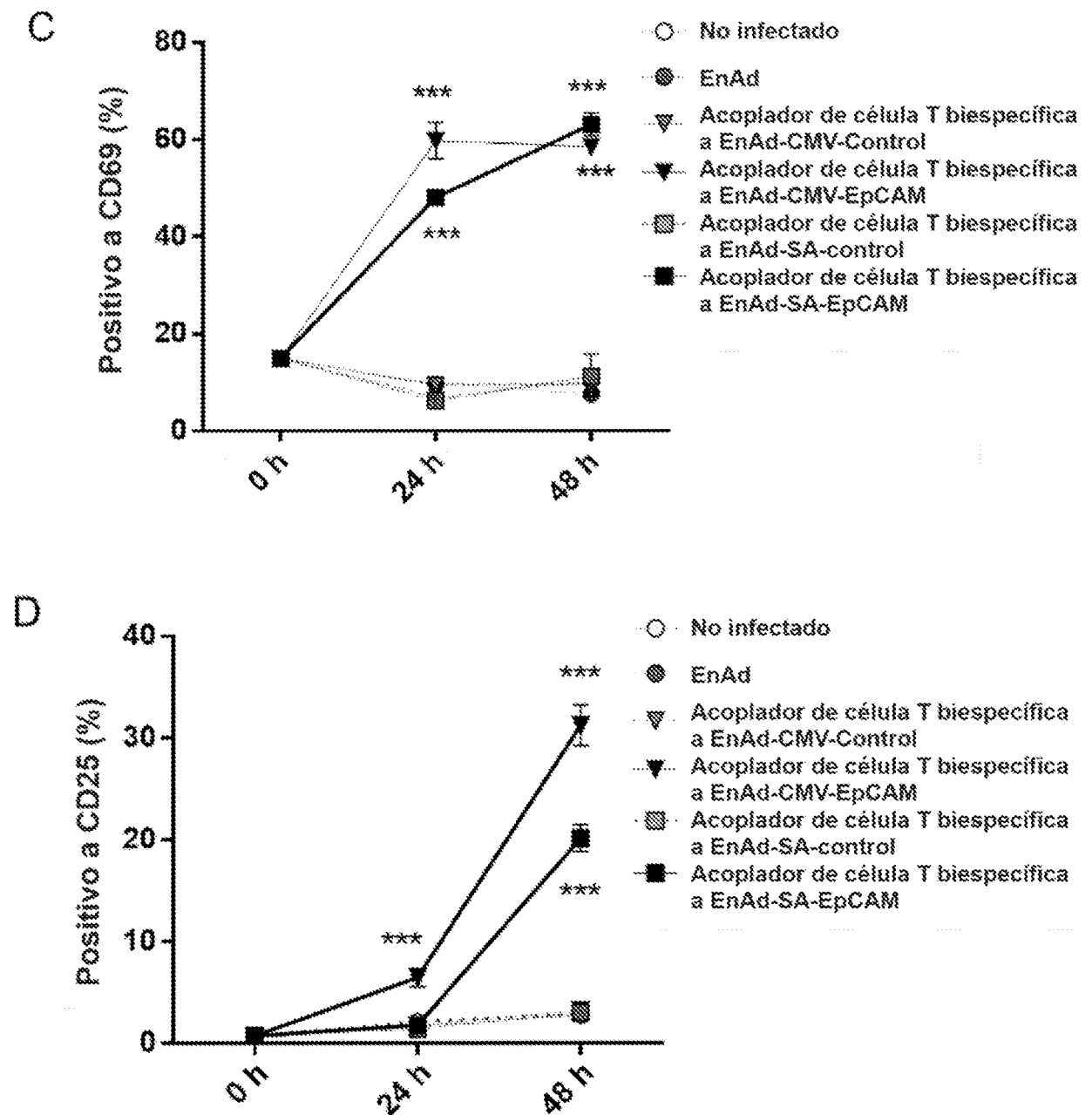
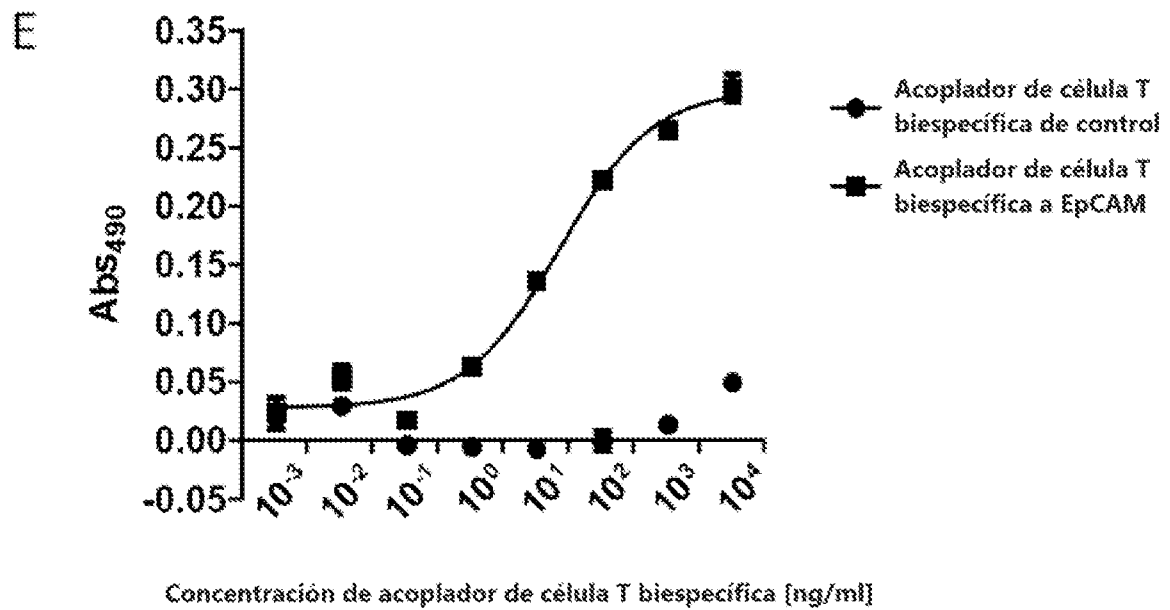


Figura 50 continuación



EC50 7.444

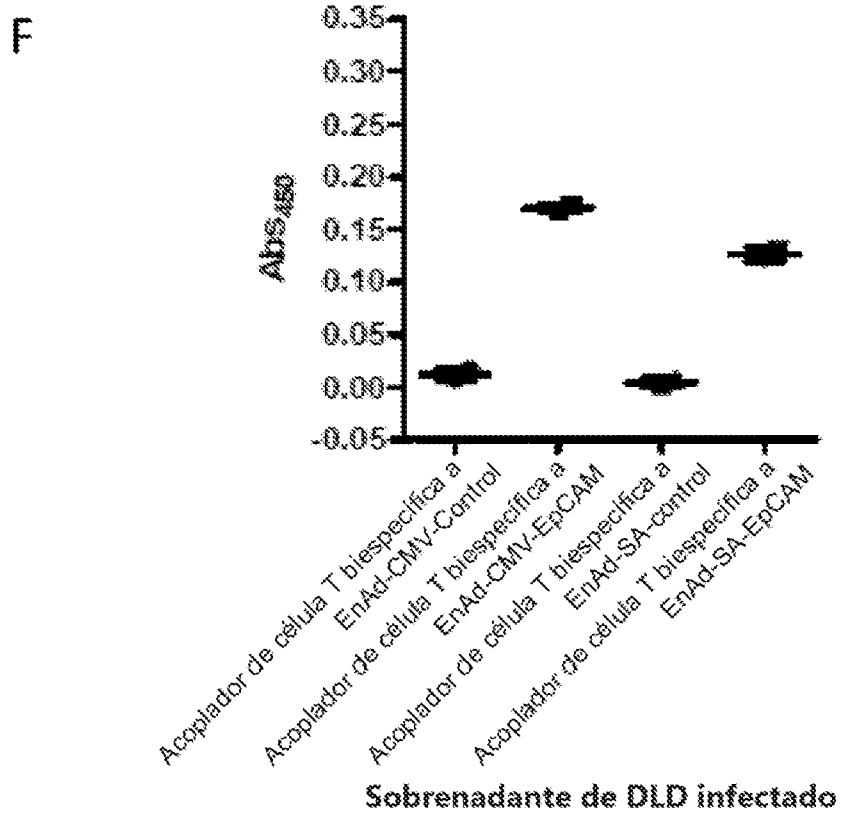


Figura 50 continuación

G

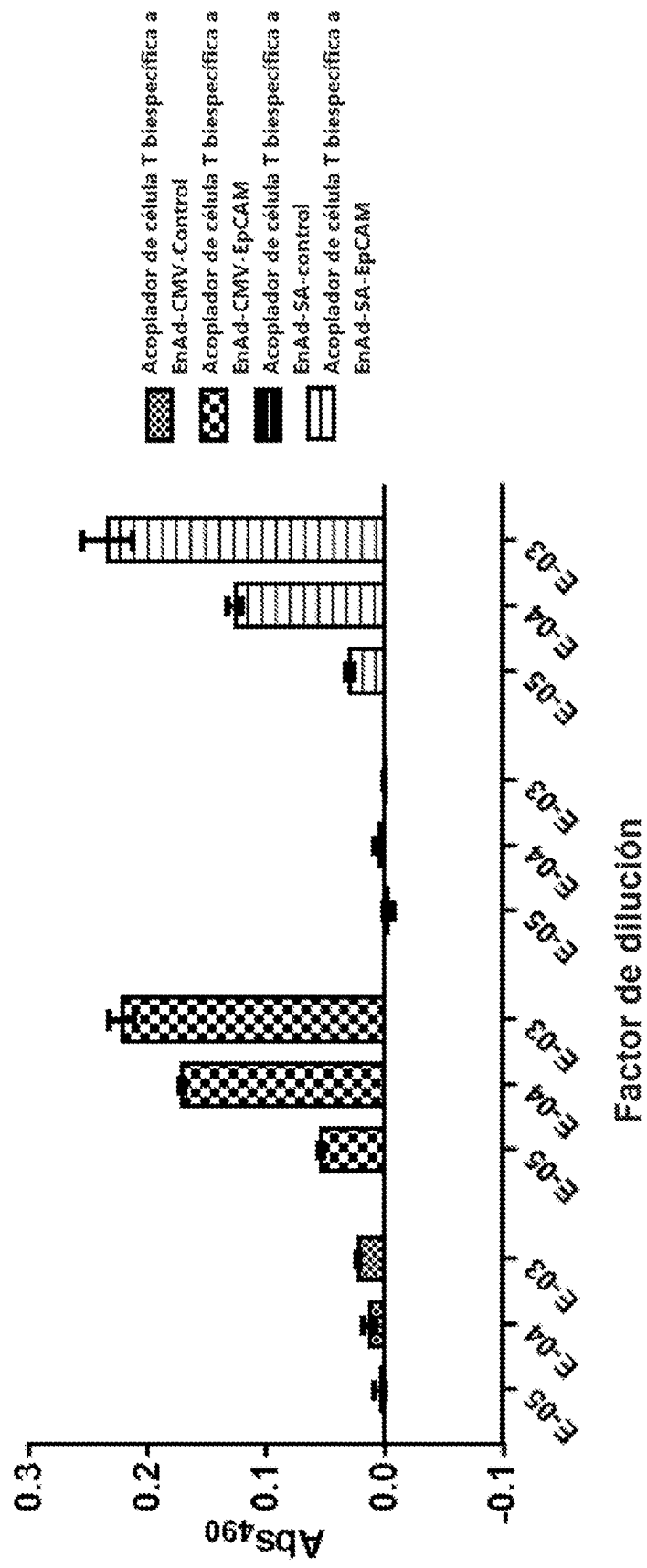
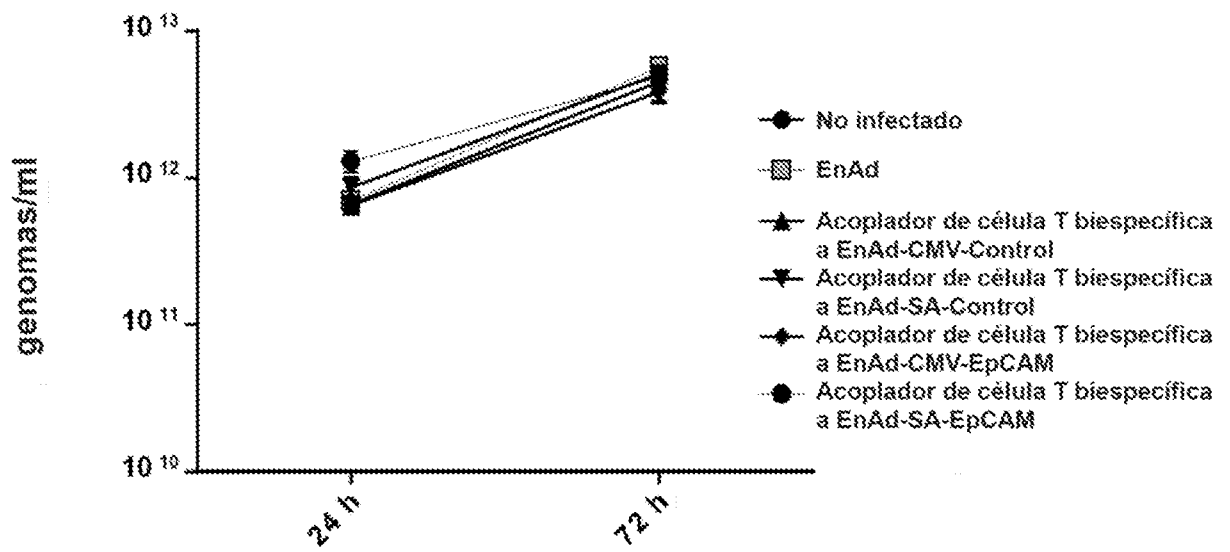


Figura 50 continuación

A



B

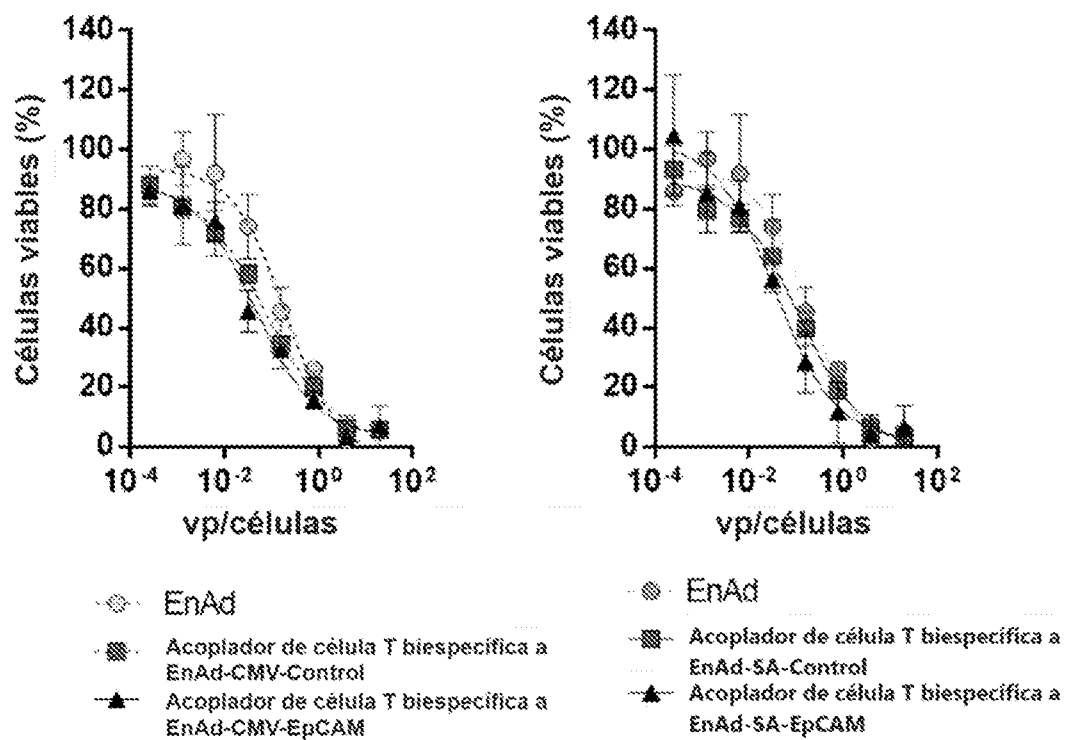


Figura 51

C

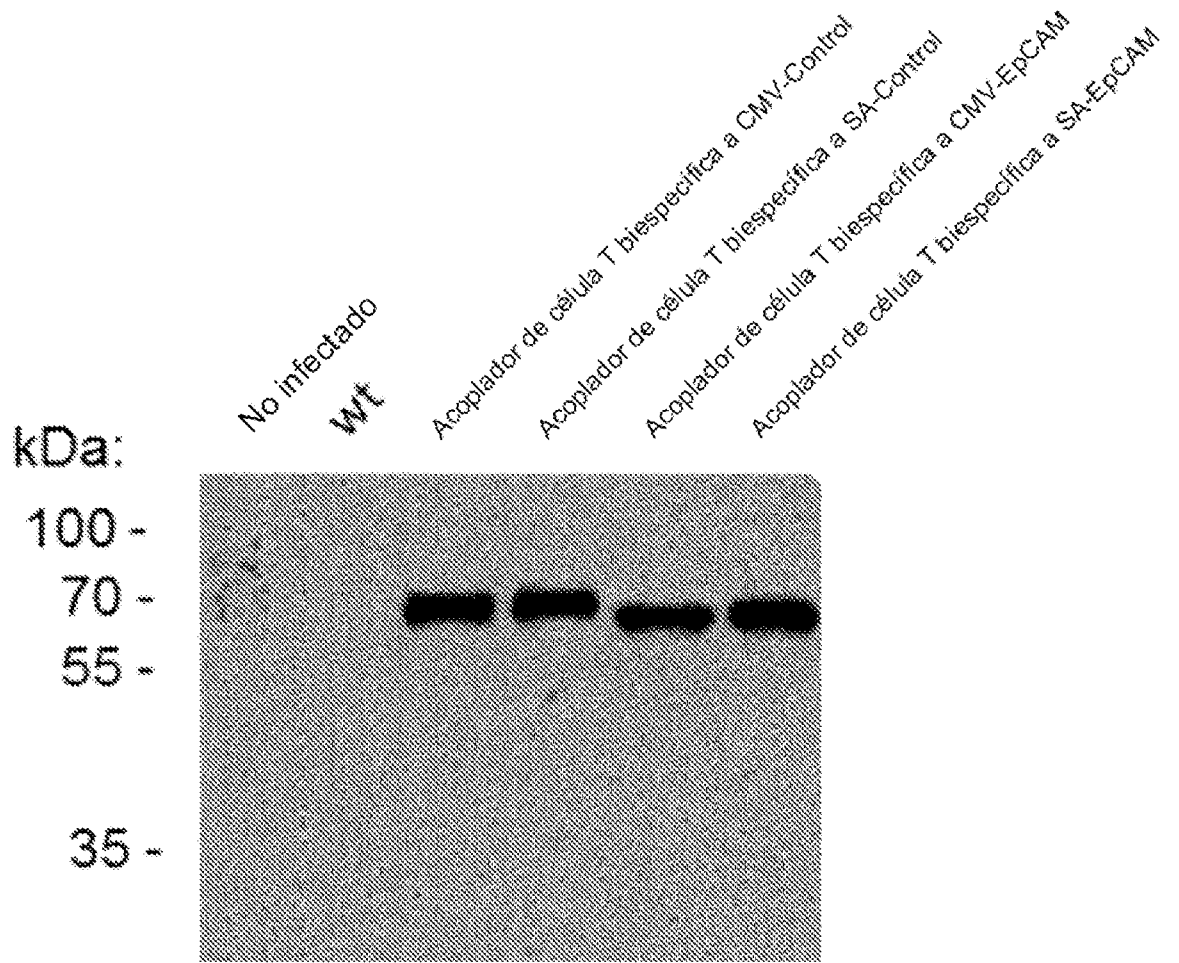


Figura 51 continuación

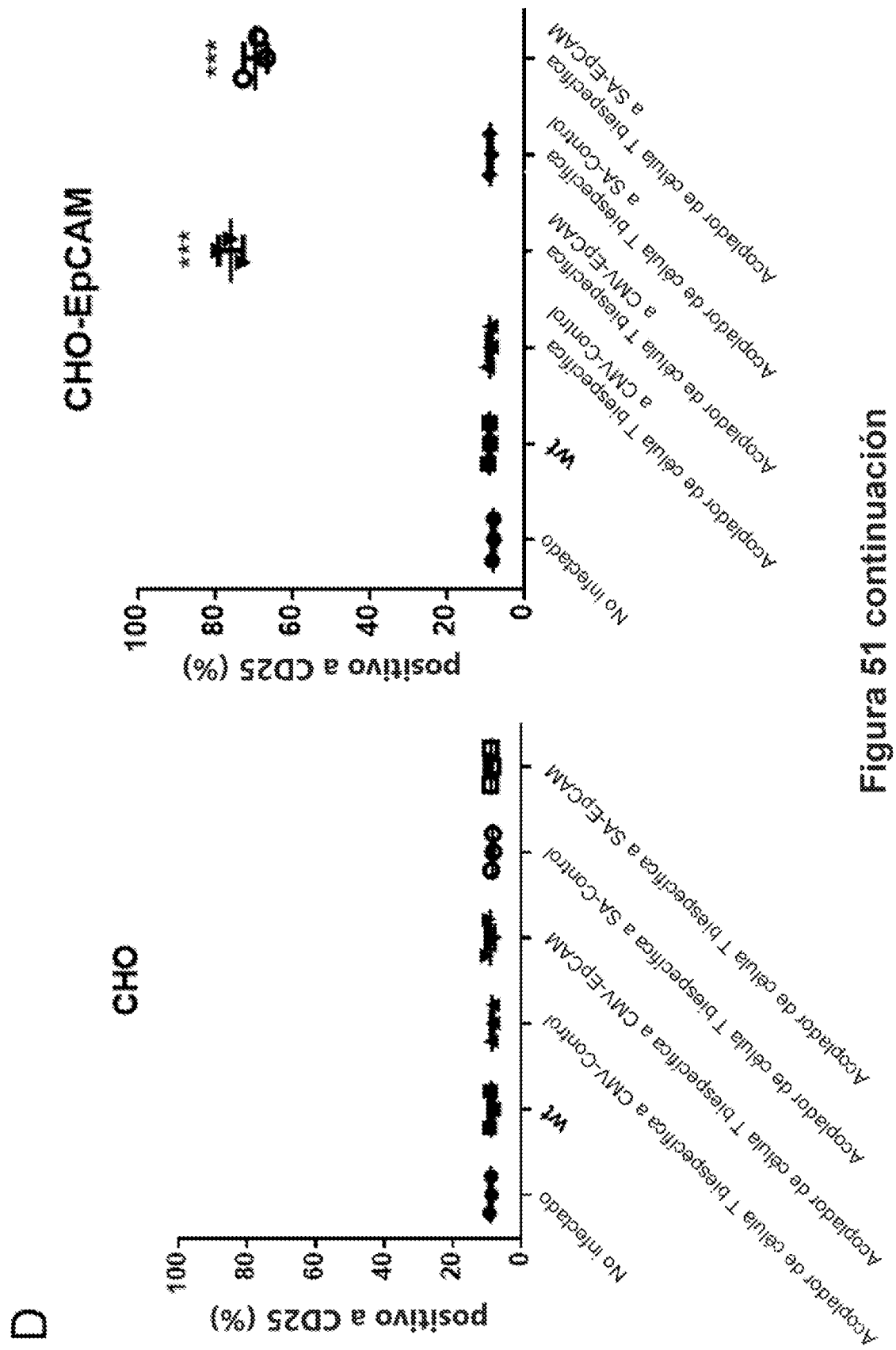


Figura 51 continuación

E

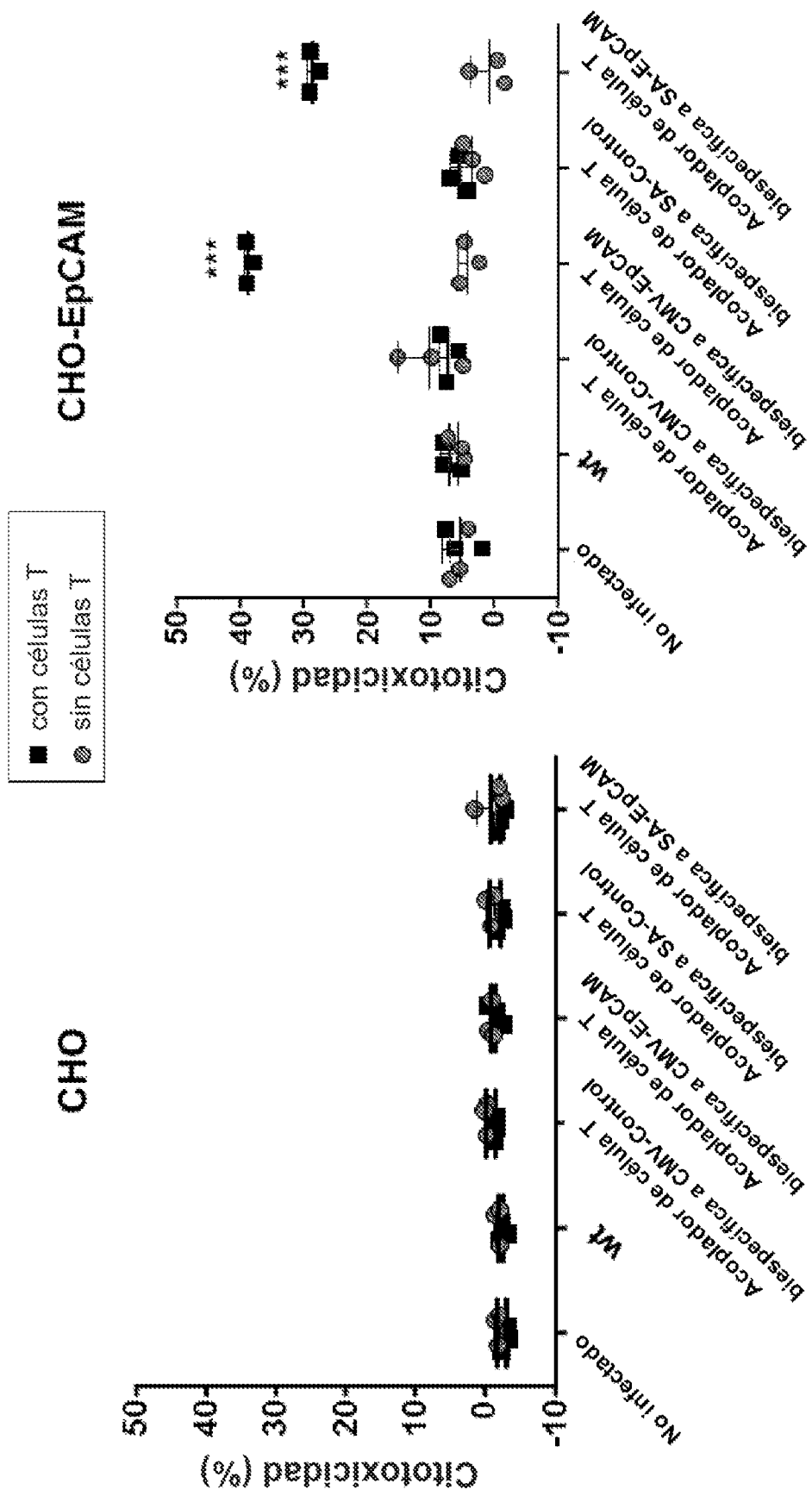
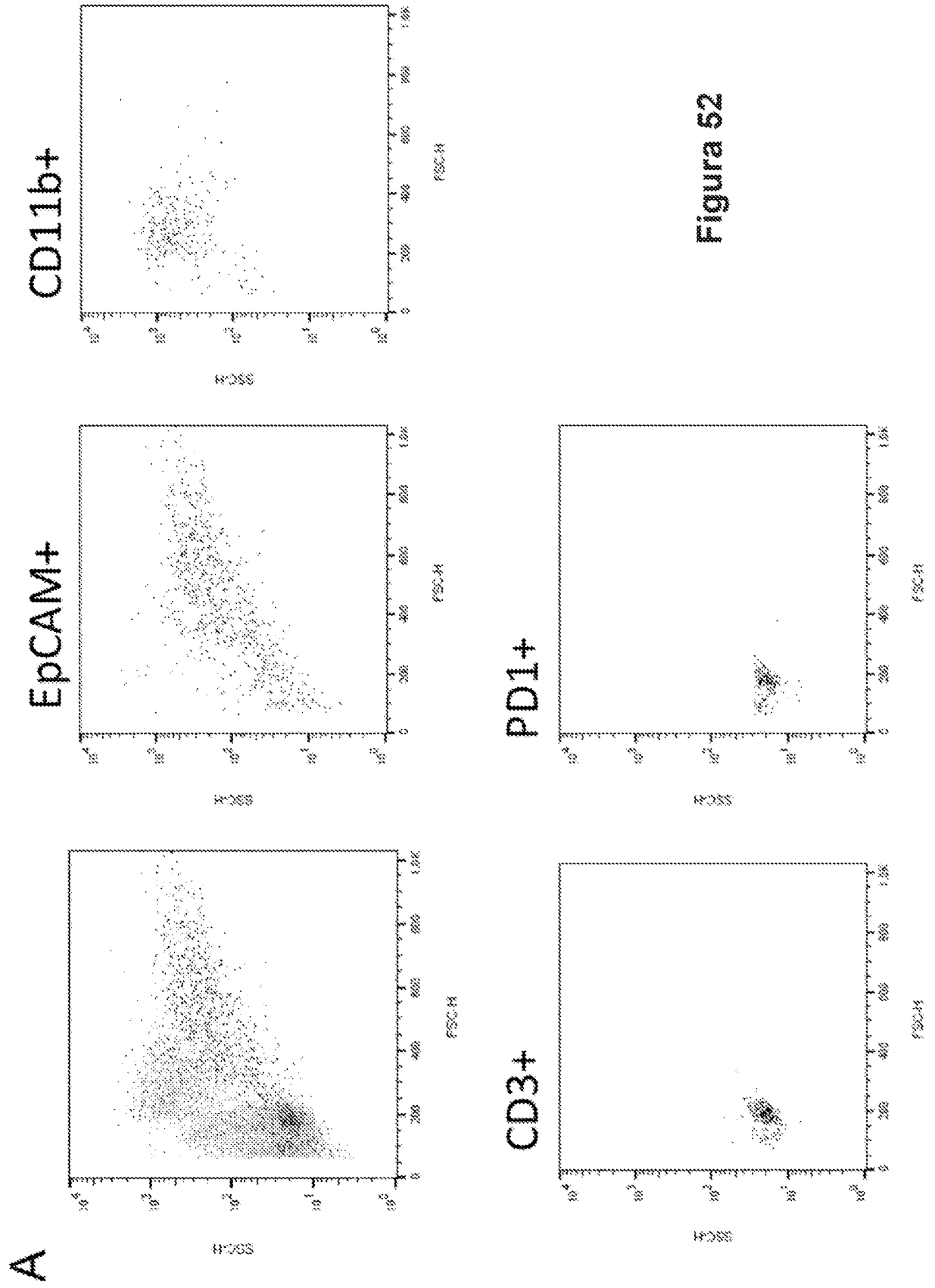


Figura 51 continuación

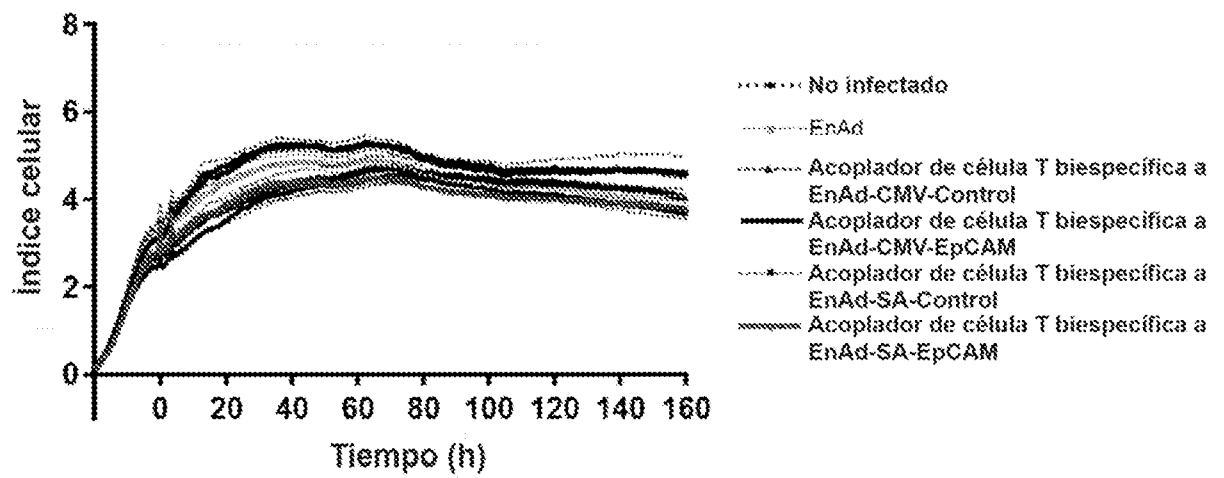


B

Subconjunto	Recuento
EpCAM	749
CD3	289
PD1	206
CD11b	277
Total	10000

Figura 52

A



B

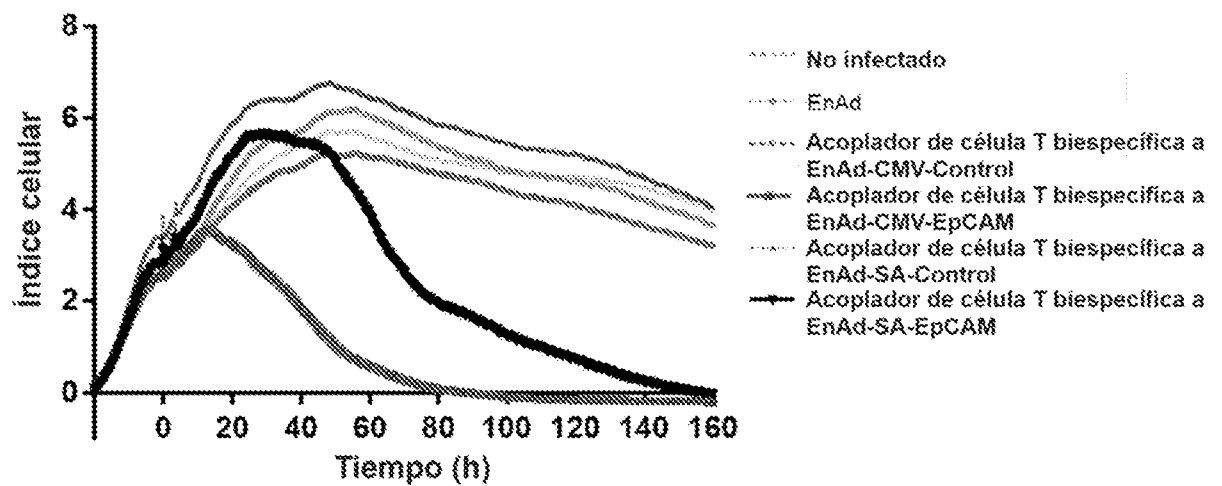


Figura 53

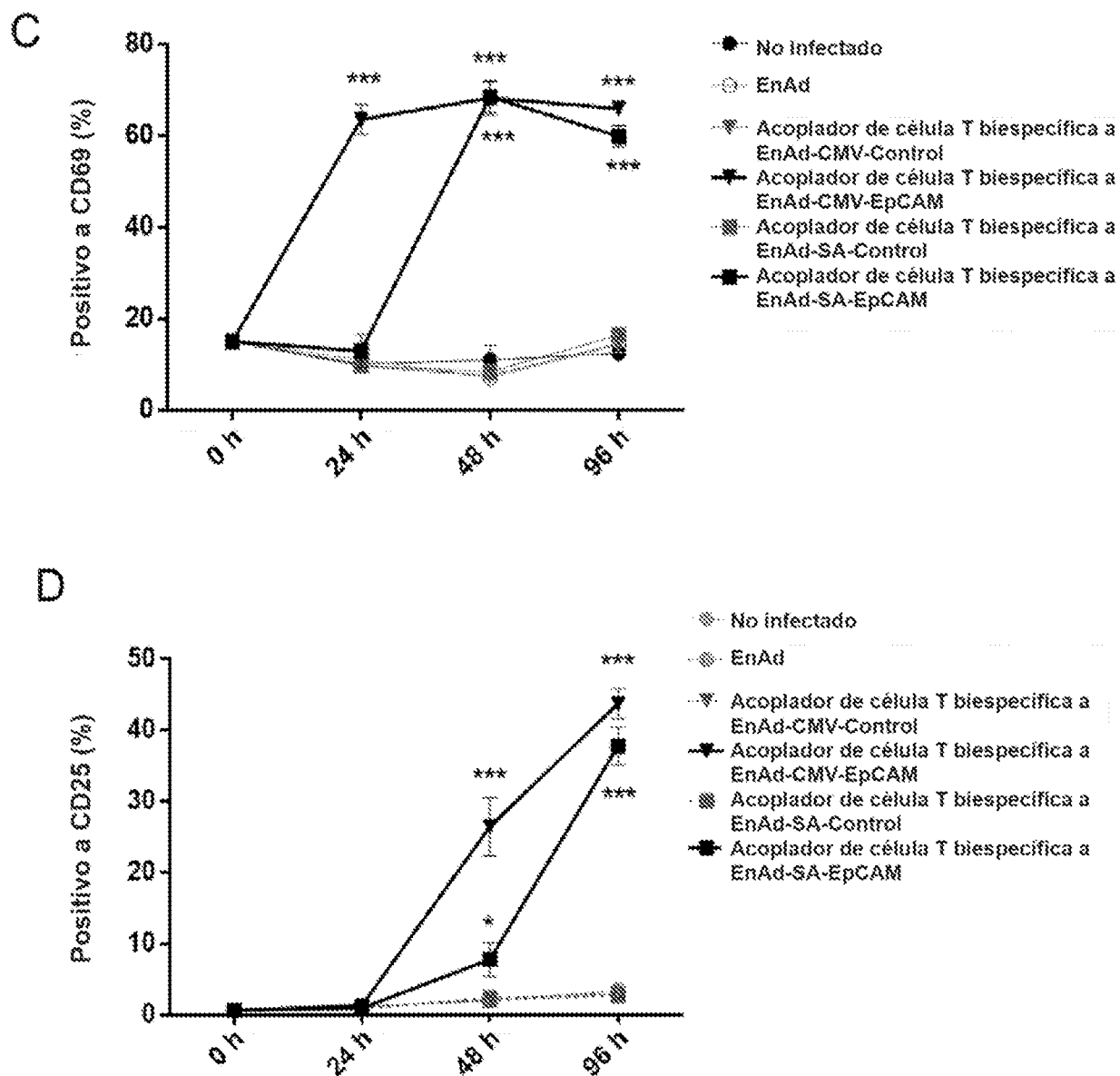


Figura 53 continuación

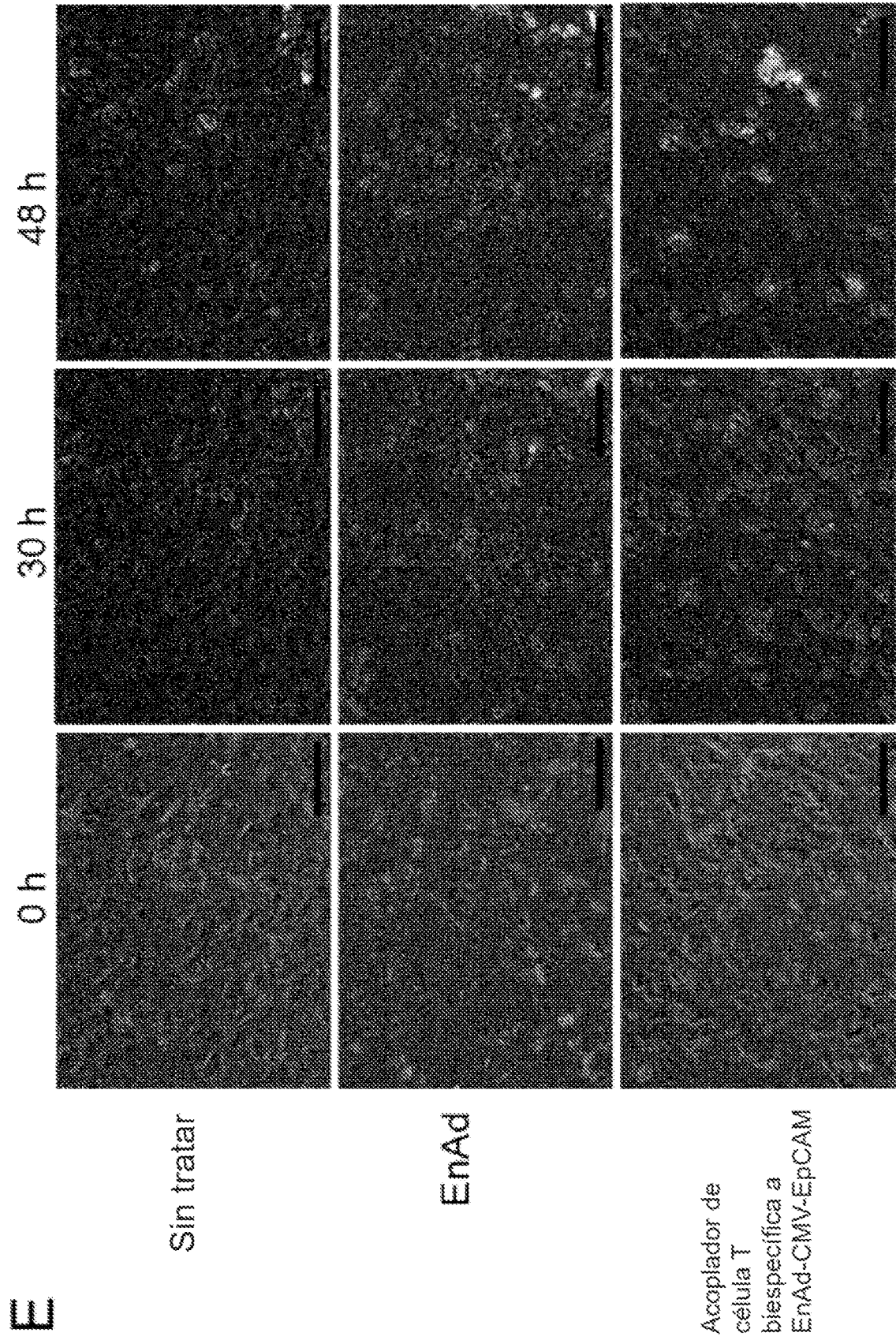


Figura 53 continuación

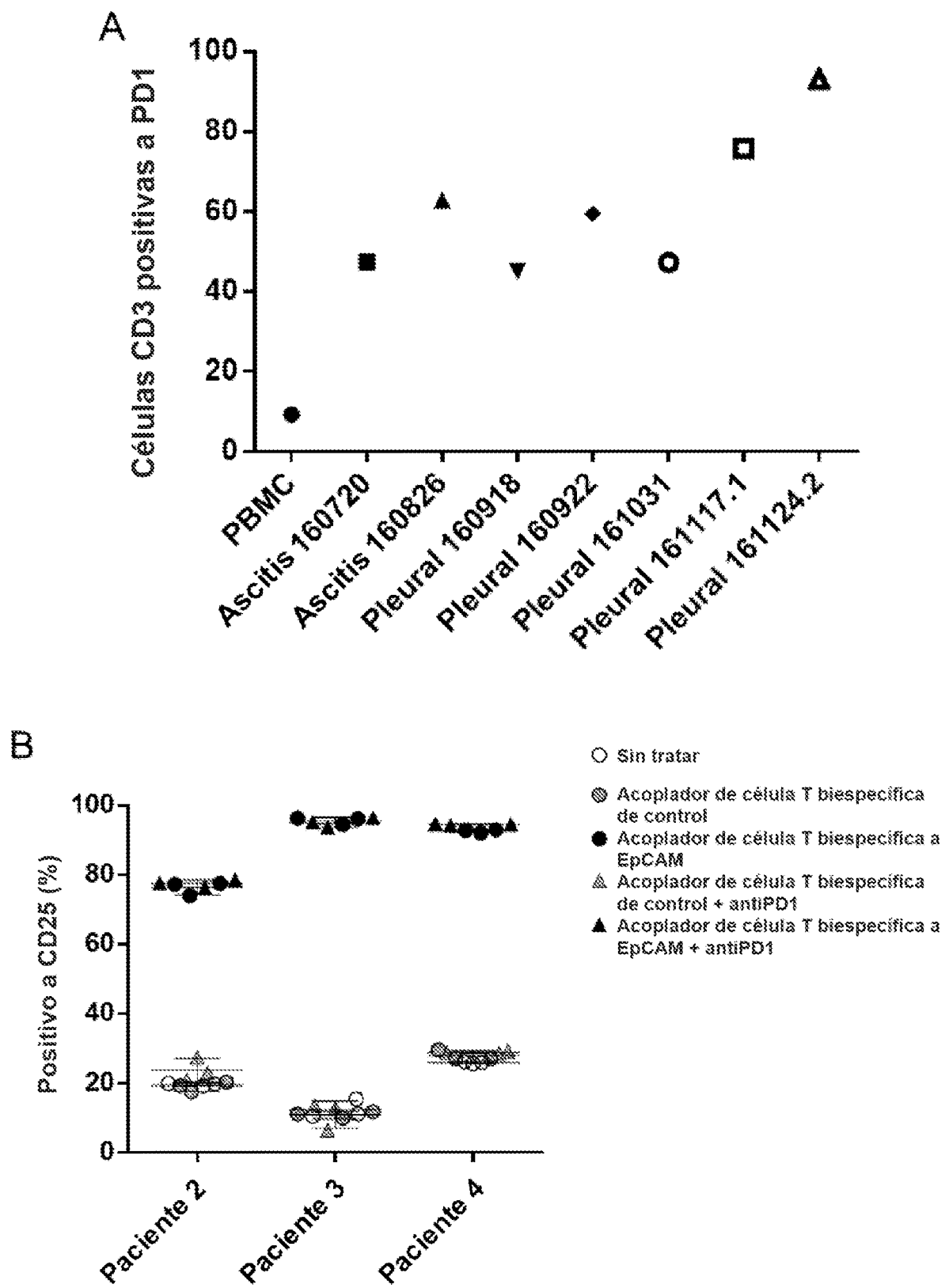


Figura 54

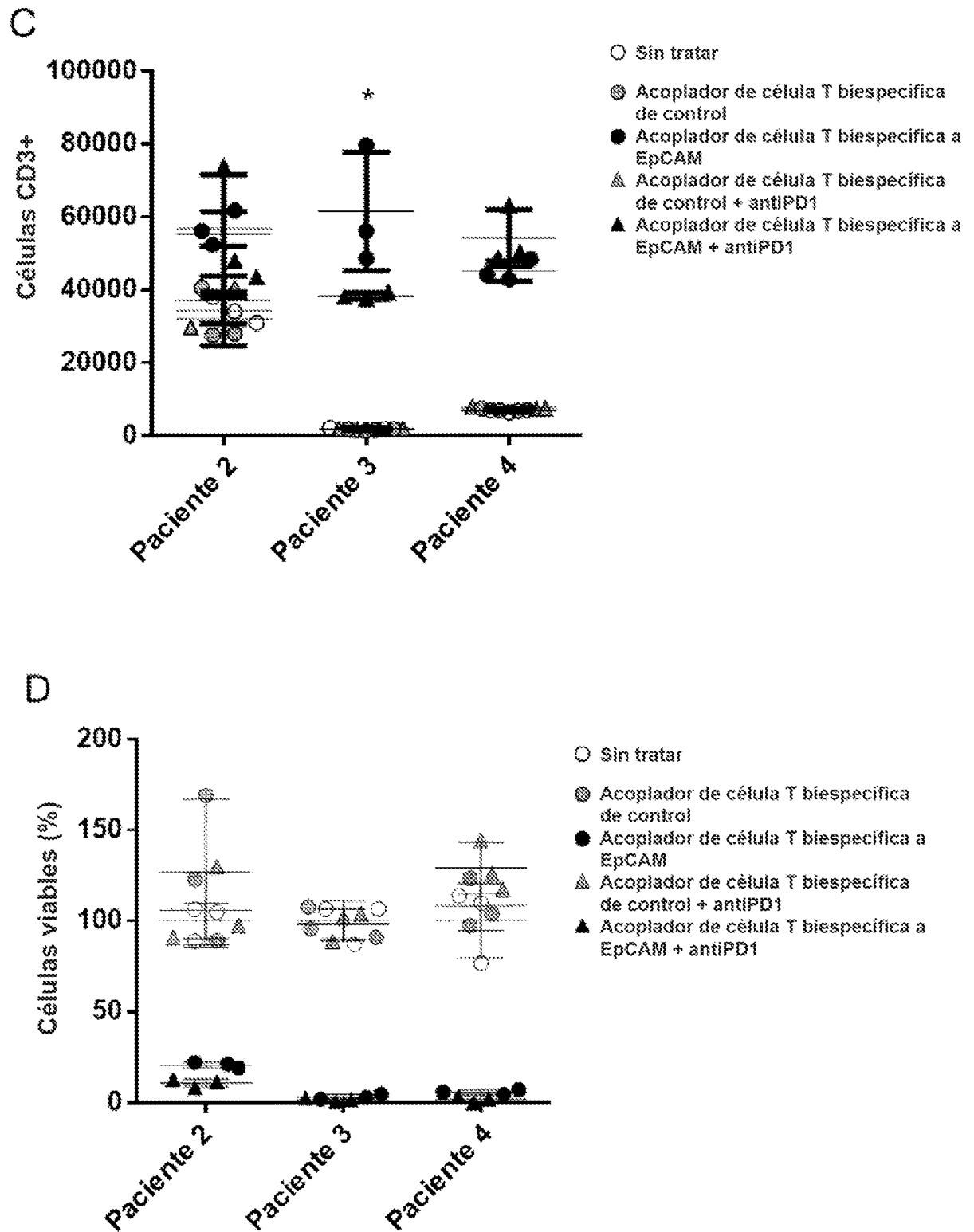


Figura 54 continuación

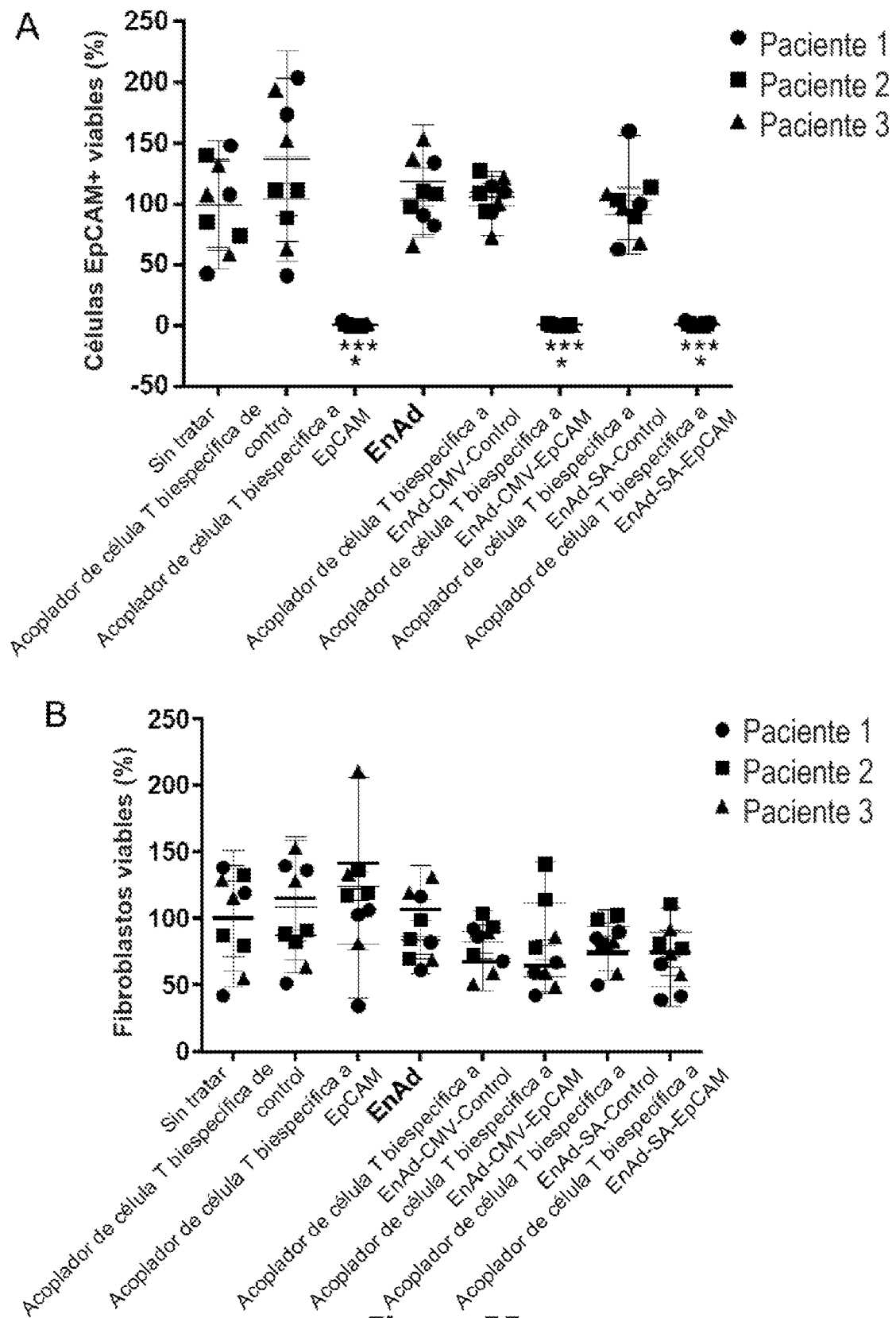


Figura 55

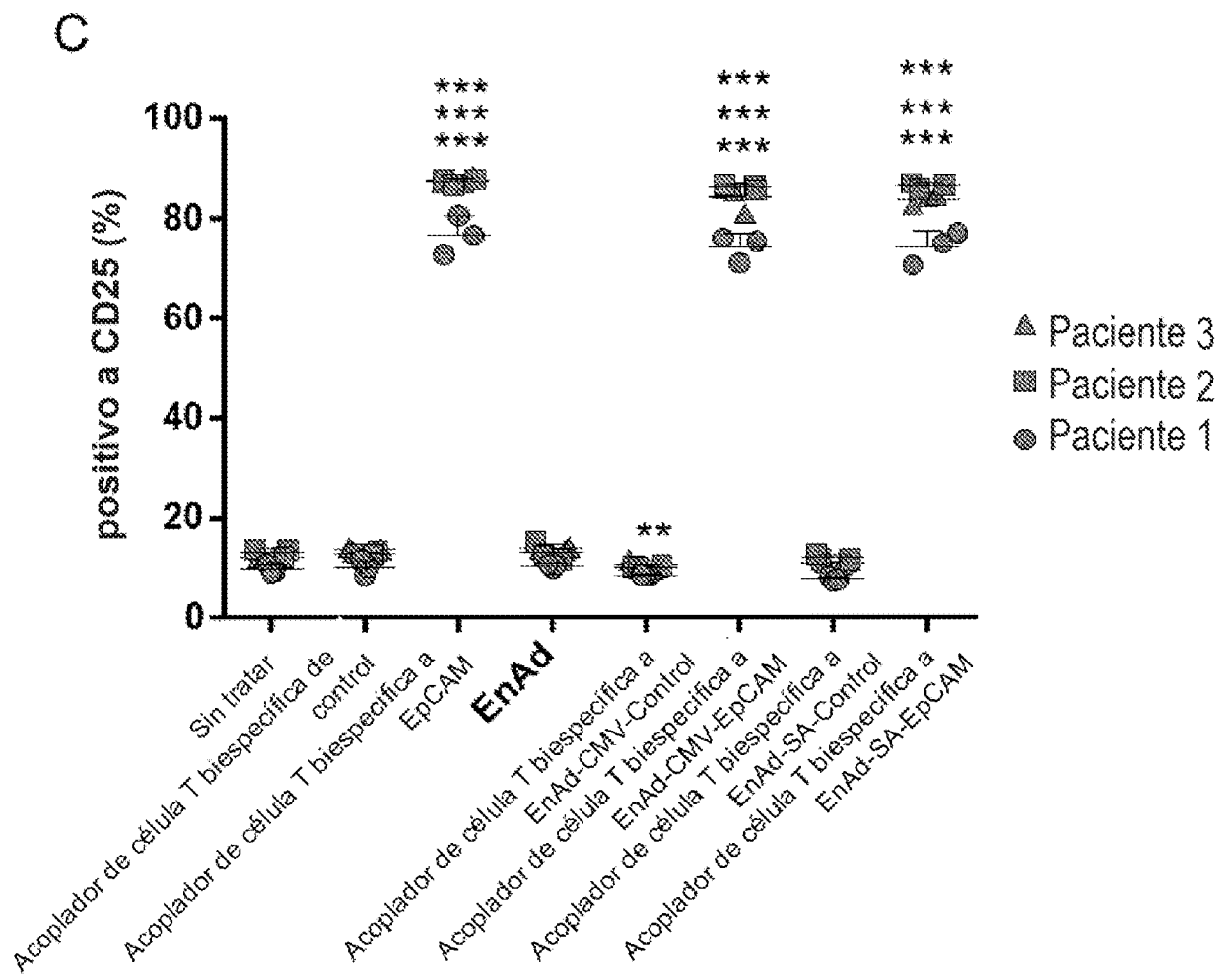


Figura 55 continuación

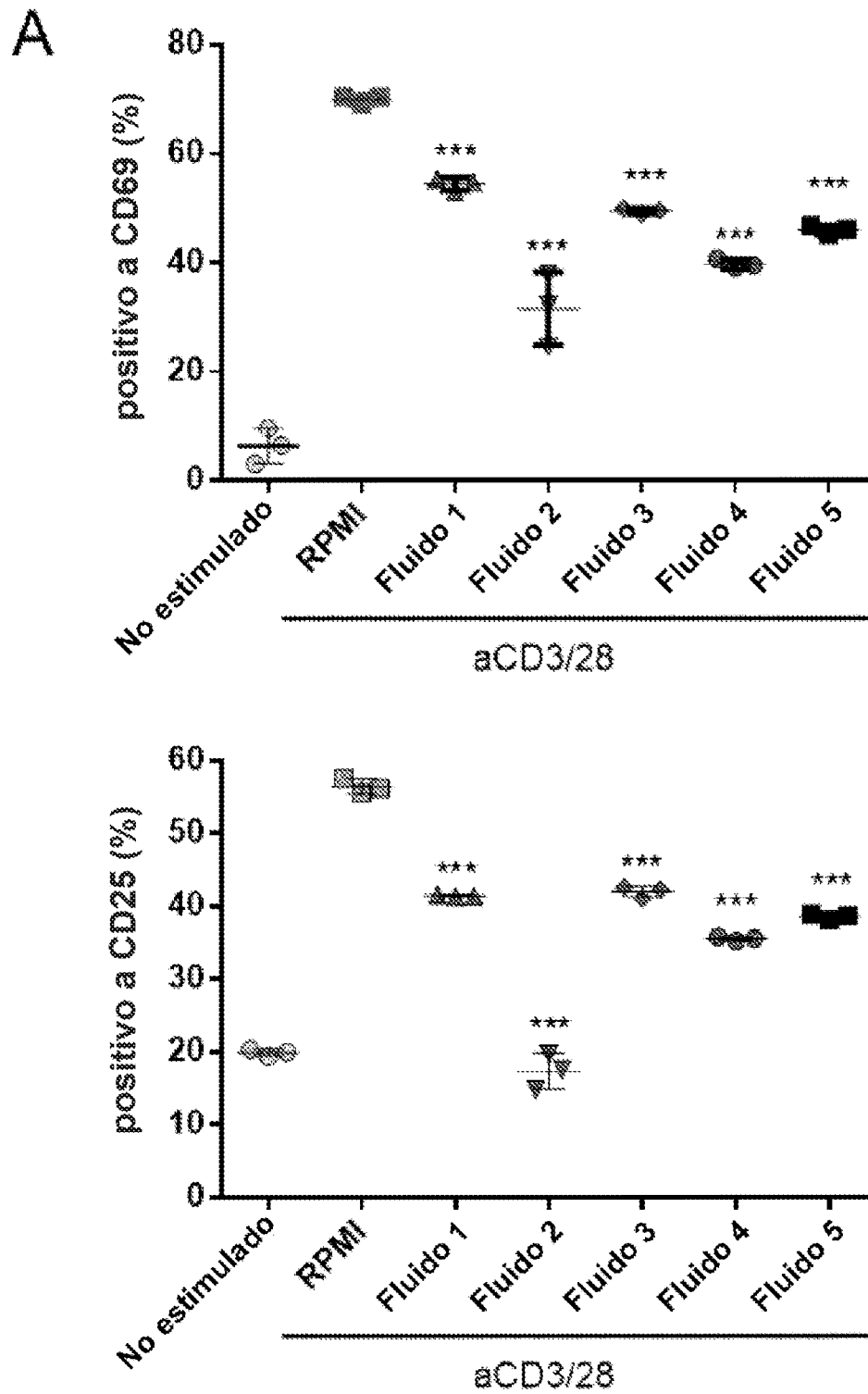


Figura 56

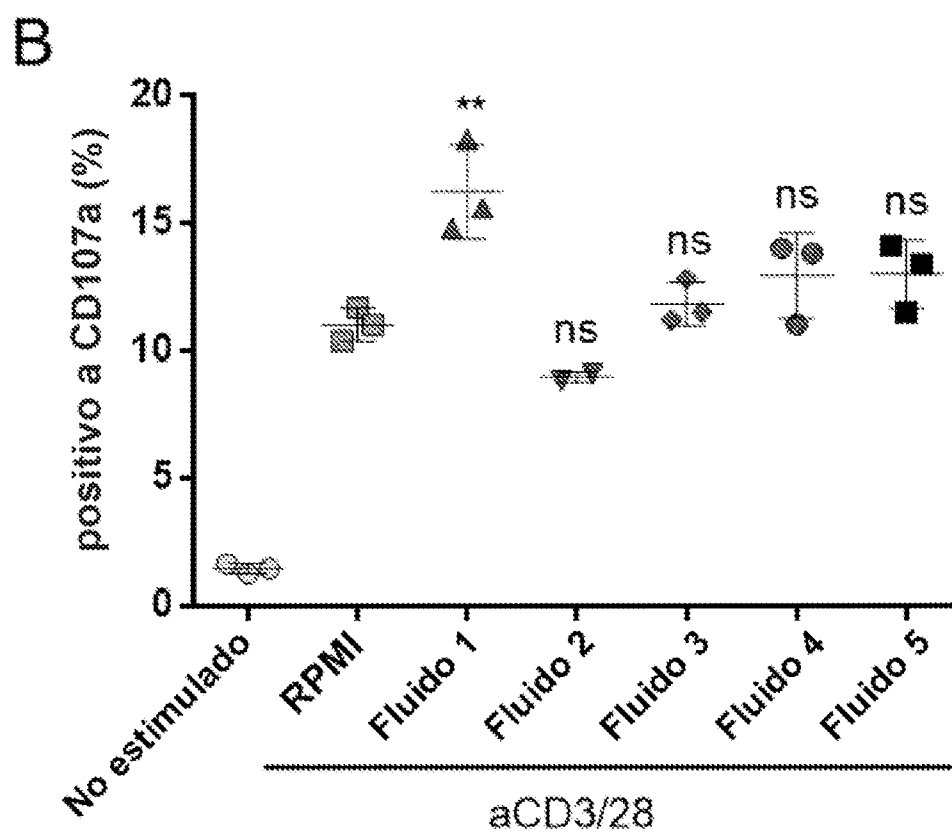


Figura 56 continuación

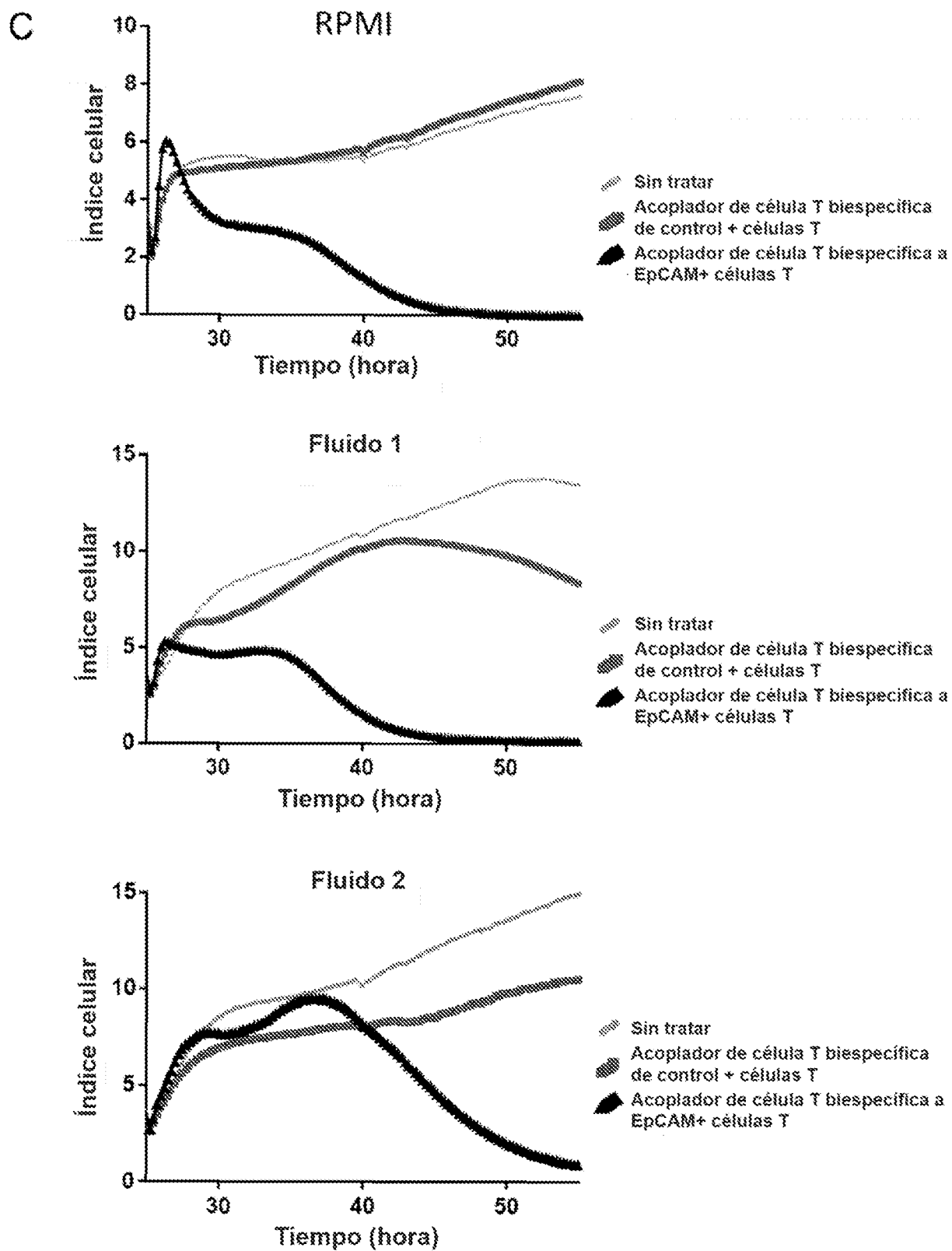


Figura 56 continuación

D

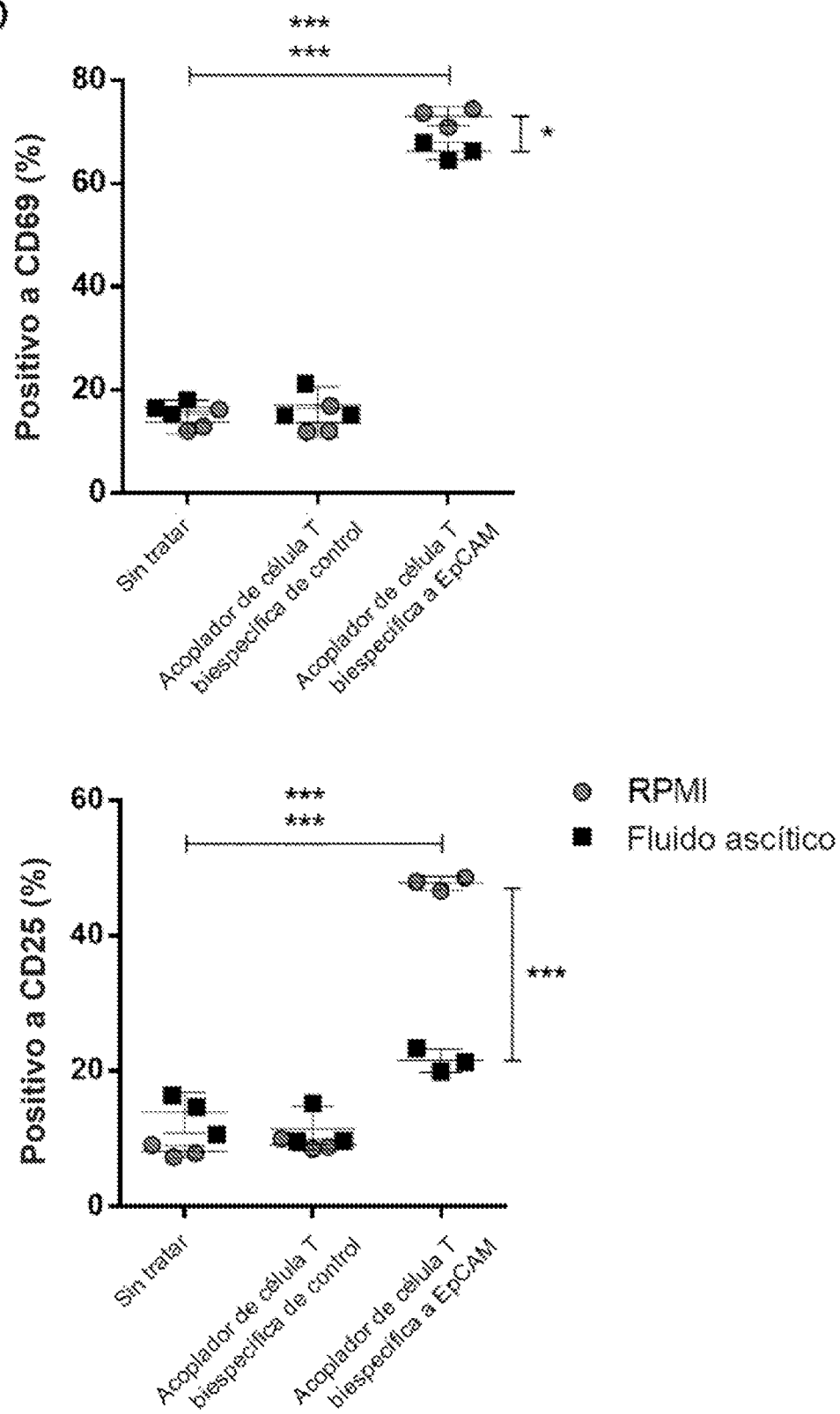


Figura 56 continuación

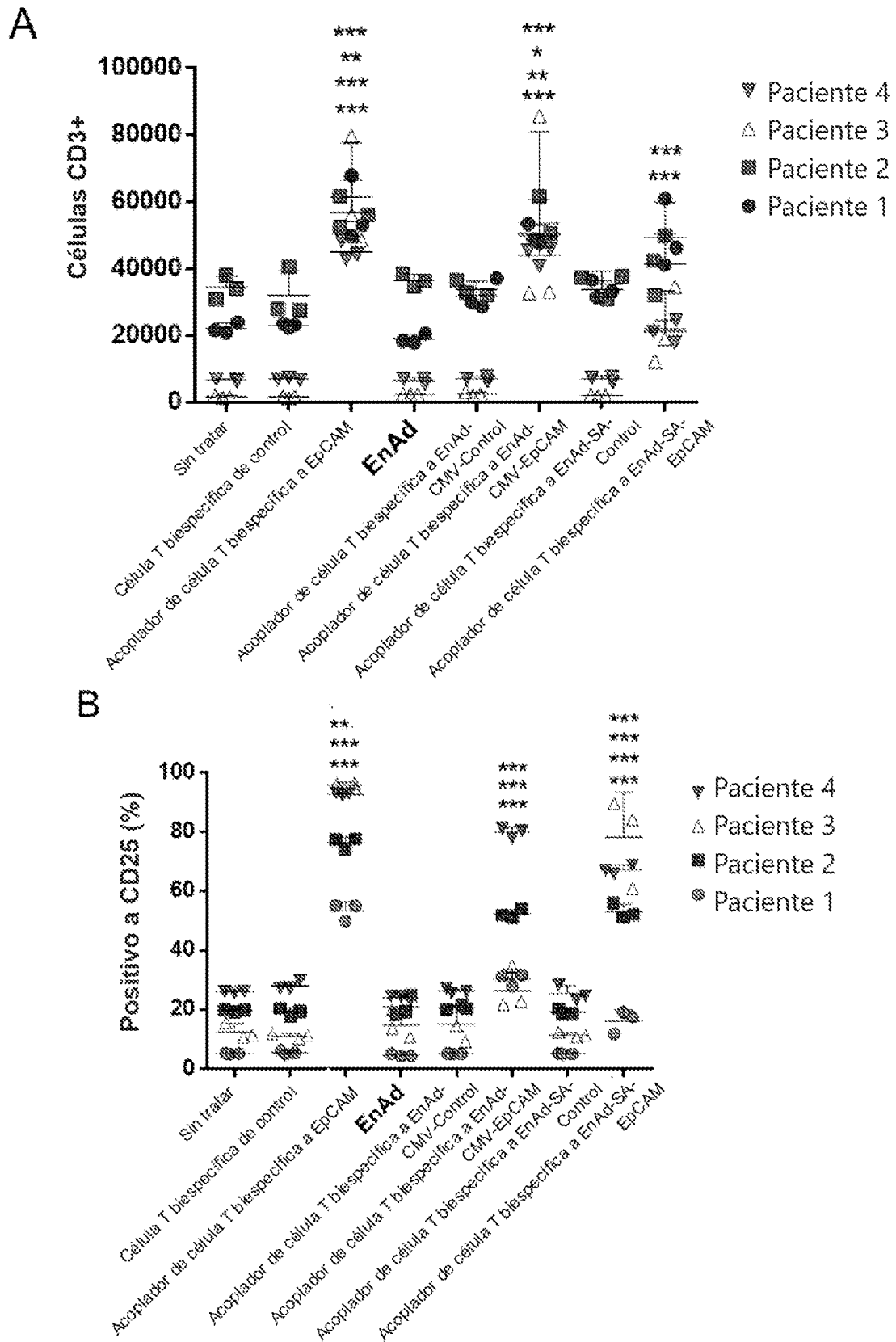


Figura 57

C

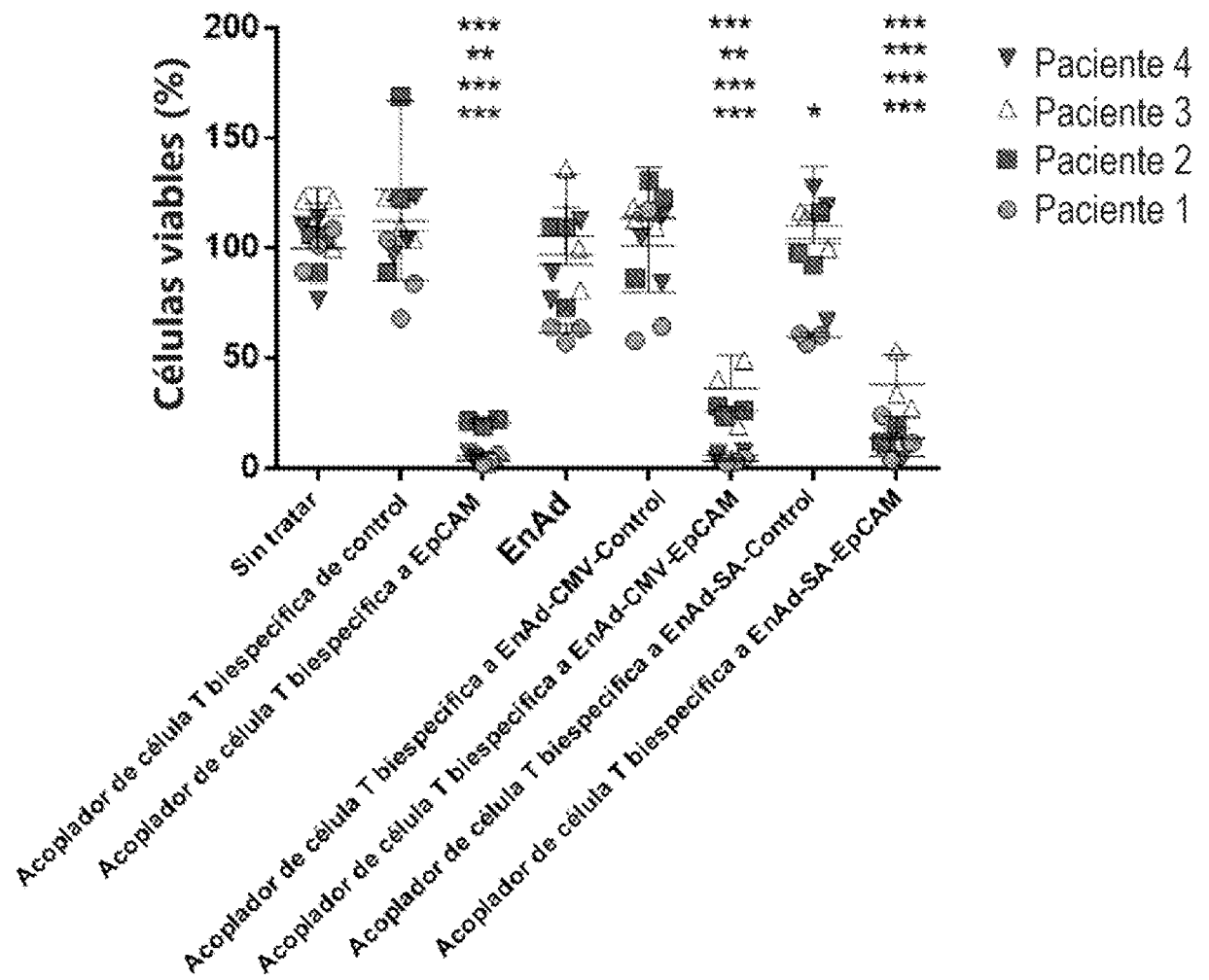
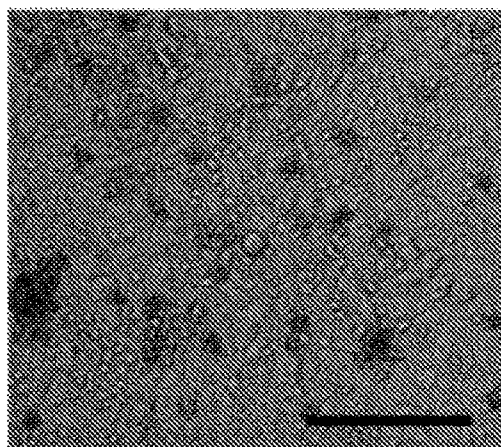
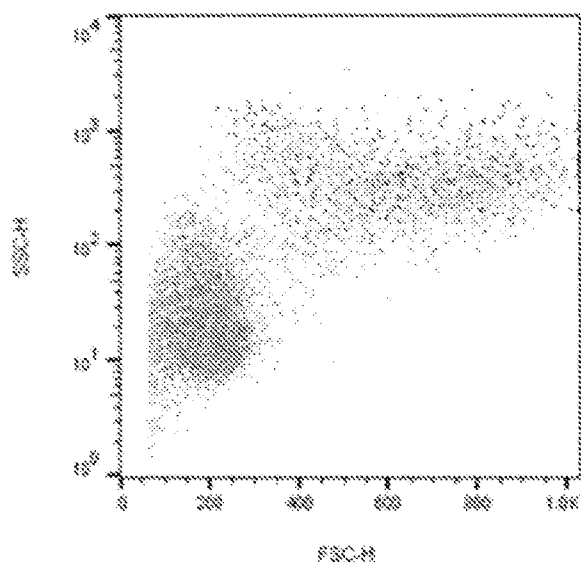
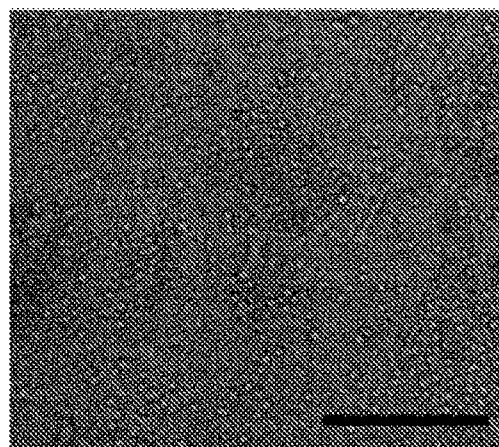


Figura 57 continuación

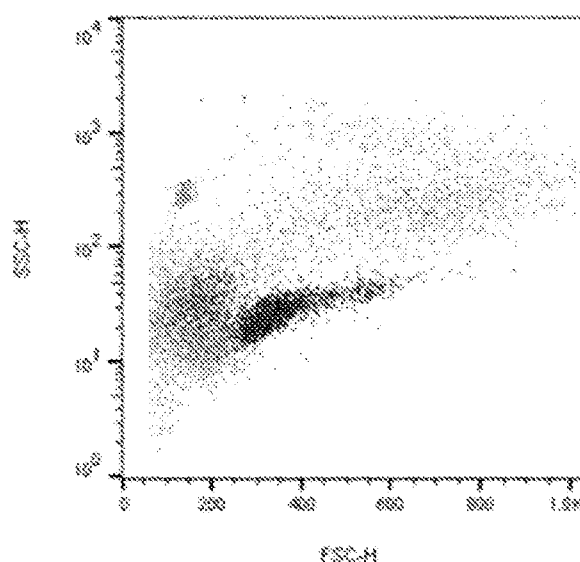
D EnAd



Acoplador de célula T biespecifica a
EnAd-CMV-EpCAM



Nombre de muestra	Nombre de subconjunto	Recuento
(con BTE 1.063) Positivo a EpCAM		313
(con BTE 1.063) Positivo a CD25		18.0
(con BTE 1.063) CD3		180
(con BTE 1.063) Solo células		9488



Nombre de muestra	Nombre de subconjunto	Recuento
(ep BTE 1.066) Positivo a EpCAM		8.88
(ep BTE 1.066) Positivo a CD25		3214
(ep BTE 1.066) CD3		3480
(ep BTE 1.066) Sin filtrar		10000

Figura 57 continuación

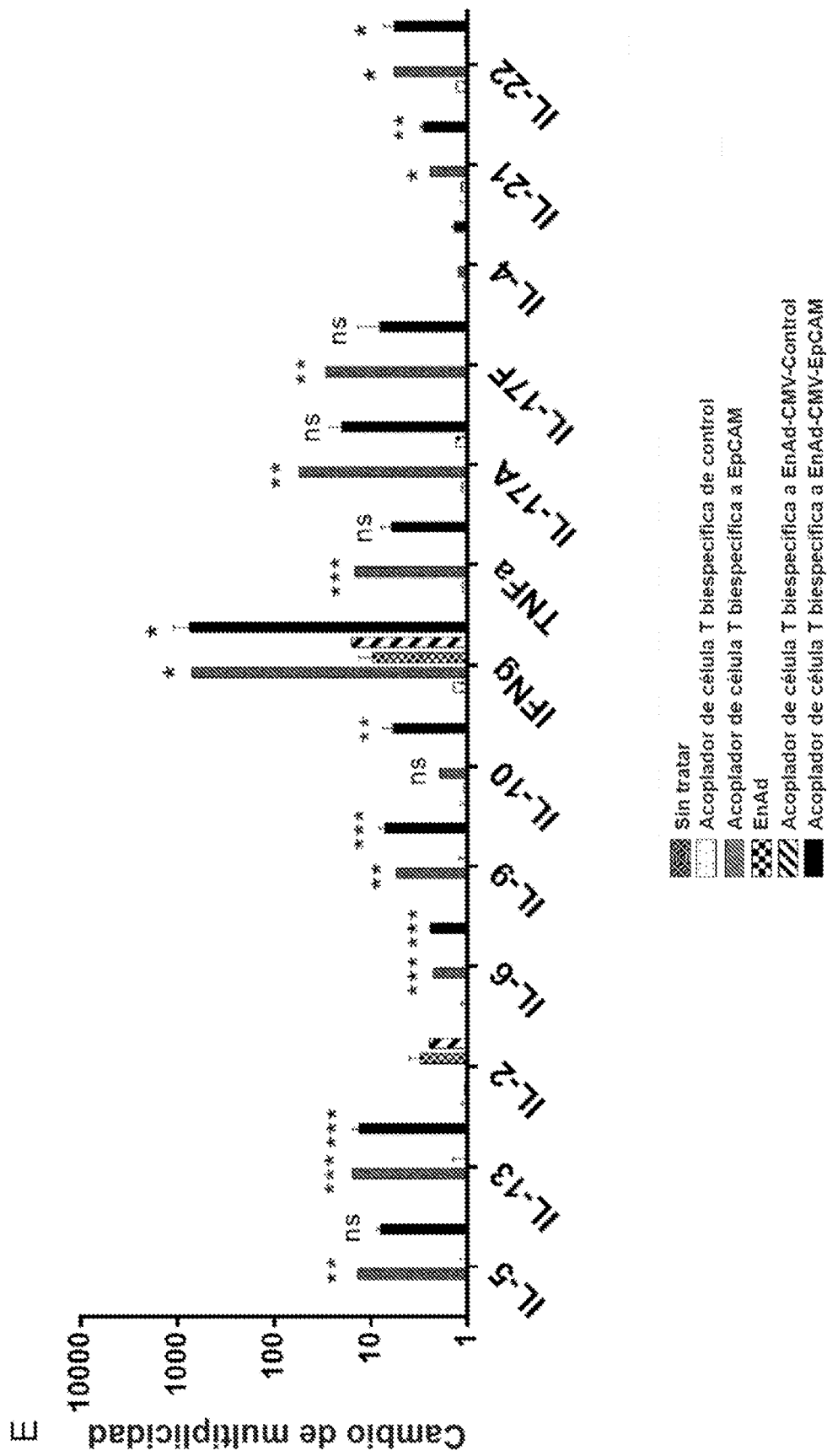


Figura 57 continuación

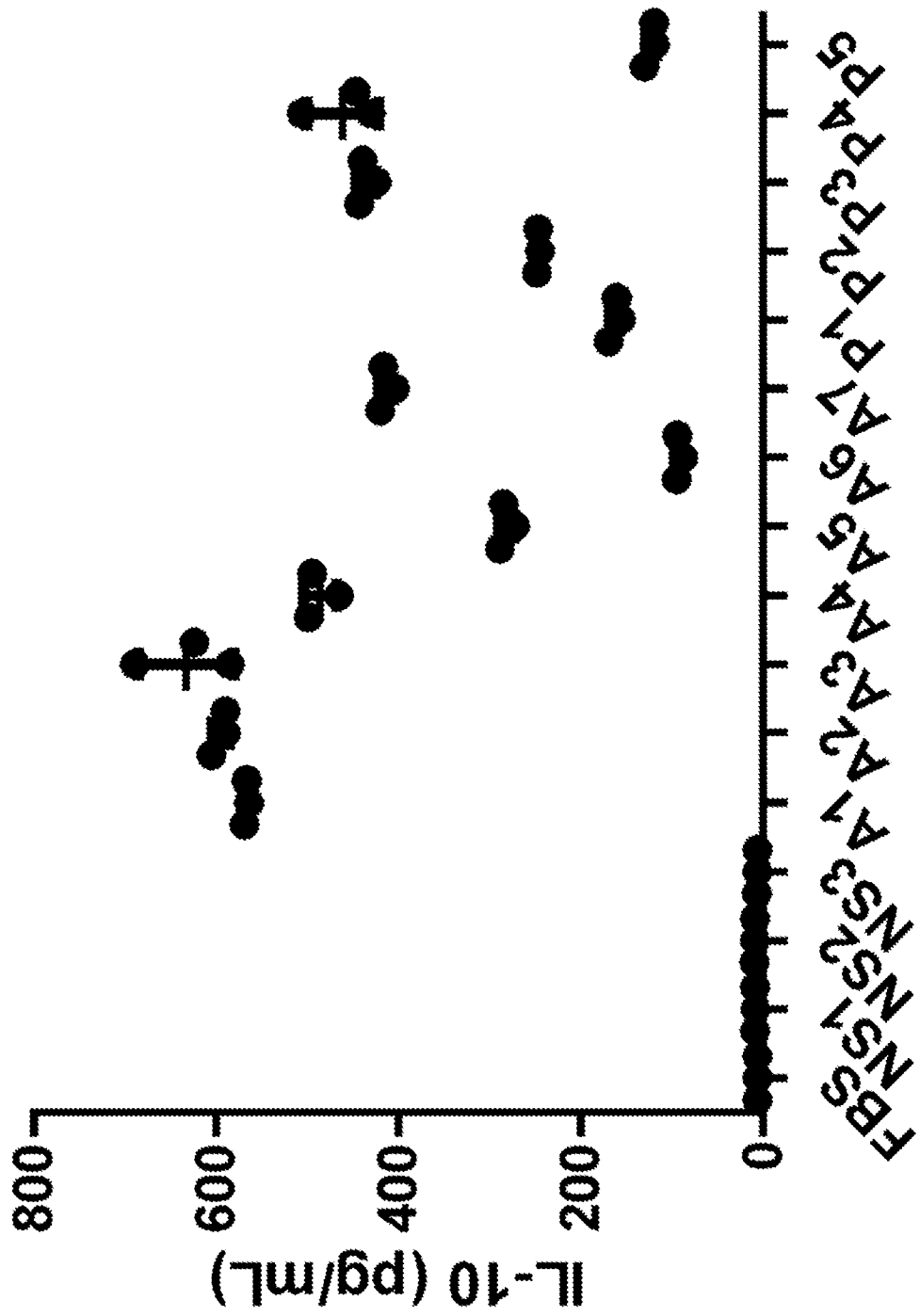


FIGURA 58

FIGURA 59



FIGURA 60

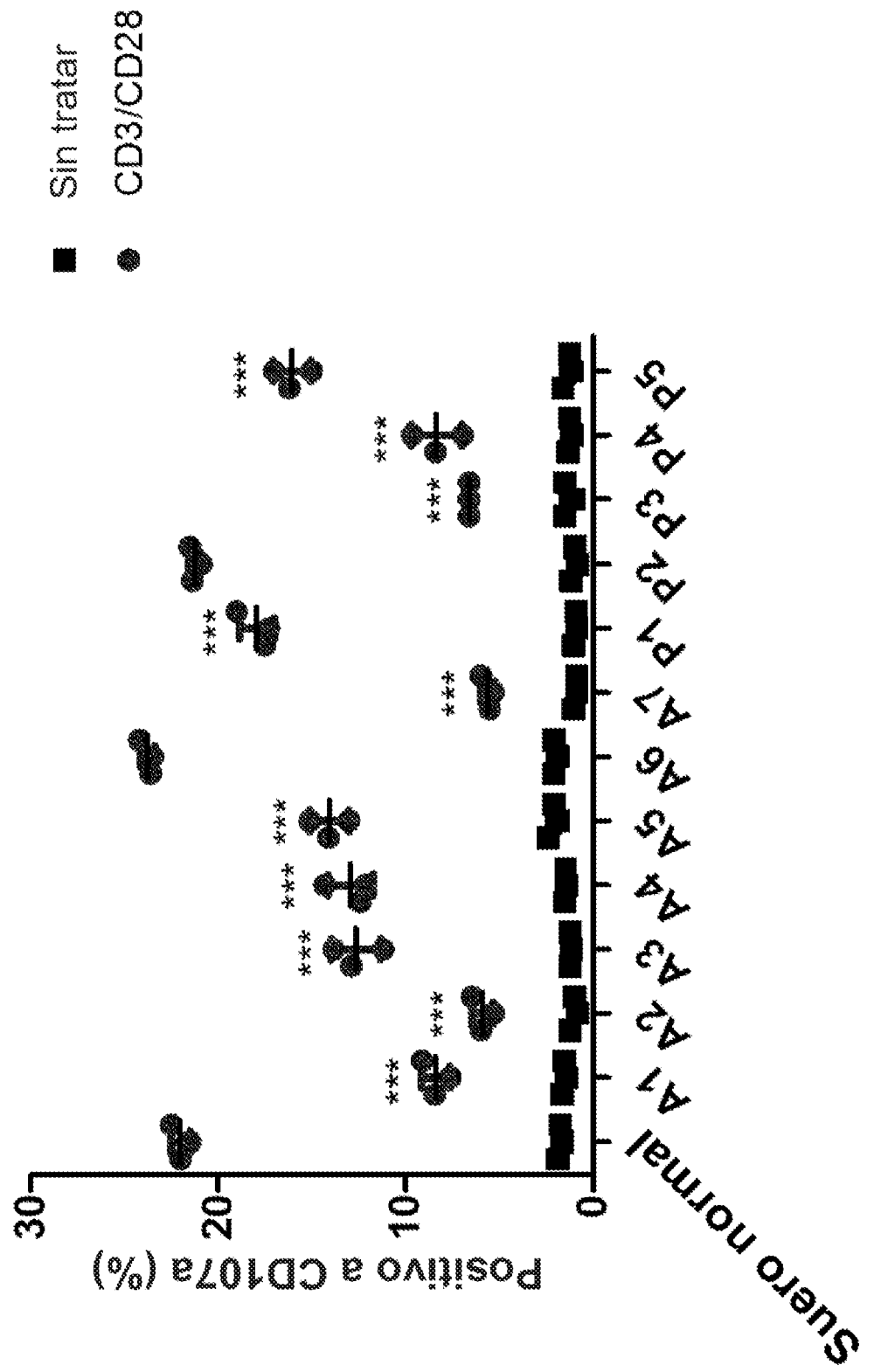


FIGURA 61

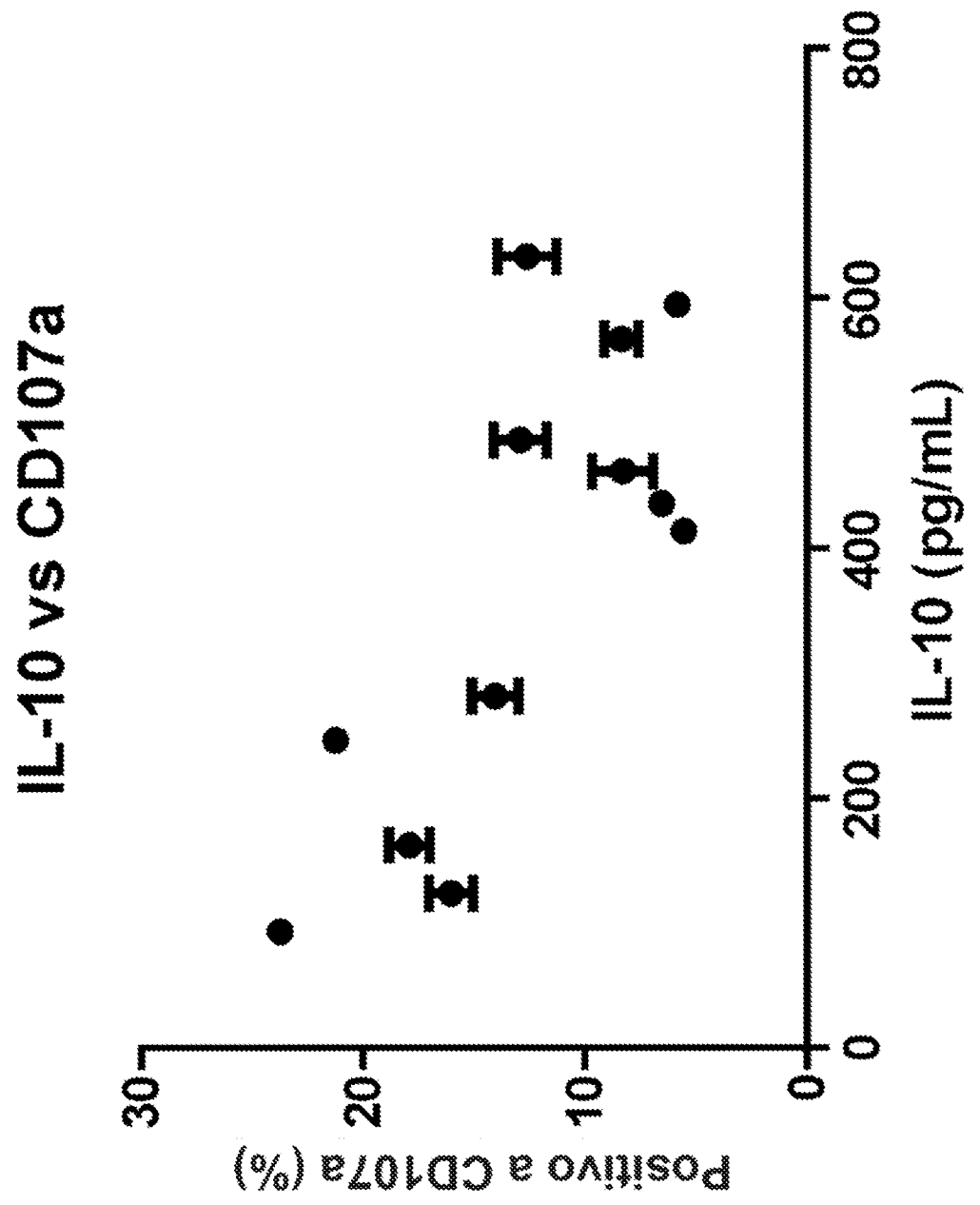


FIGURA 62

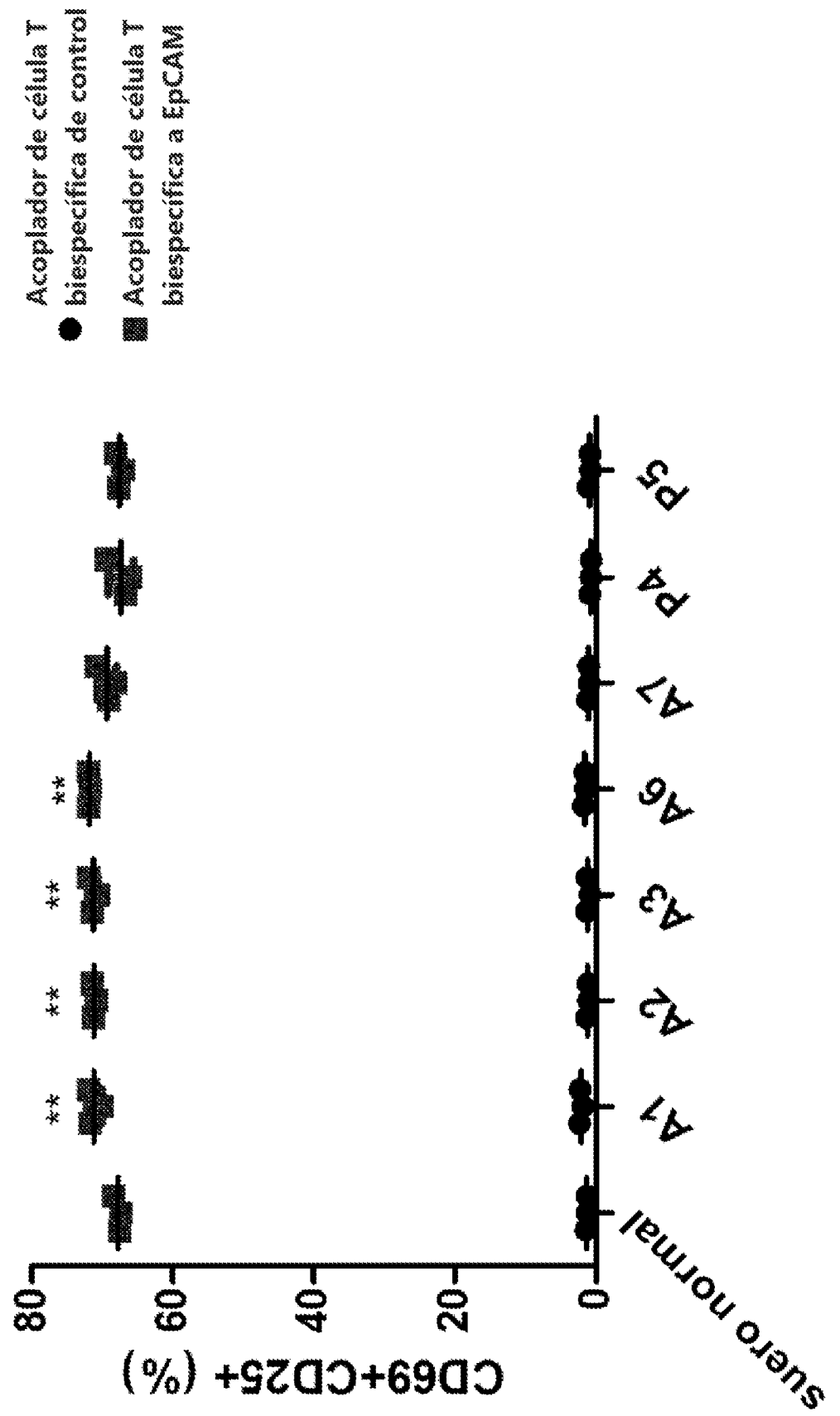


FIGURA 63

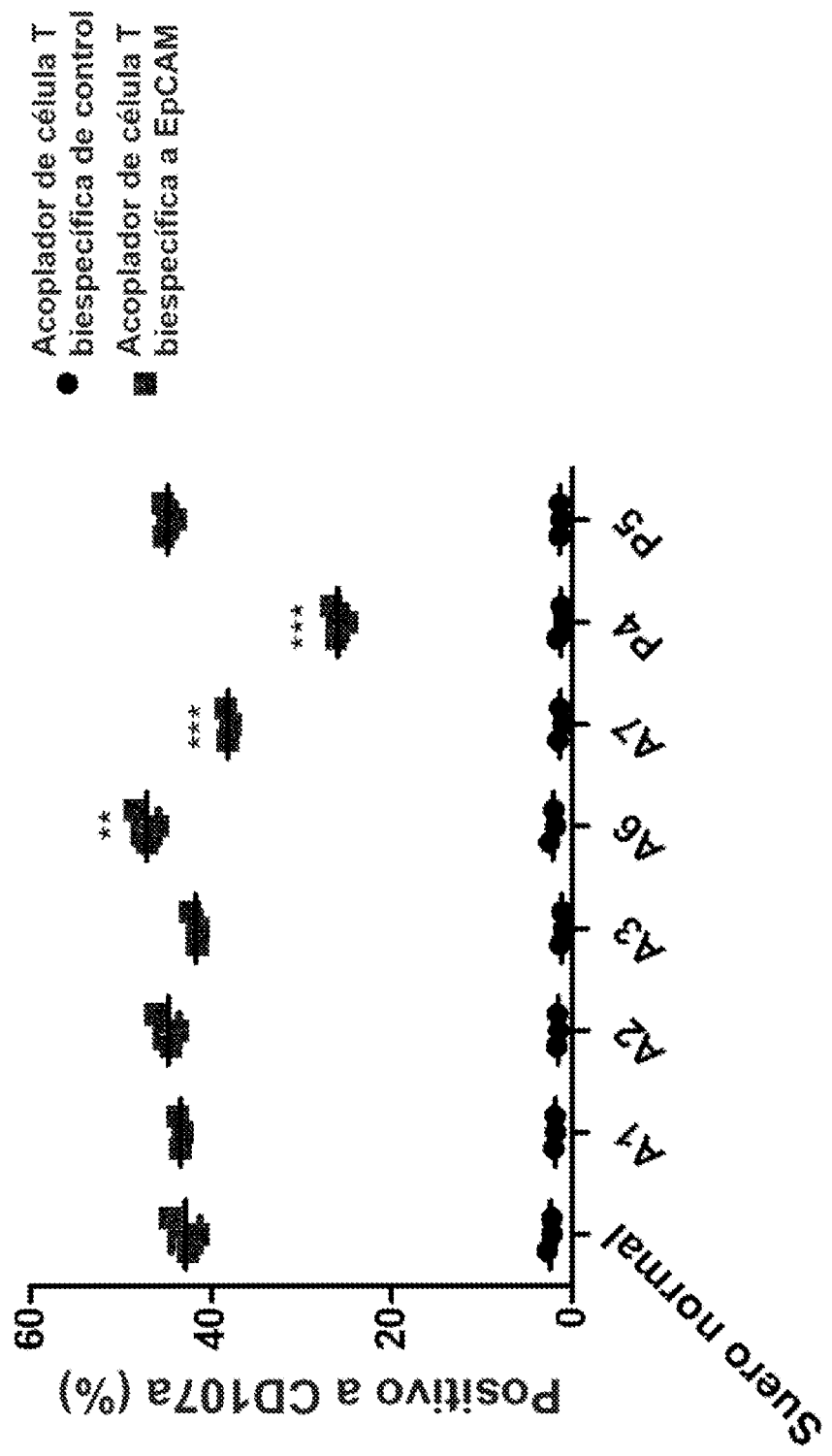


FIGURA 64

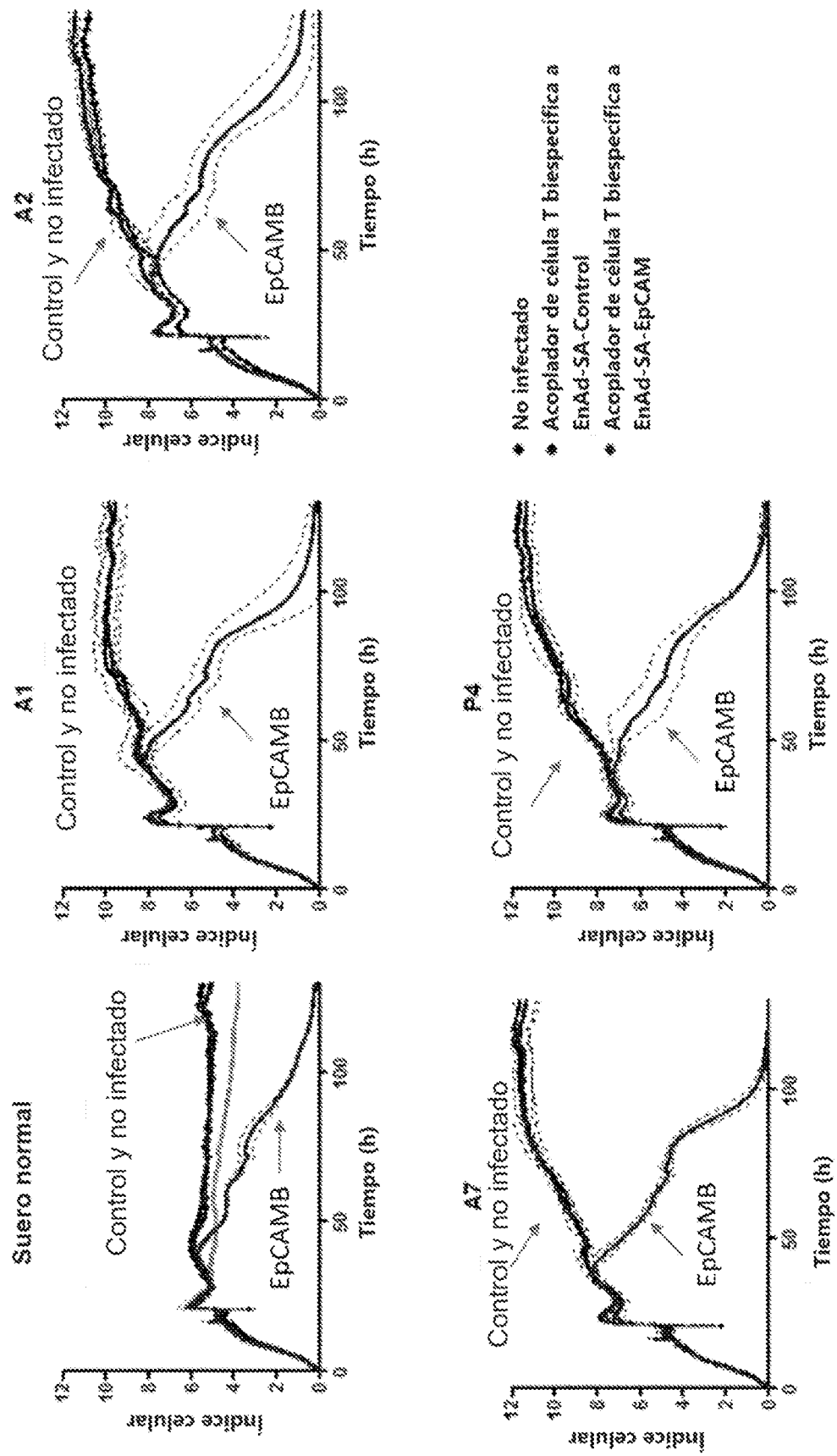


FIGURA 65

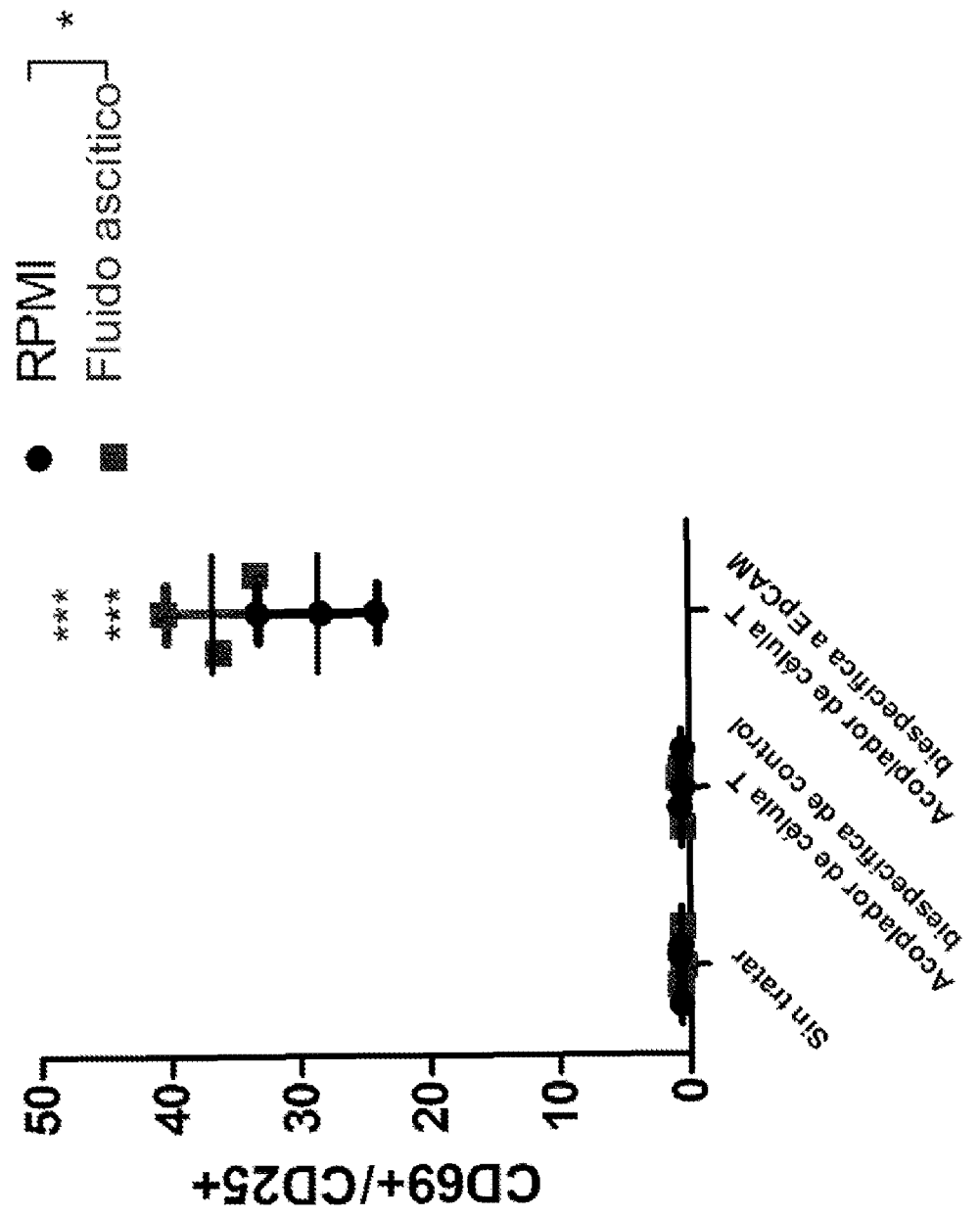


FIGURA 66A

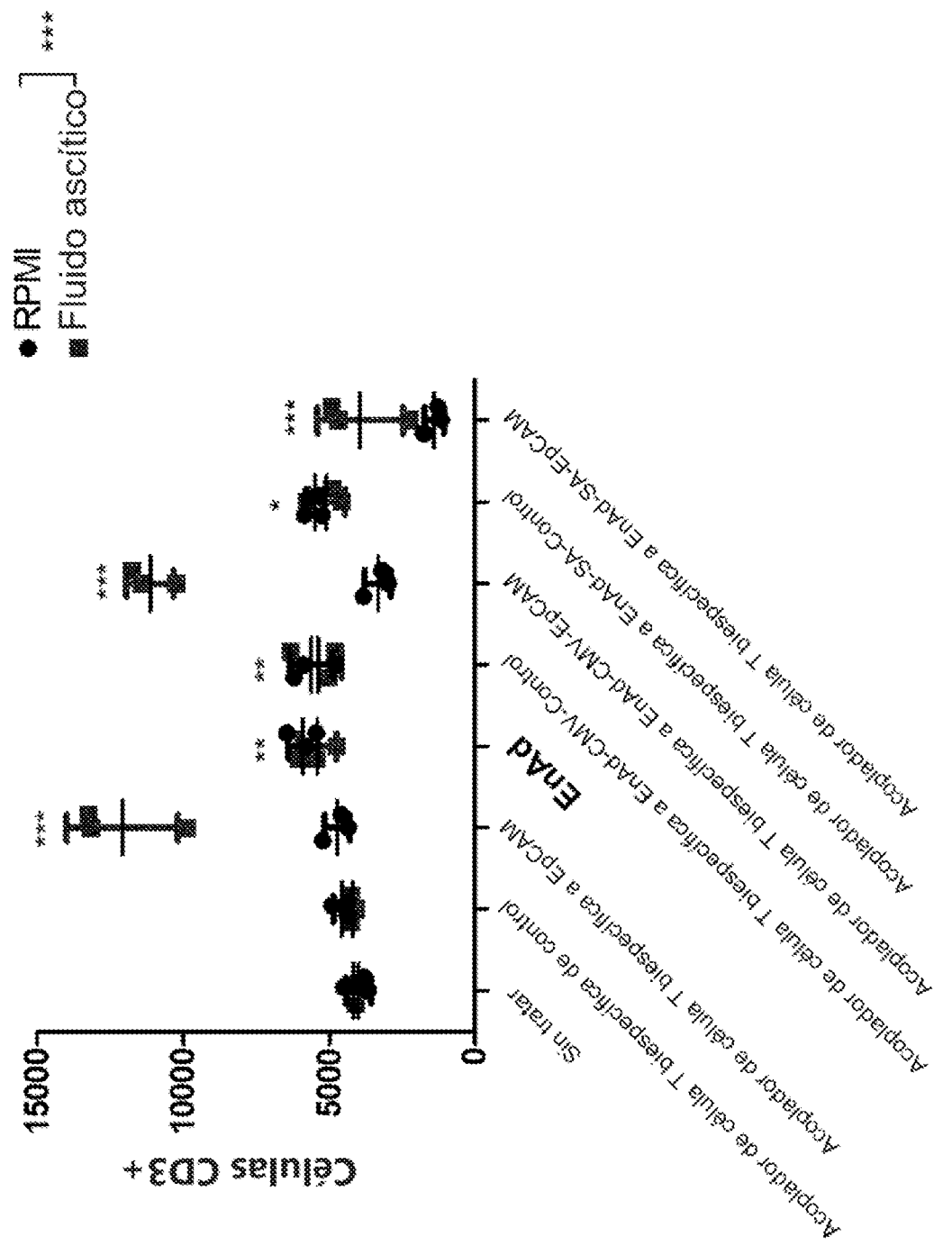
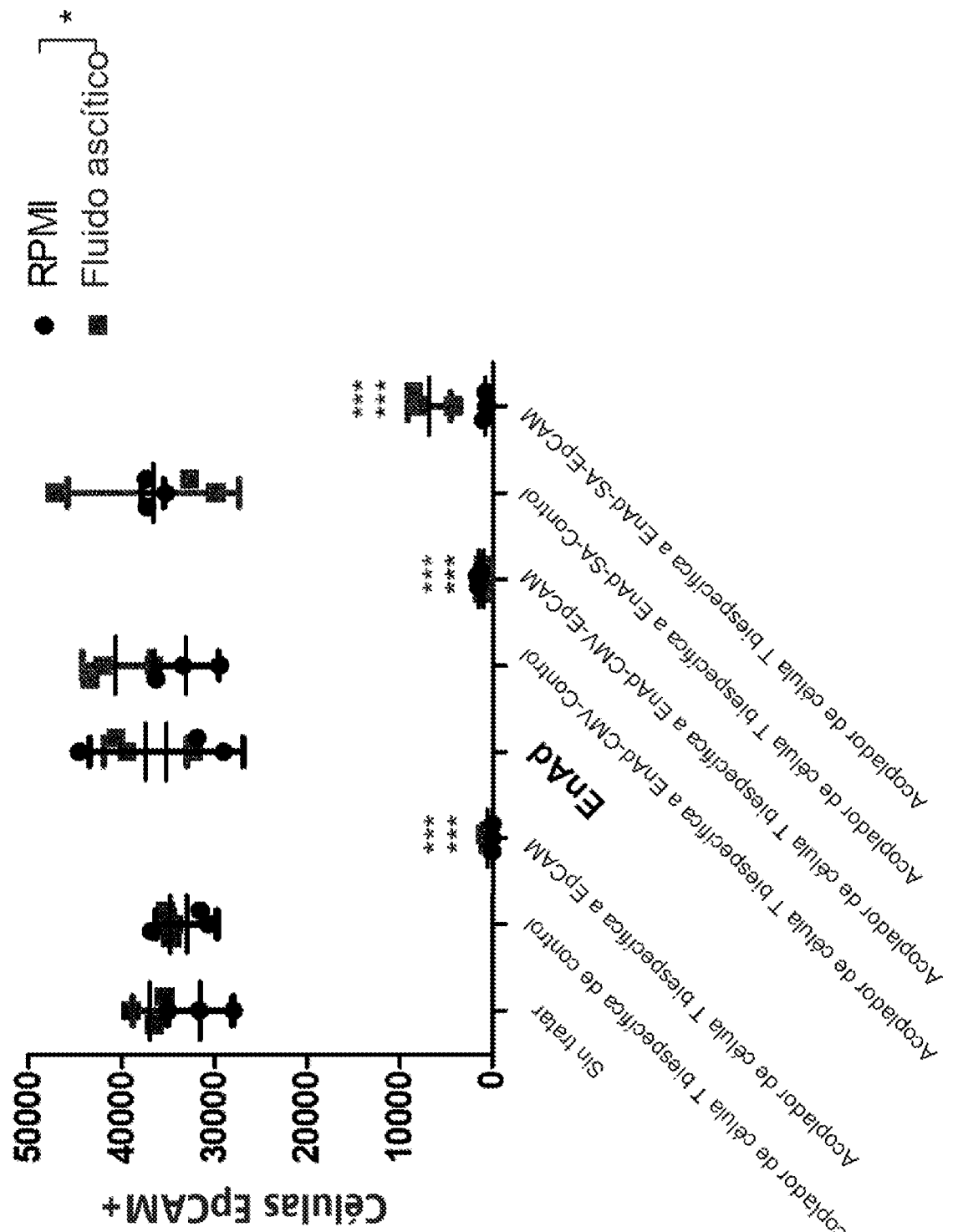


FIGURA 66C



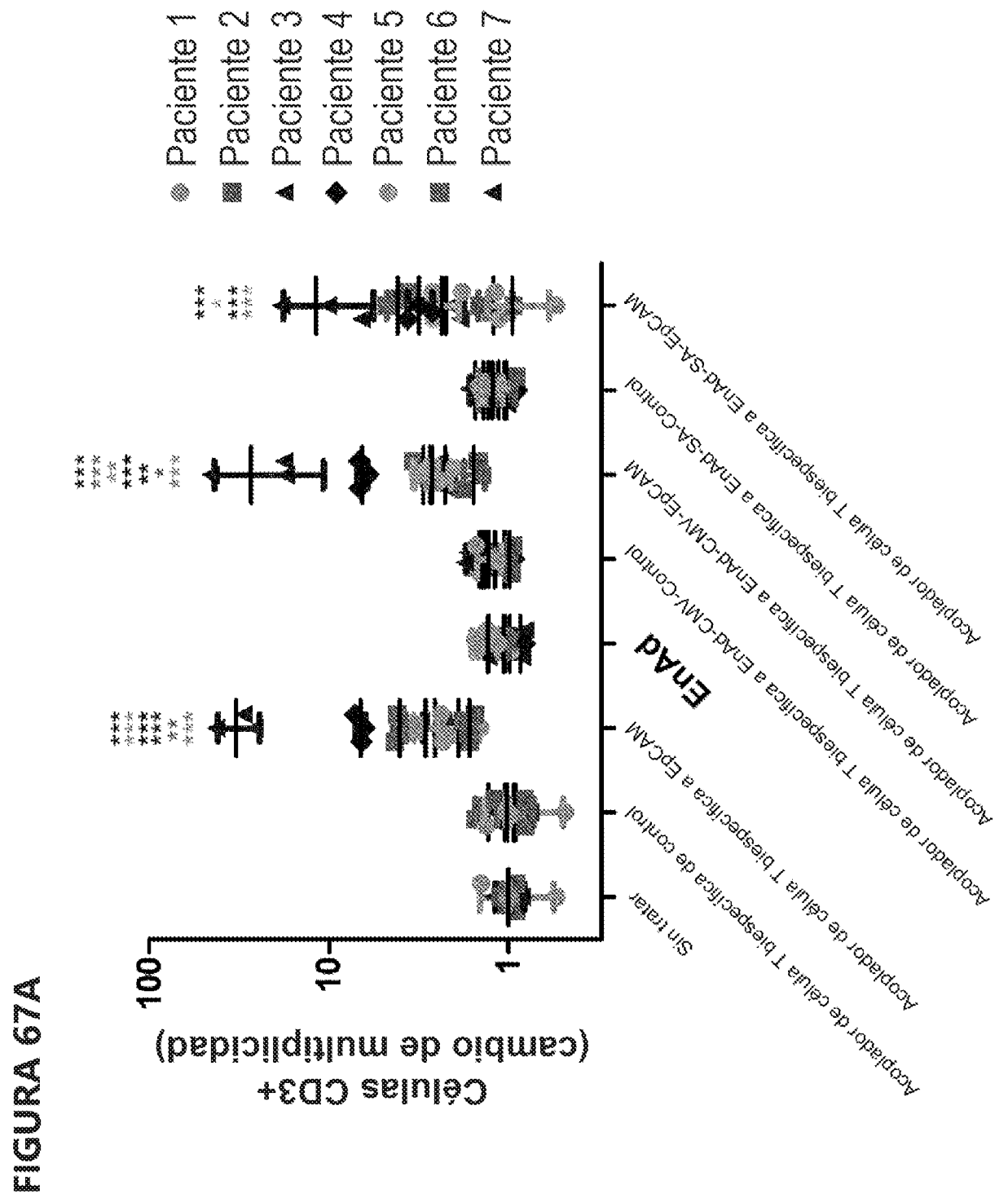
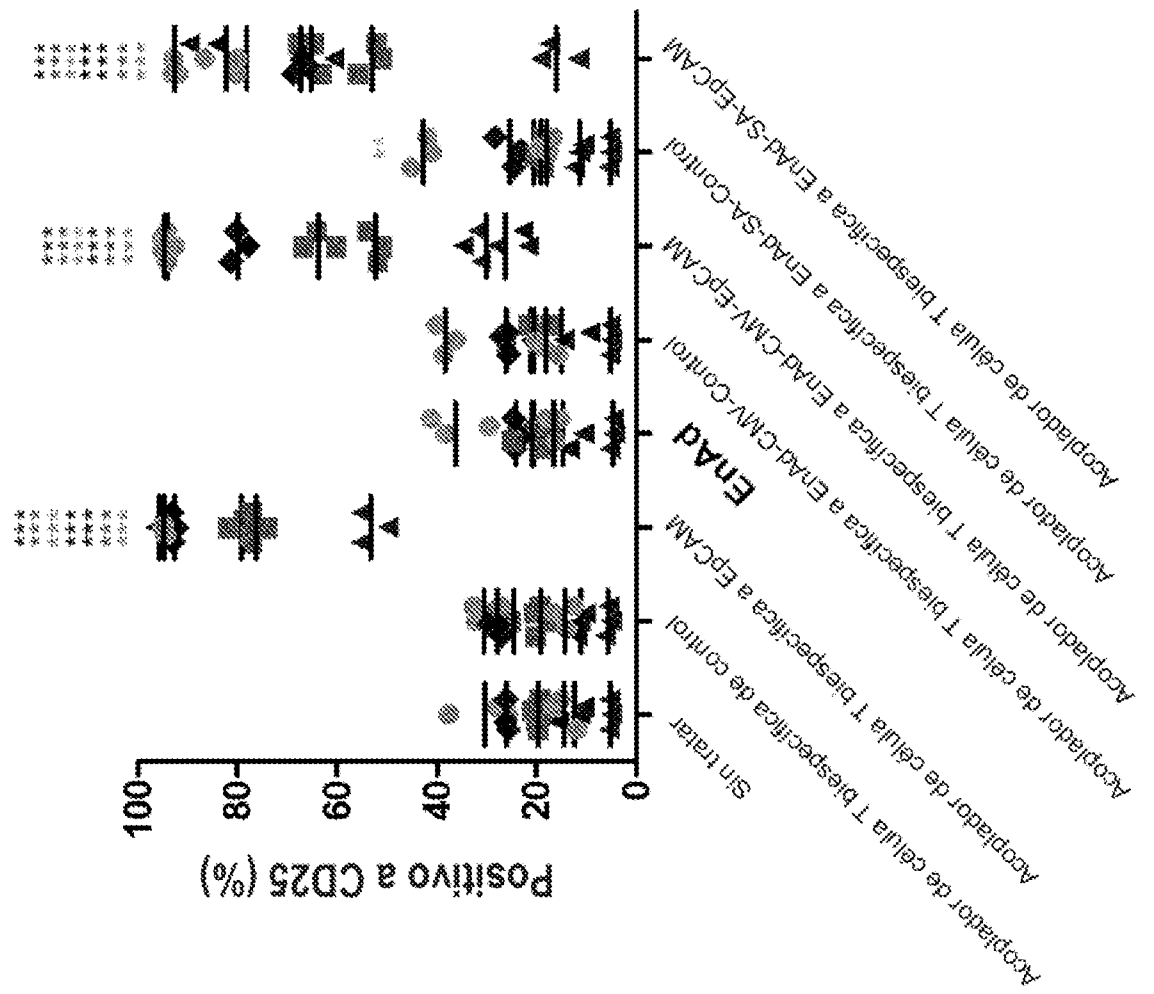


FIGURA 67B



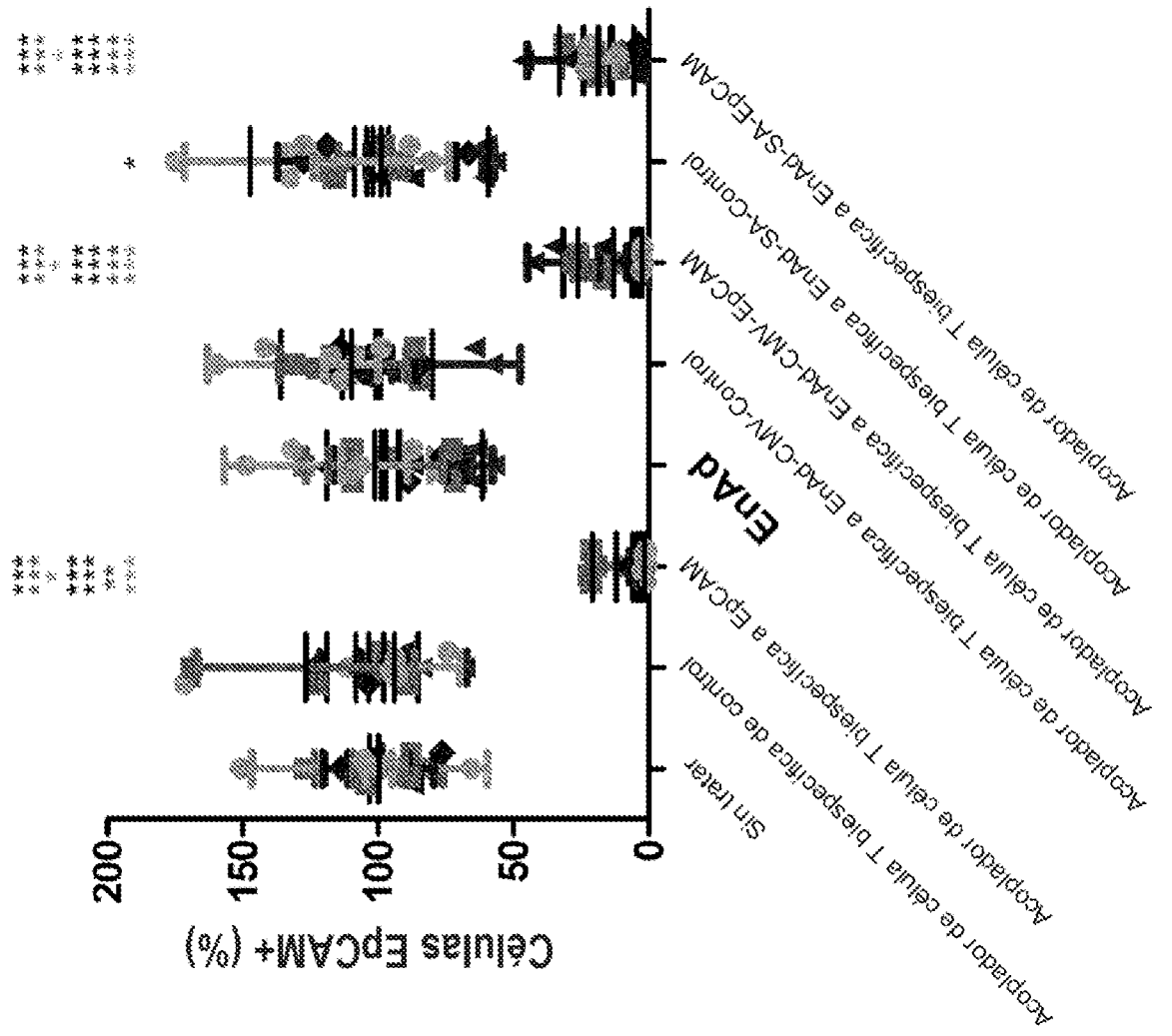
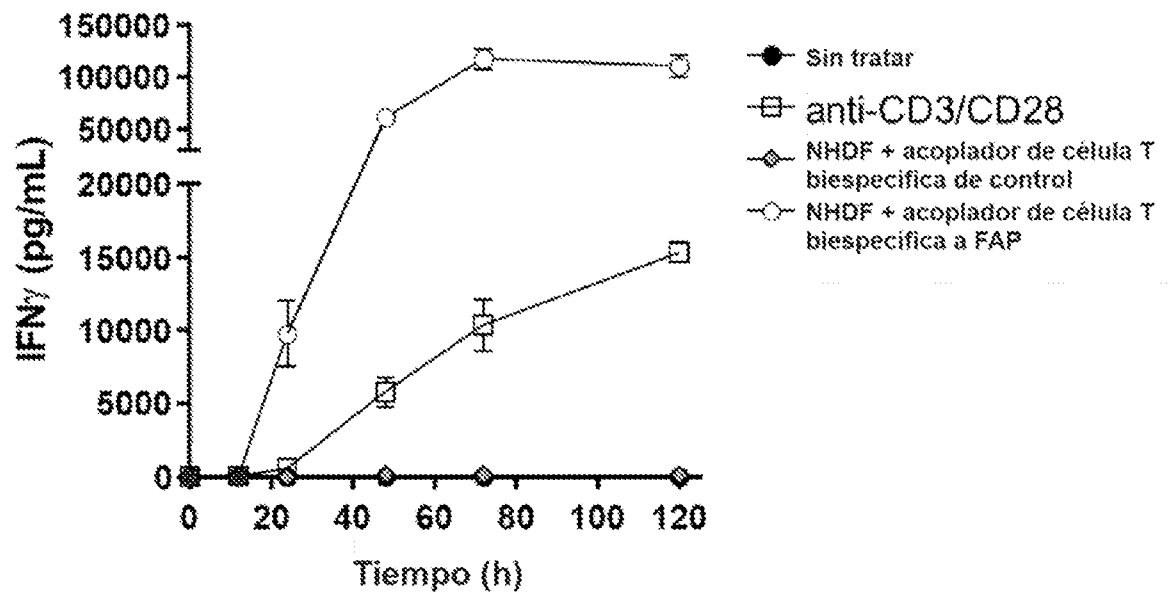


FIGURA 67C

Figura 68

A



B

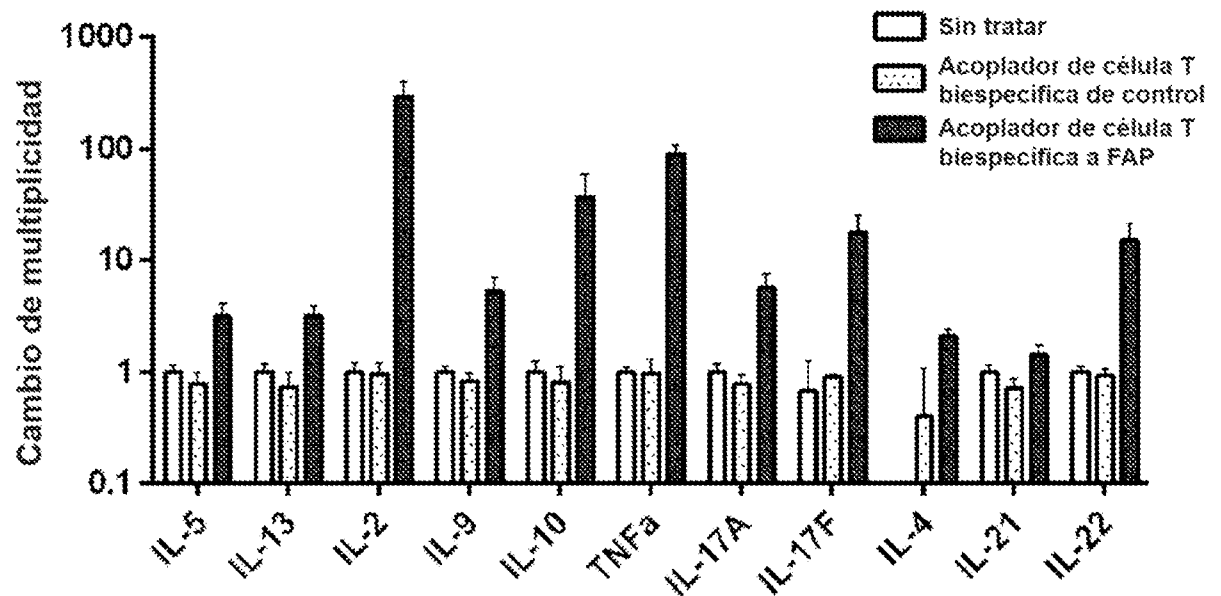


Figura 69

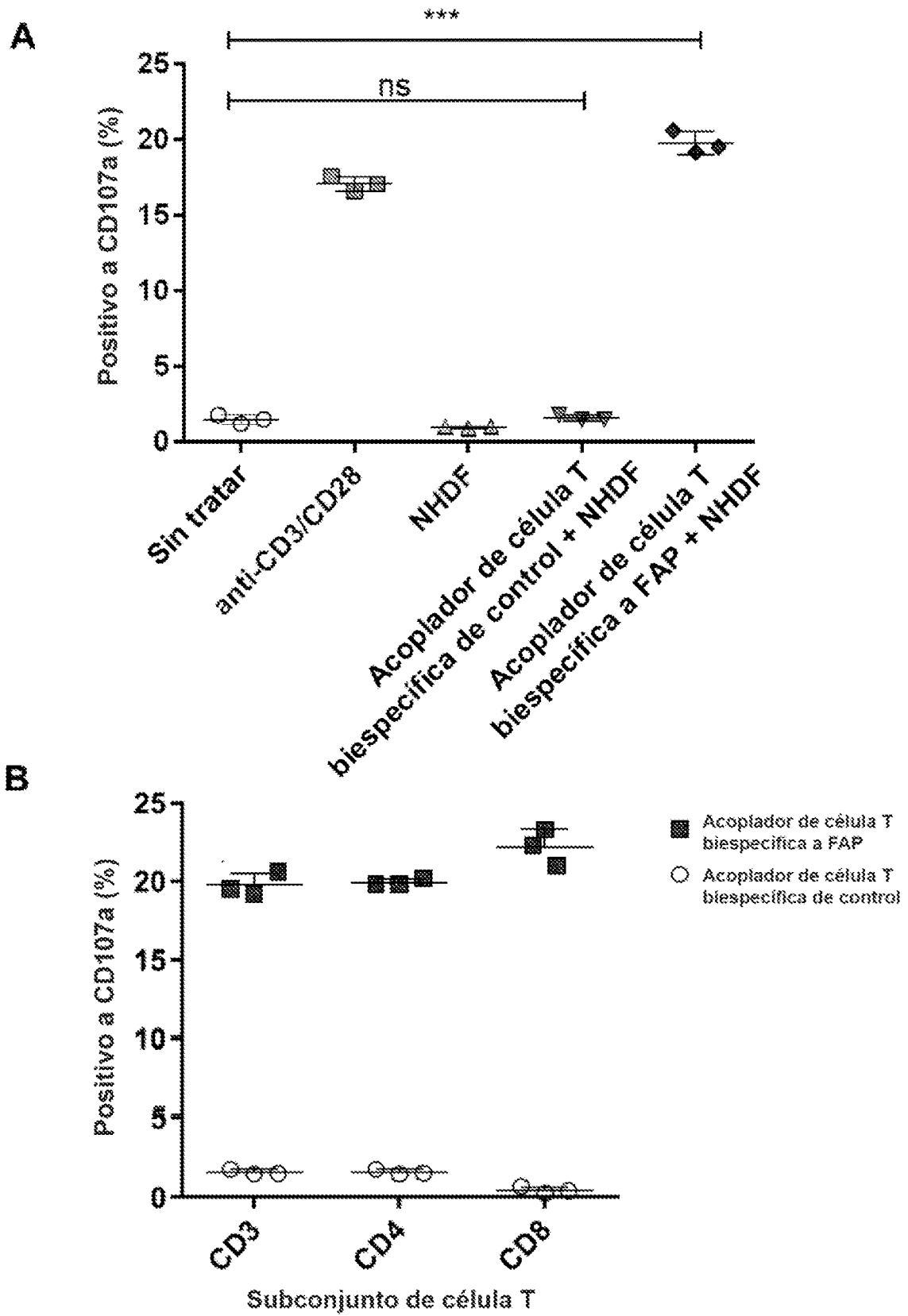


Figura 69

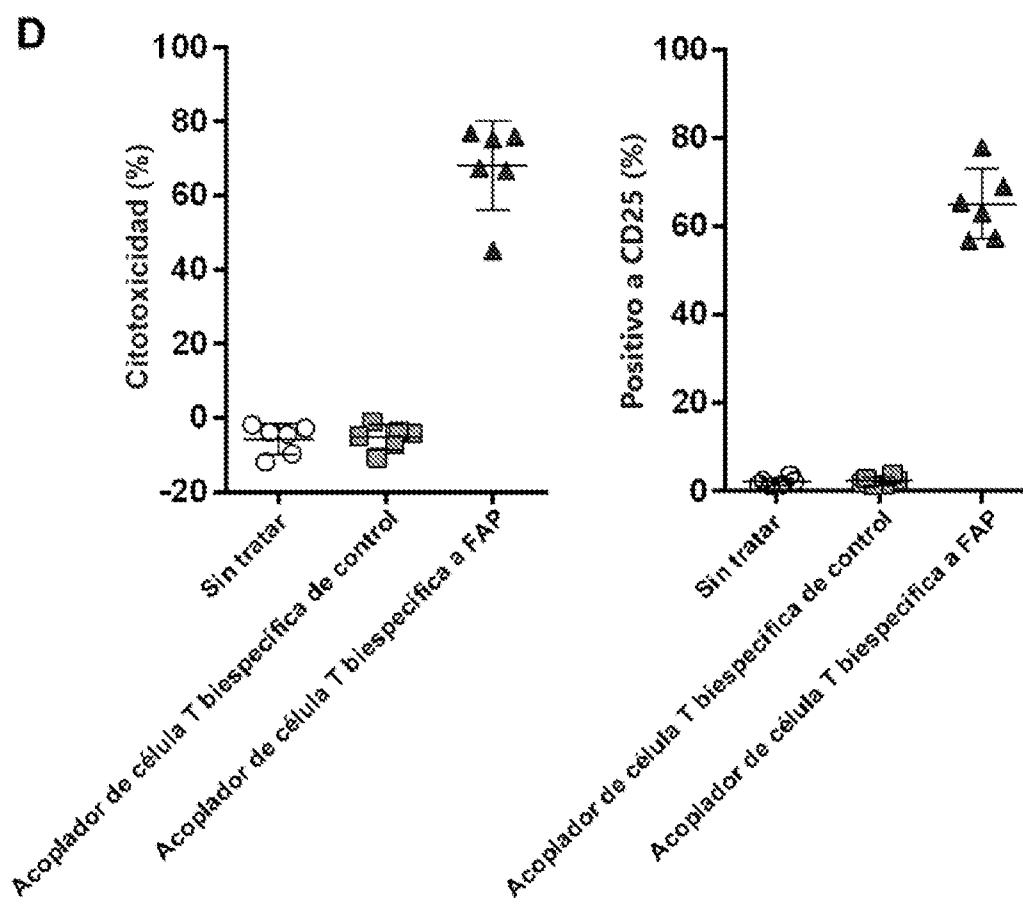
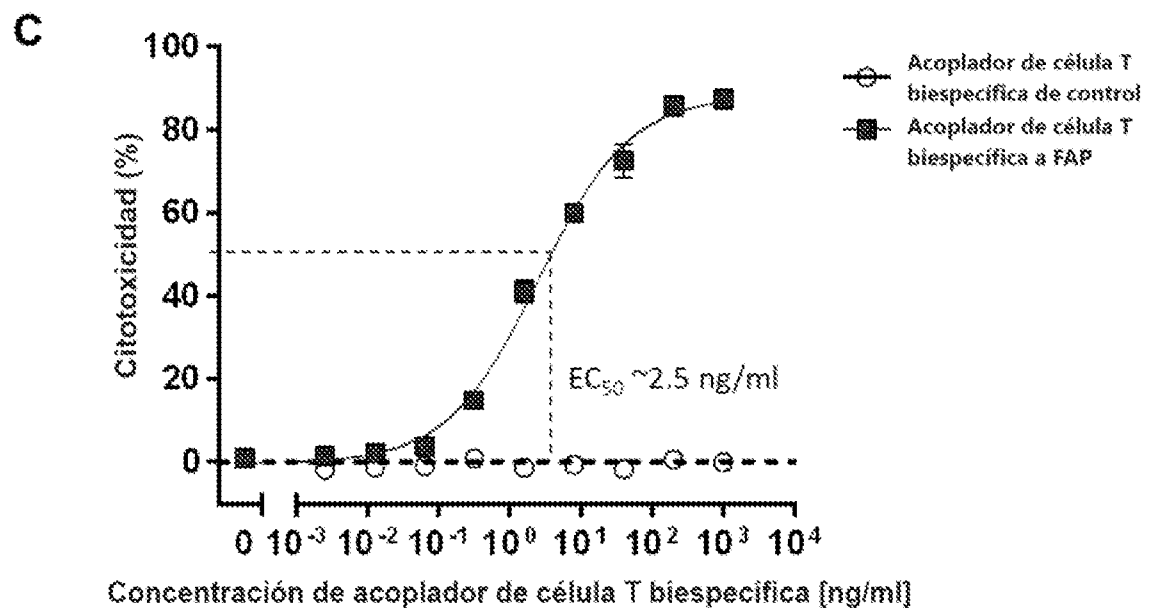


Figura 70

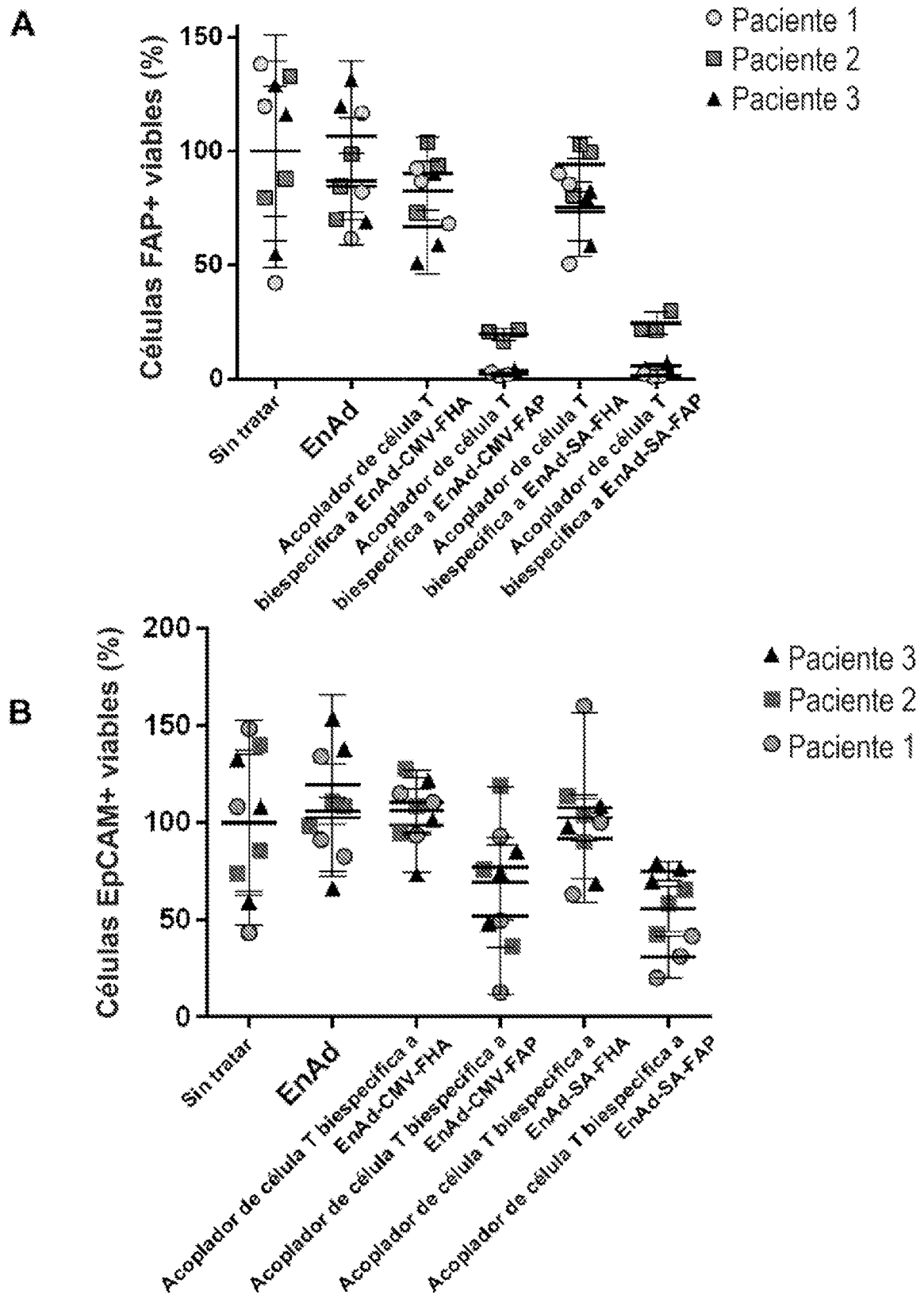


Figura 70

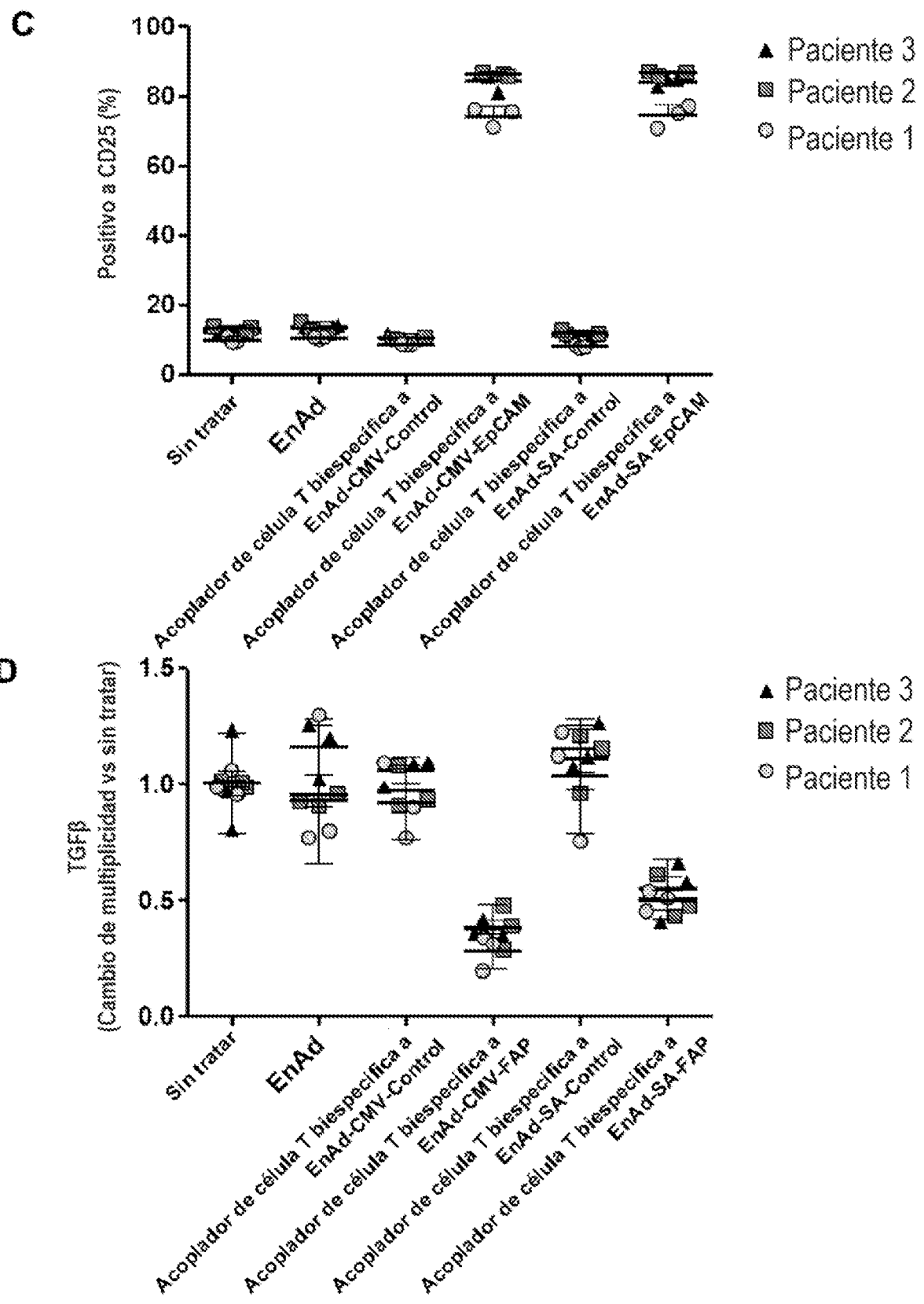


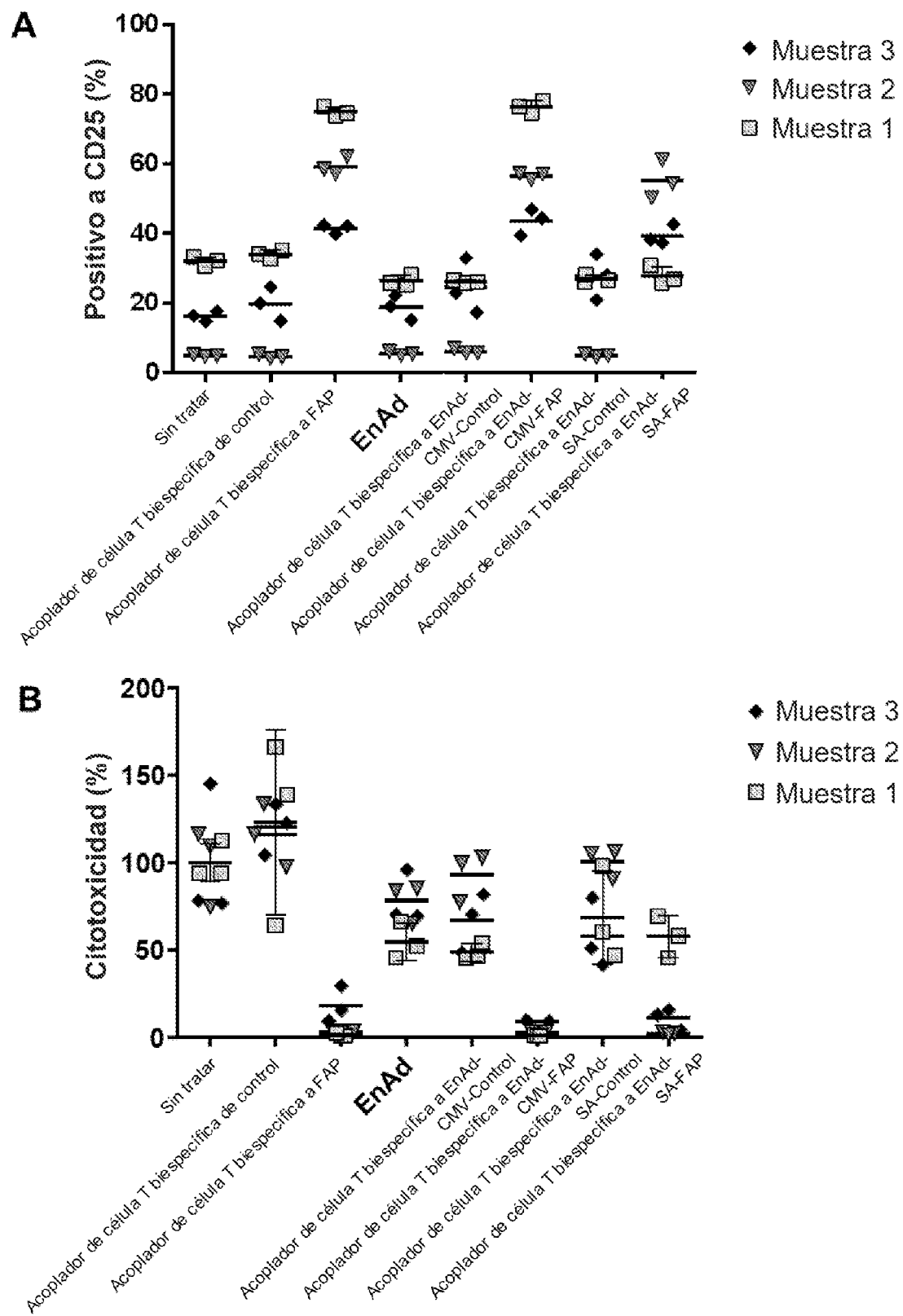
Figura 71

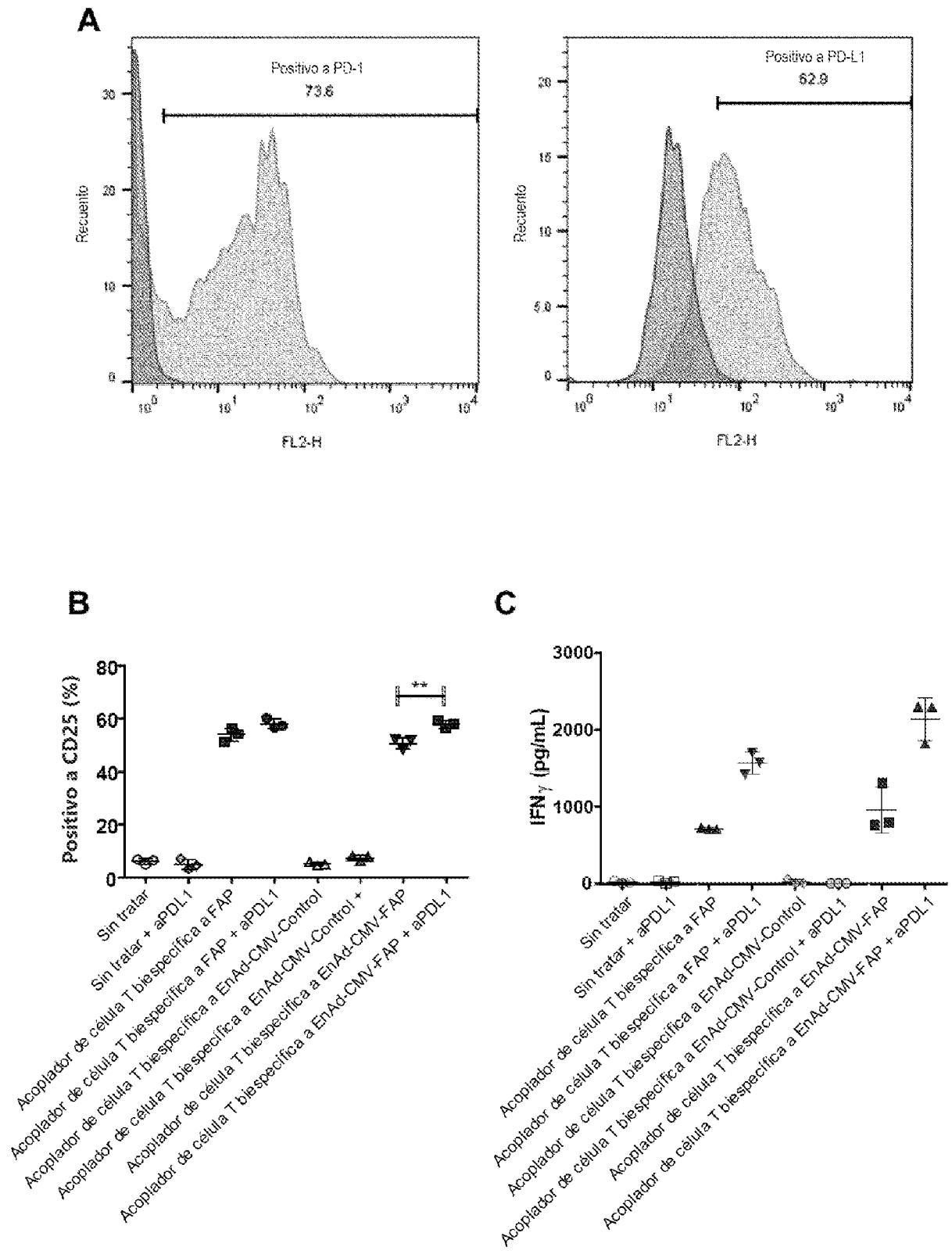
Figura 72

Figura 72

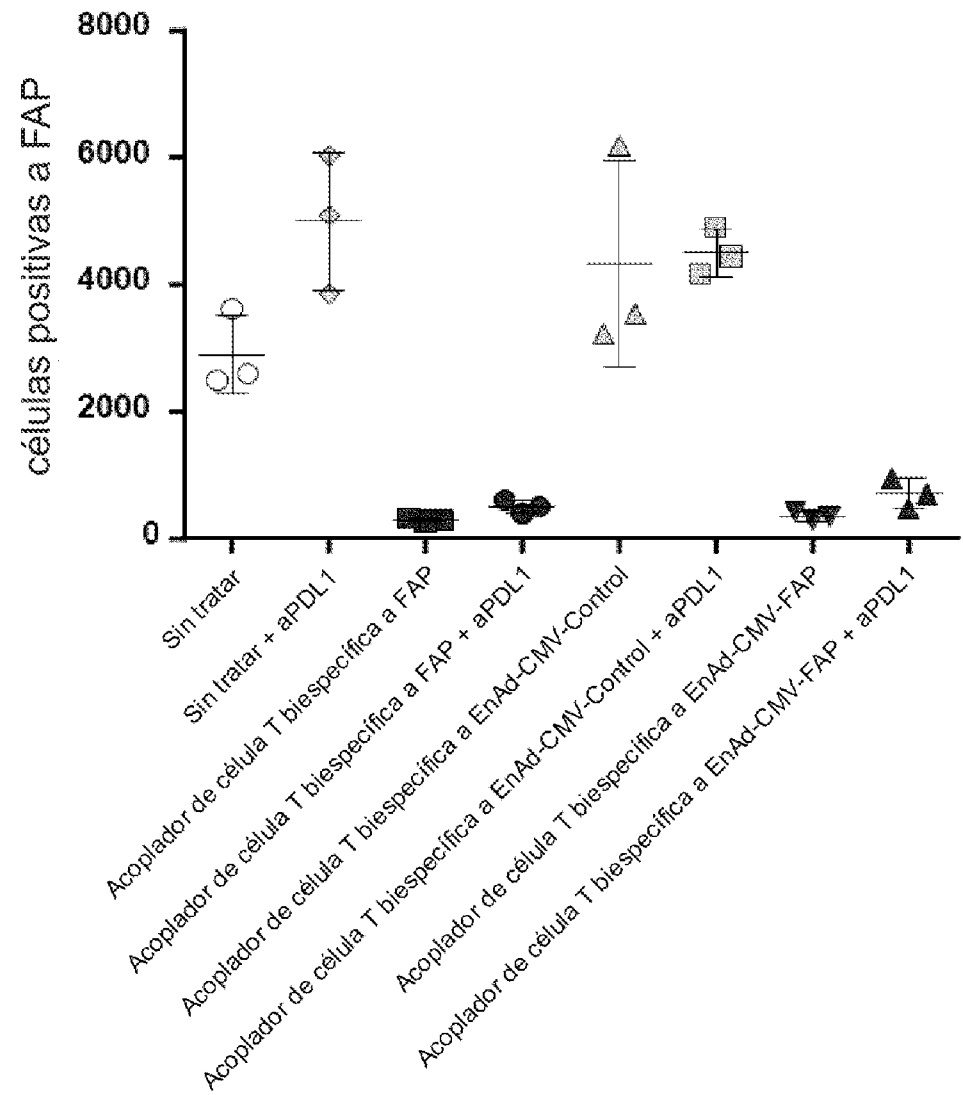
D

Figura 73

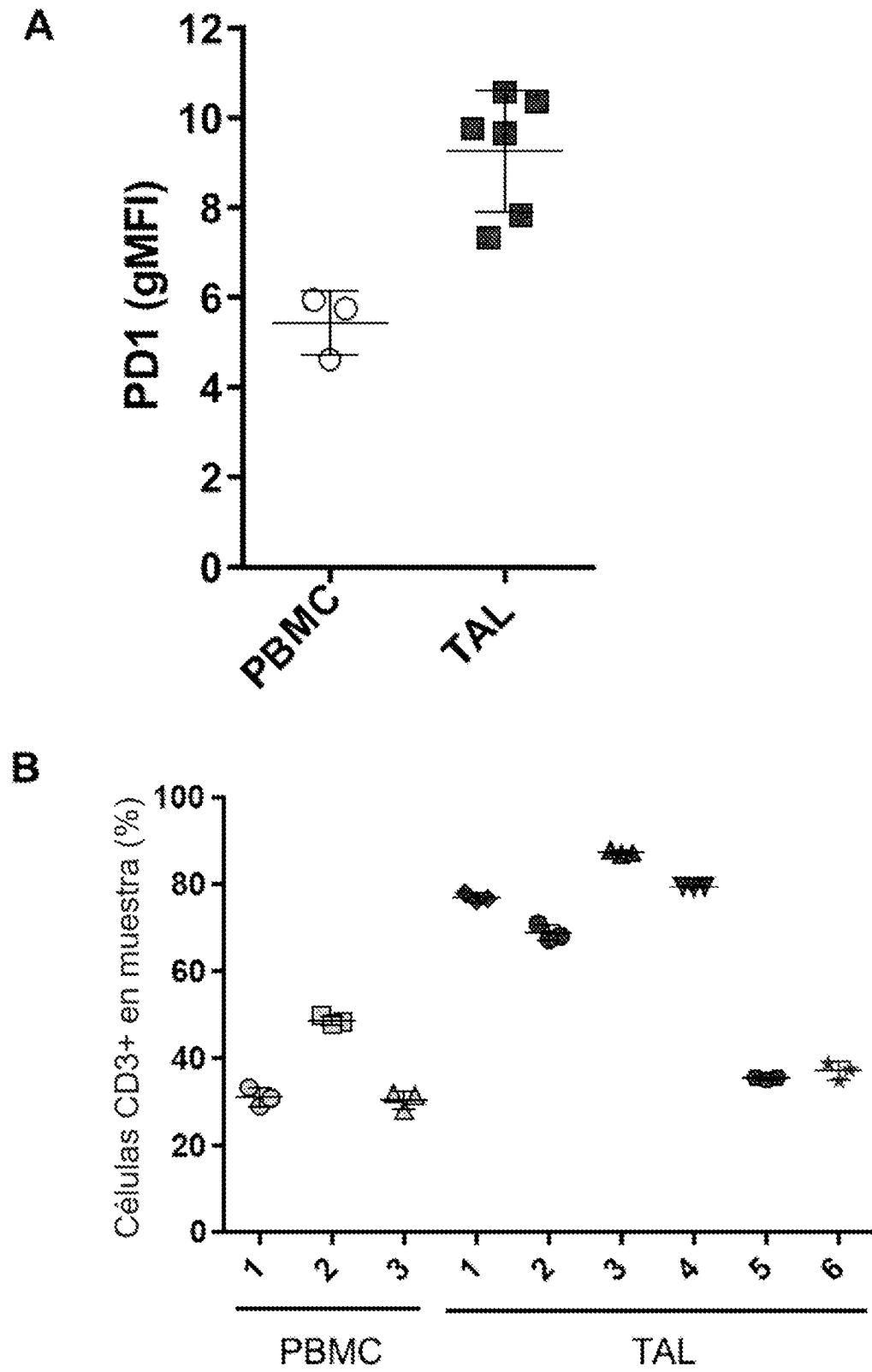


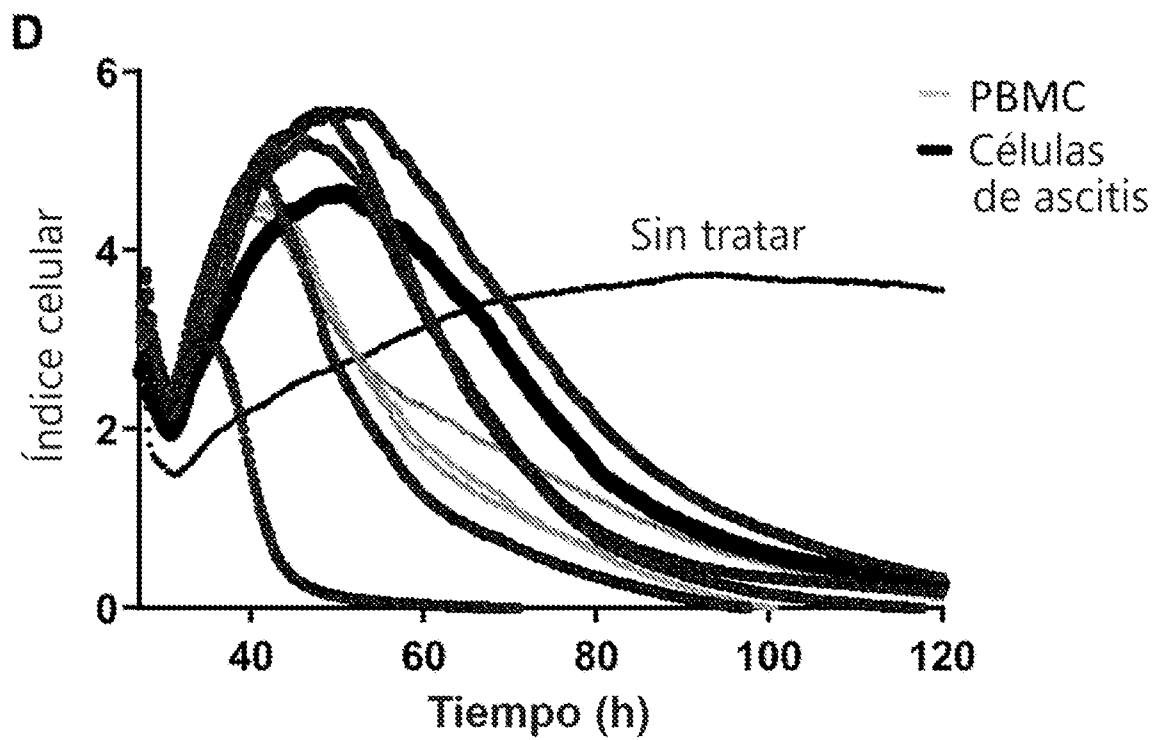
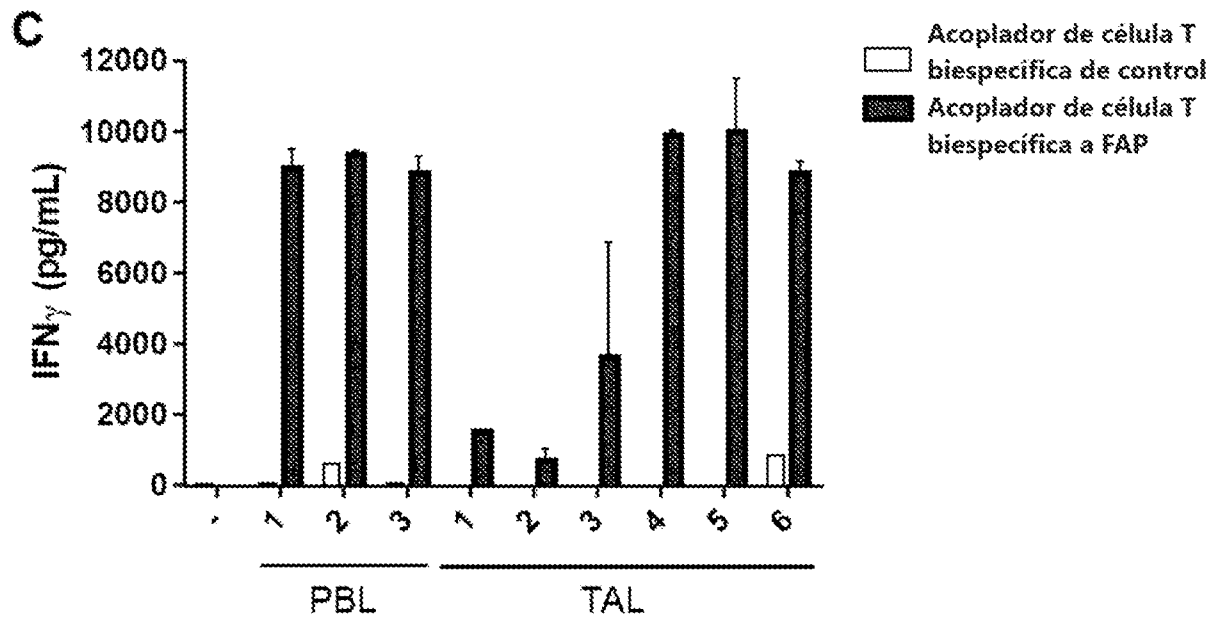
Figura 73

Figura 74

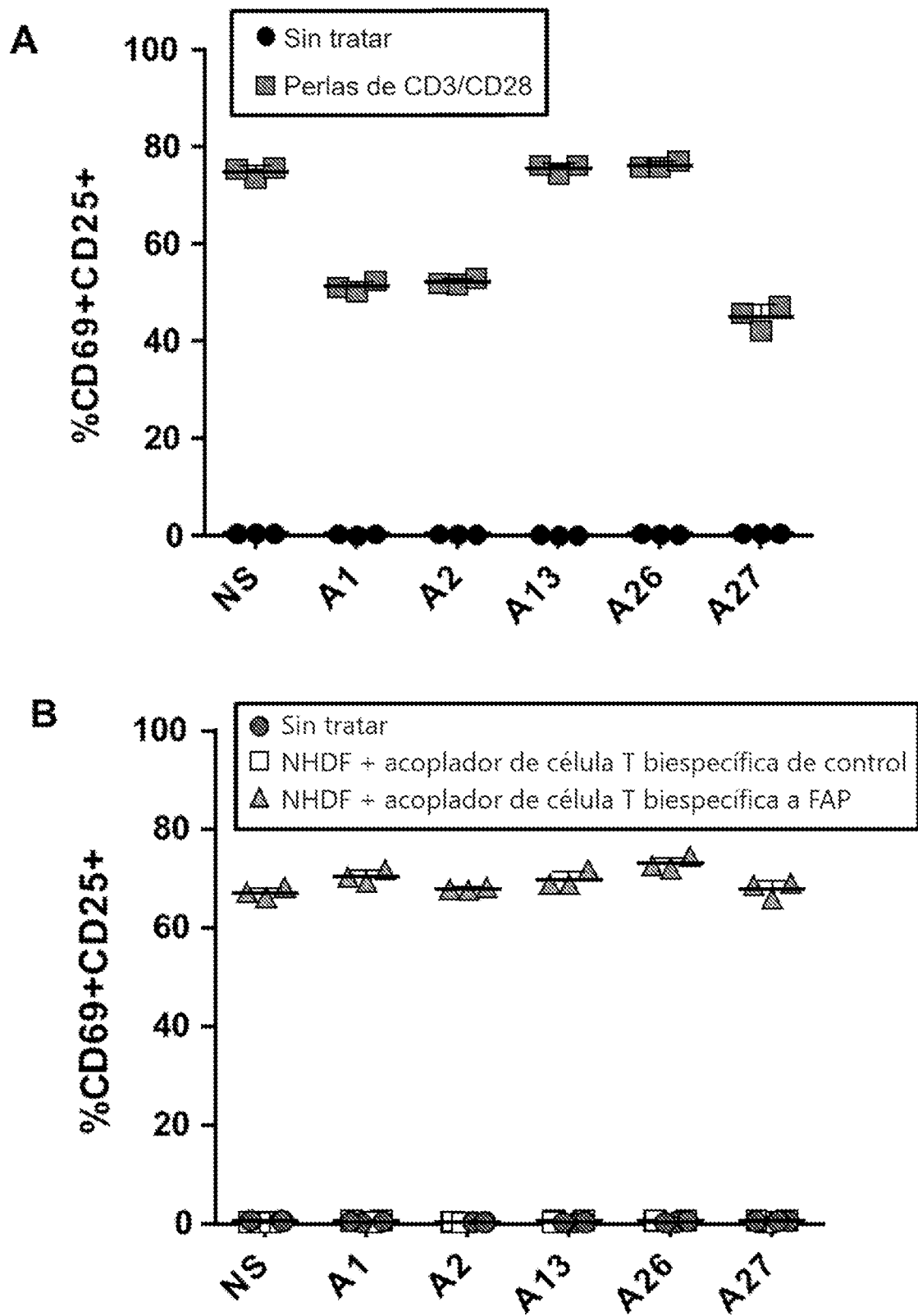


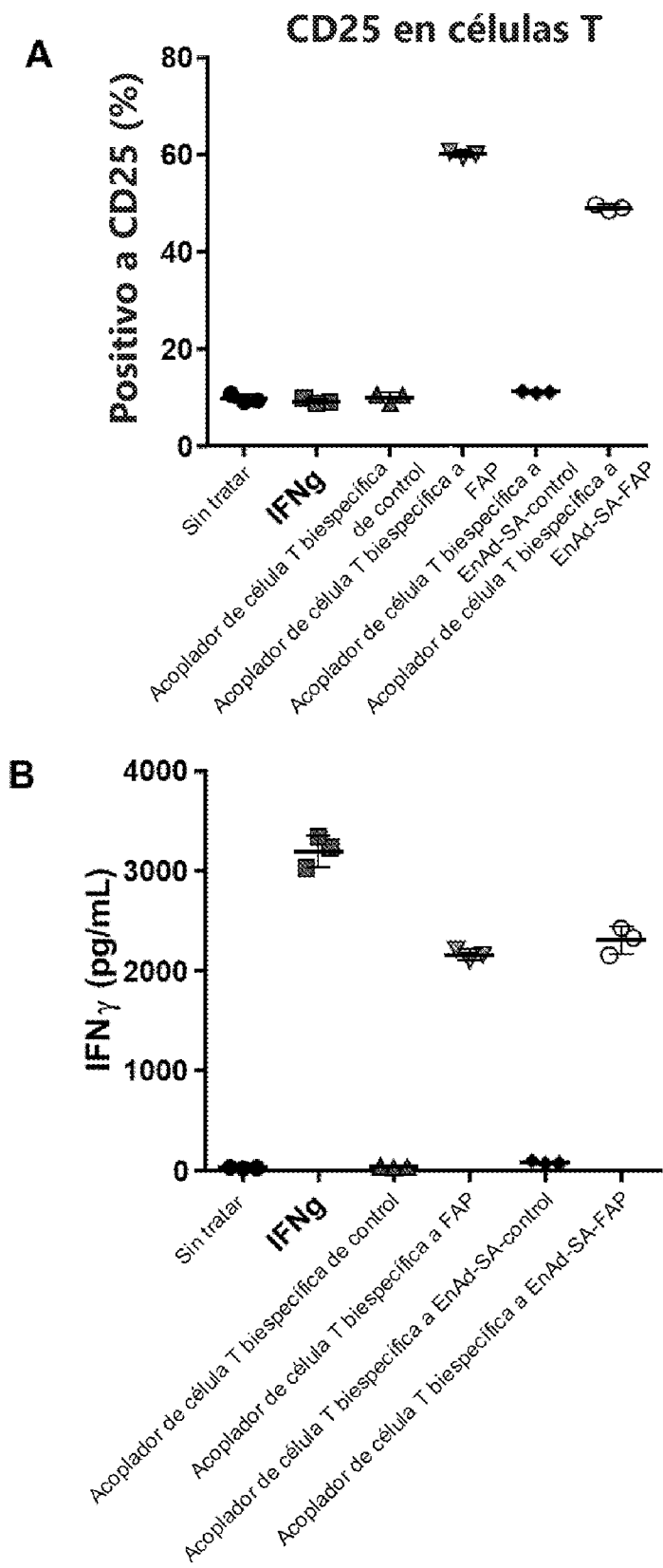
Figura 75

Figura 75

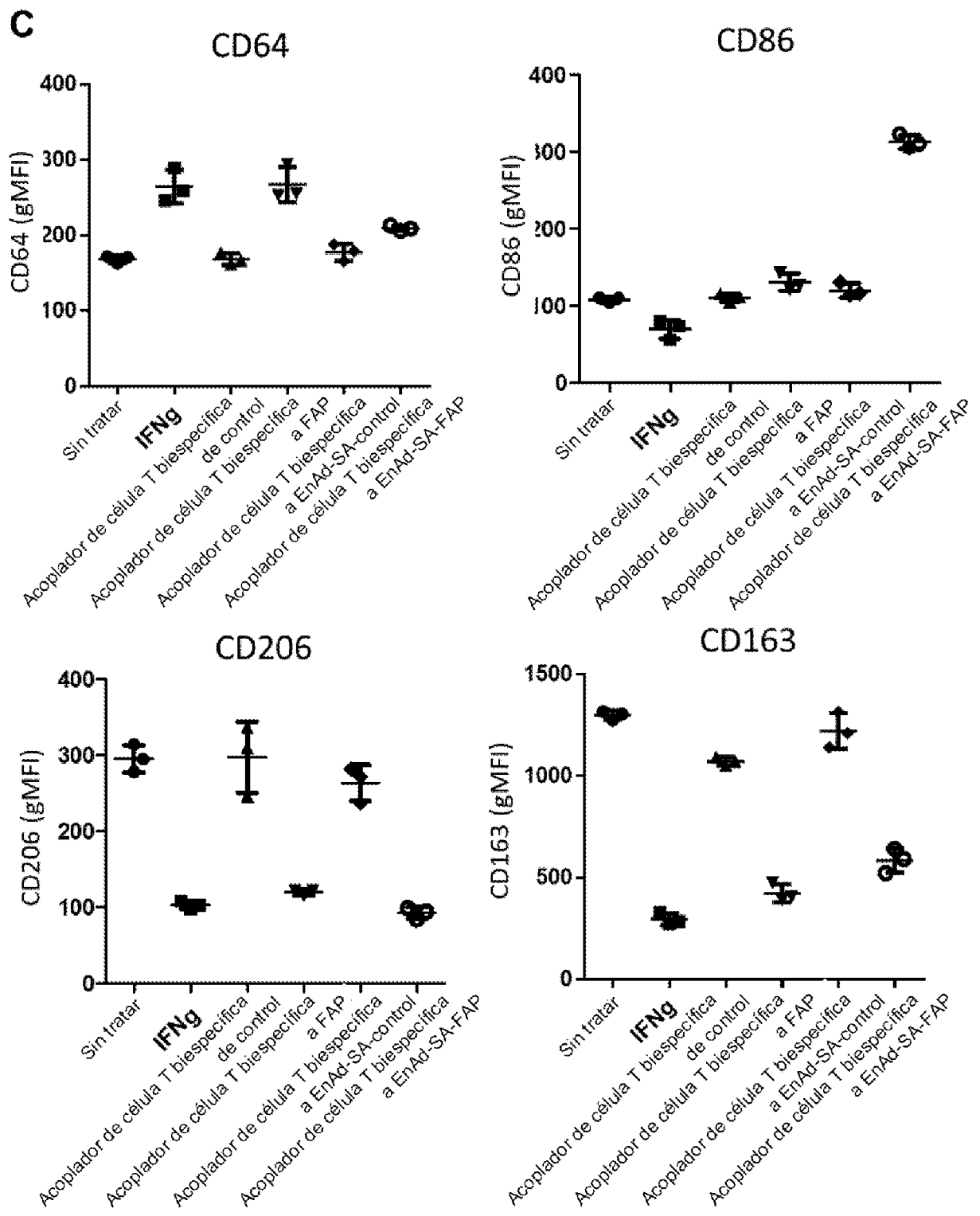
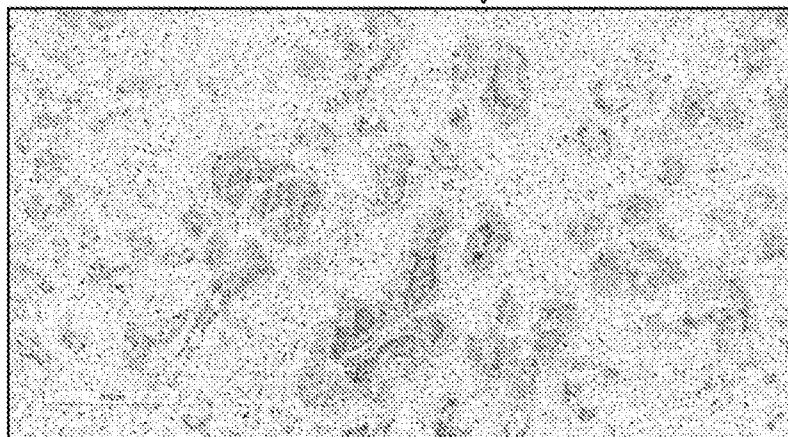


Figura 76

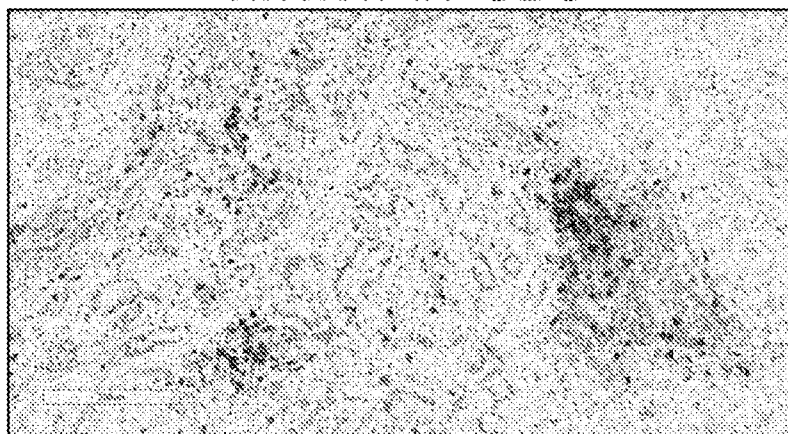
Tinción de EpCAM

A



Tinción de CD8

B



Tinción de FAP

C

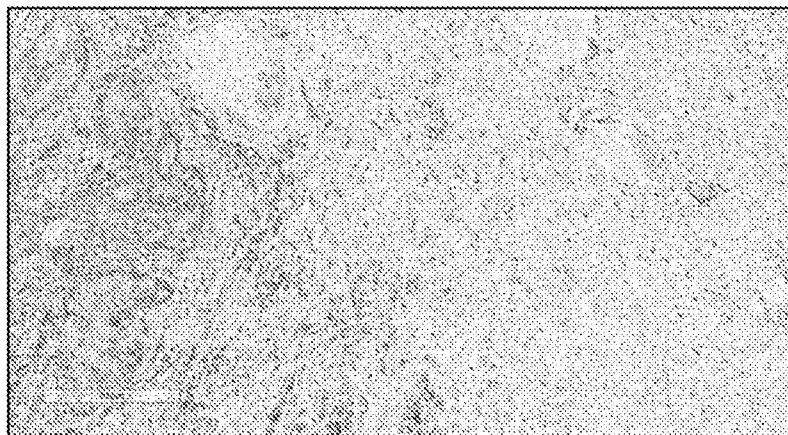
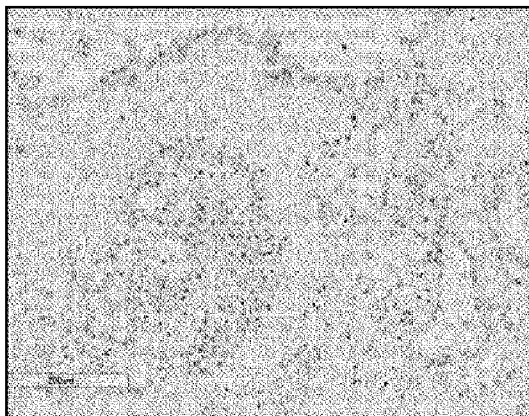


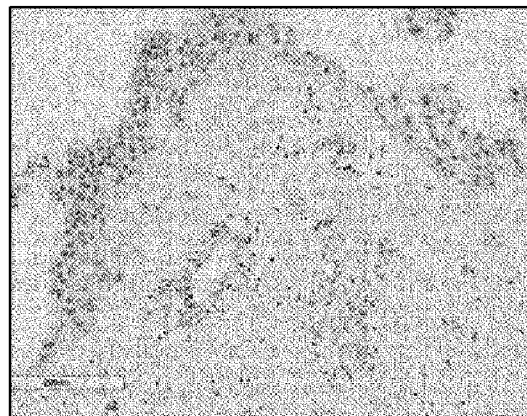
Figura 76

D

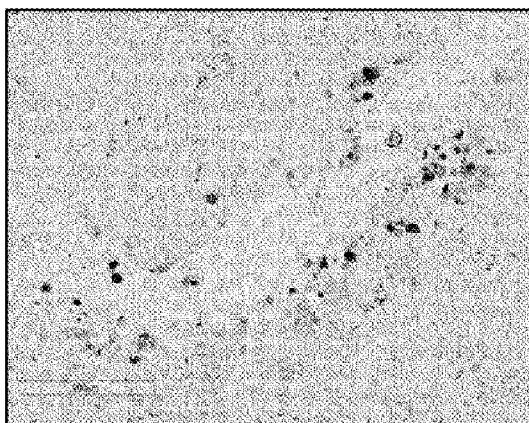
Sin tratar



Acoplador de célula T biespecífica a
EnAd-CMV-control



Acoplador de célula T biespecífica a
EnAd-CMV-FAP



Acoplador de célula T biespecífica a
EnAd-SA-FAP

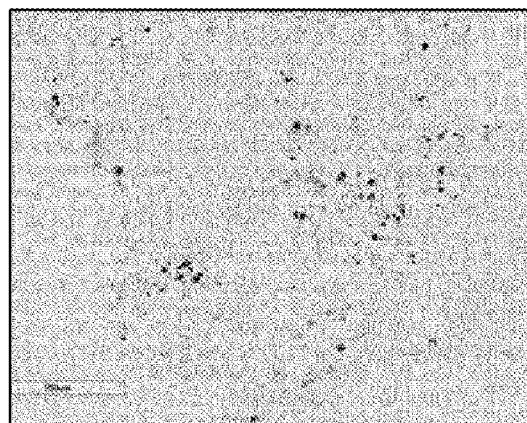


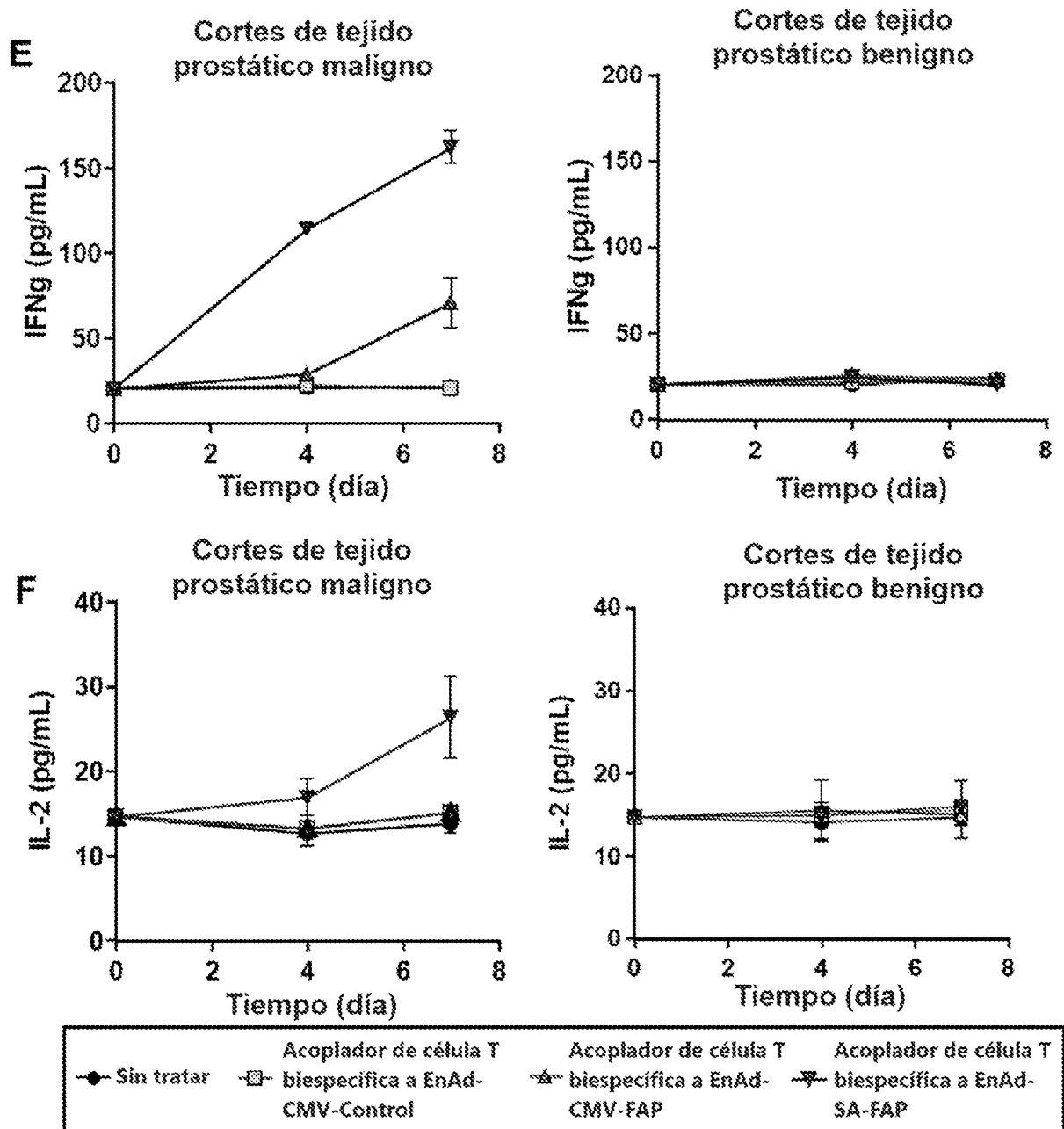
Figura 76

Figura 77

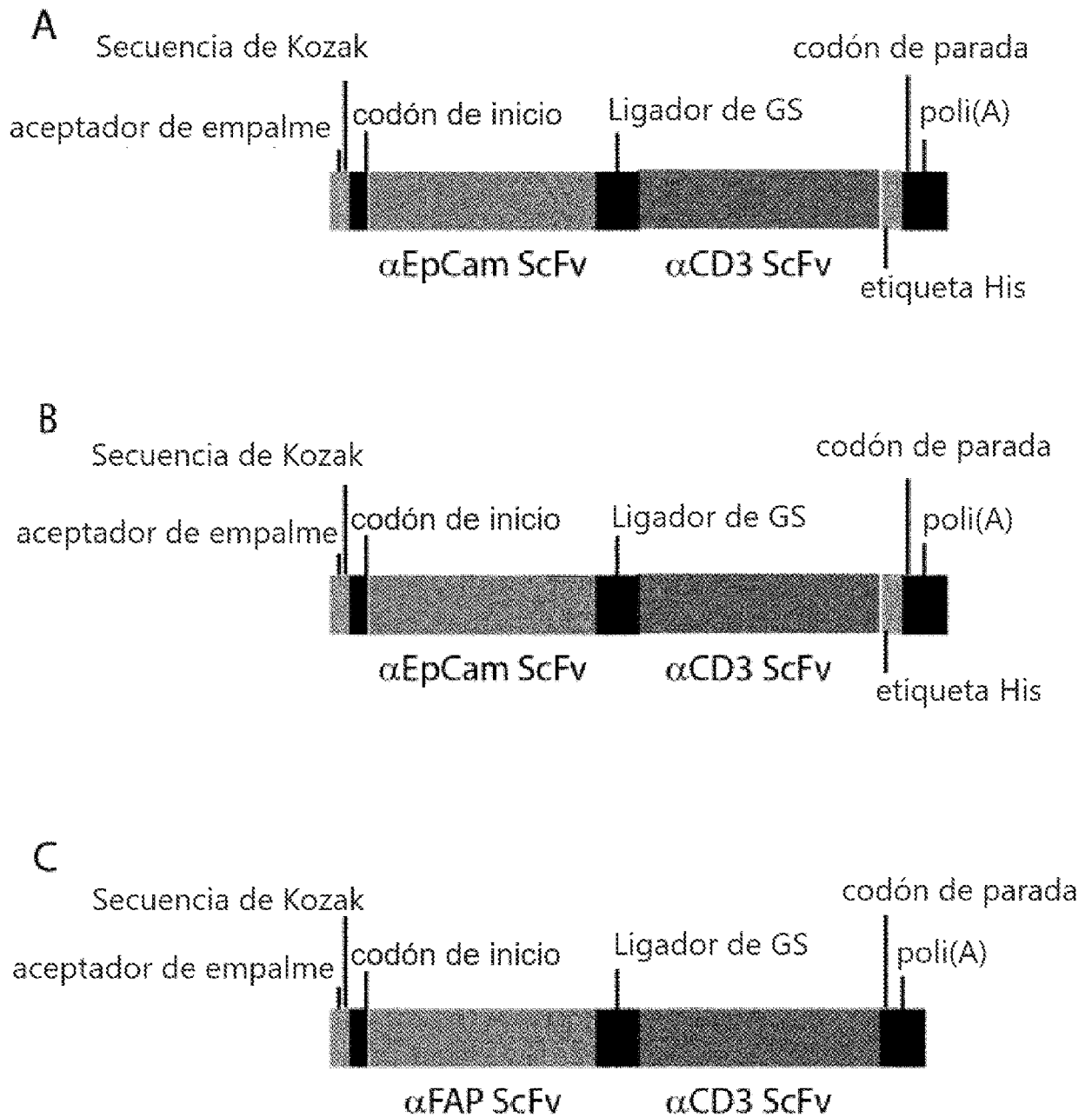


Figura 77D

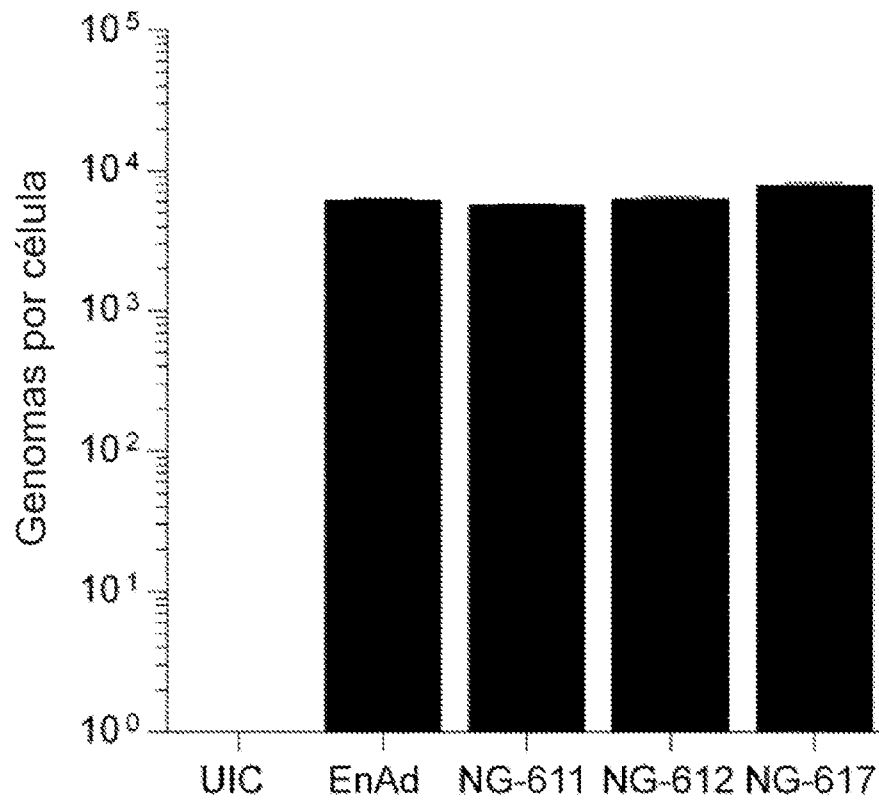


Figura 78

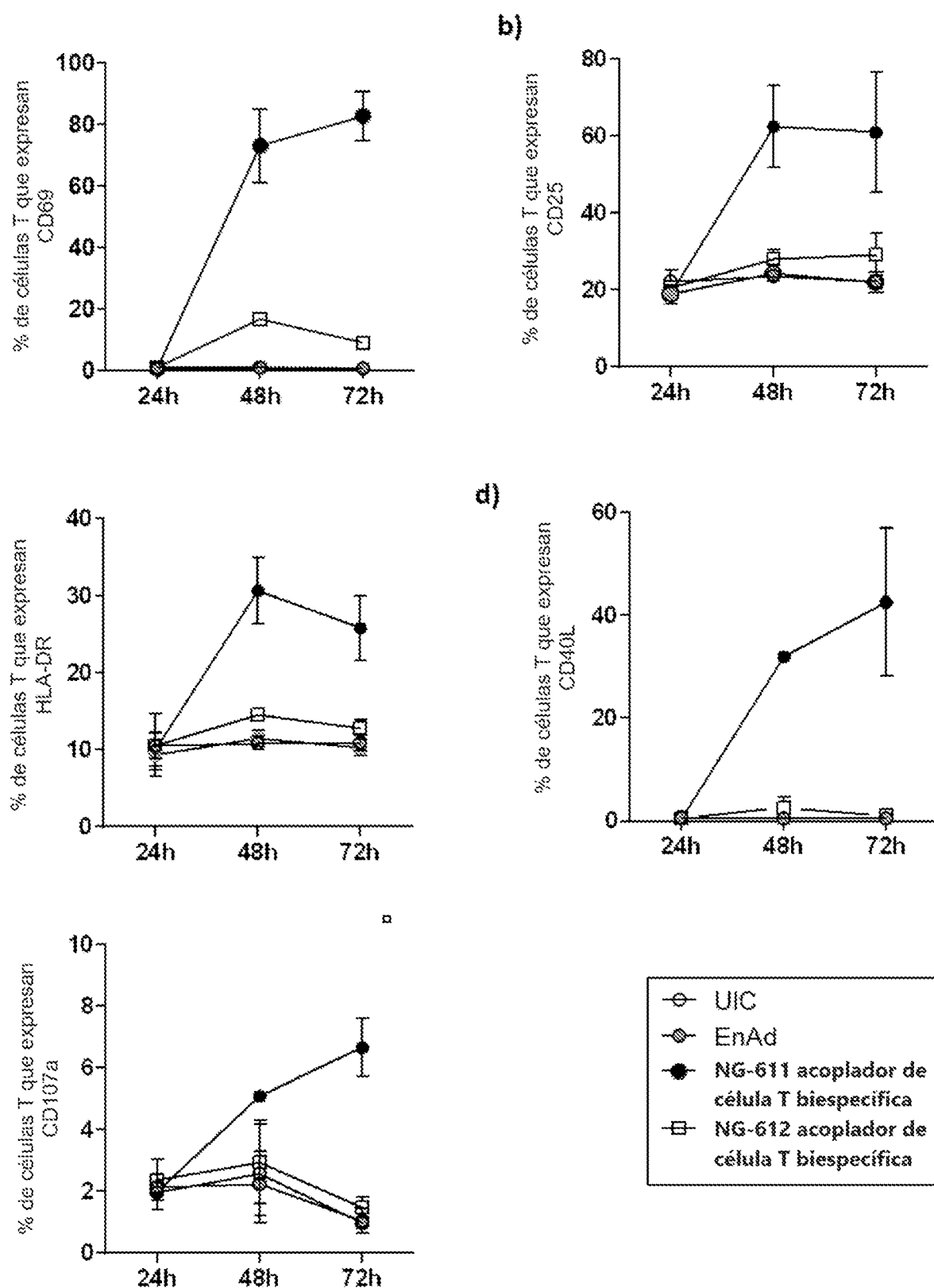


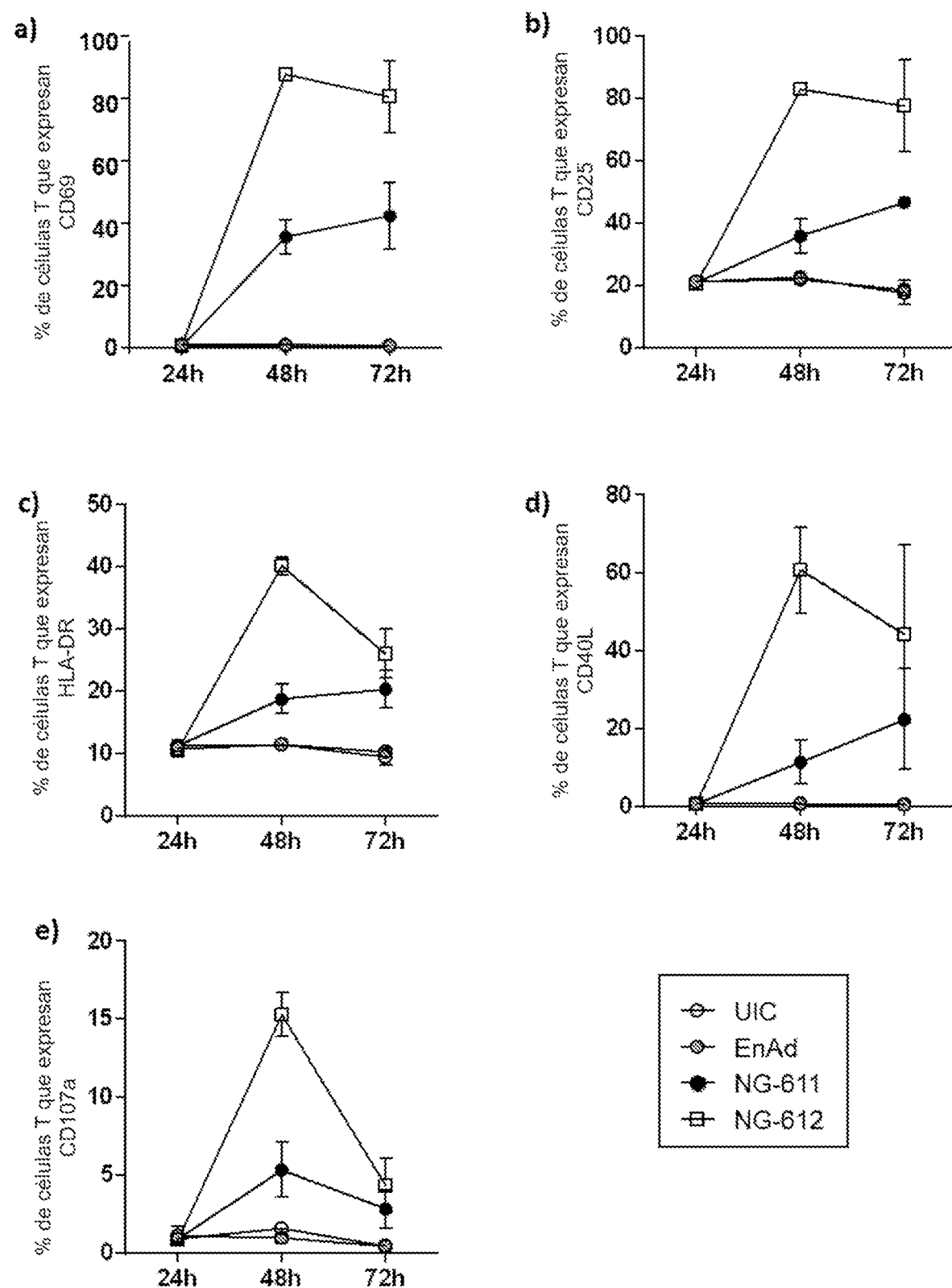
Figura 79

Figura 80

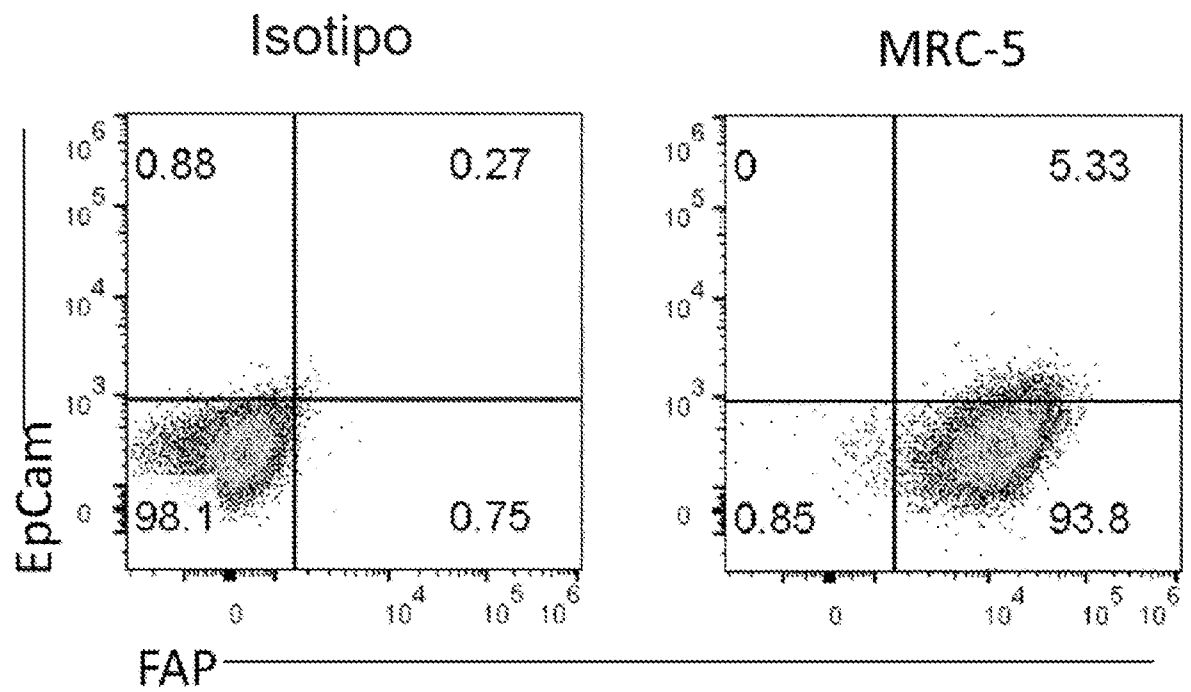


Figura 81A

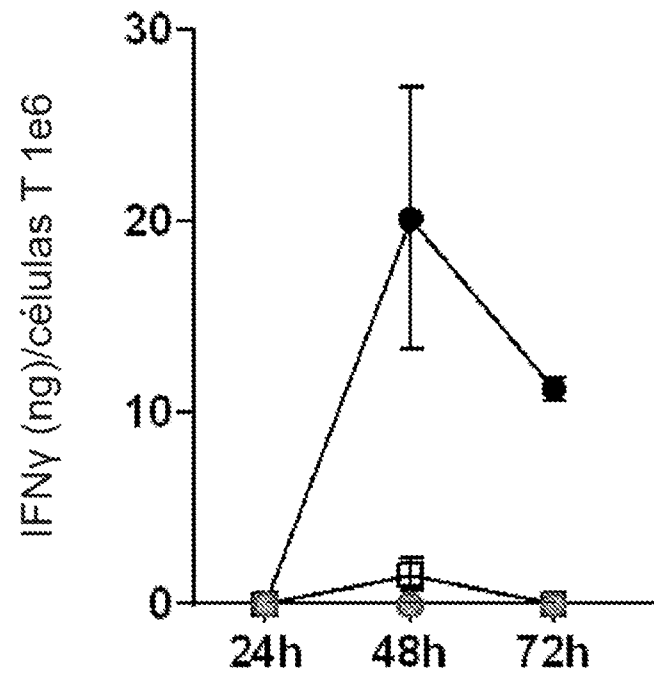


Figura 81B

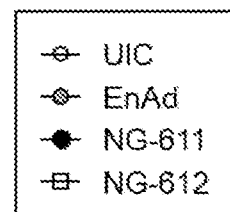
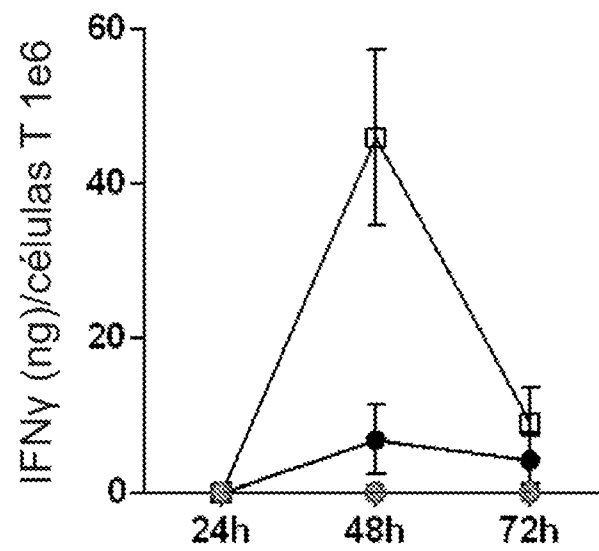
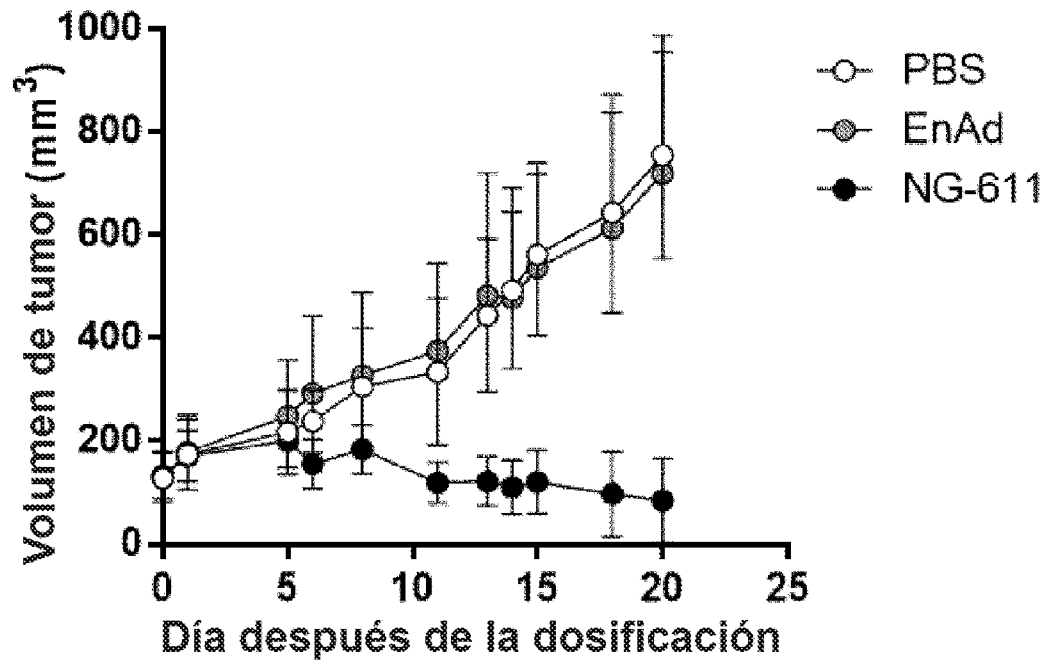


Figura 82

a)



b)

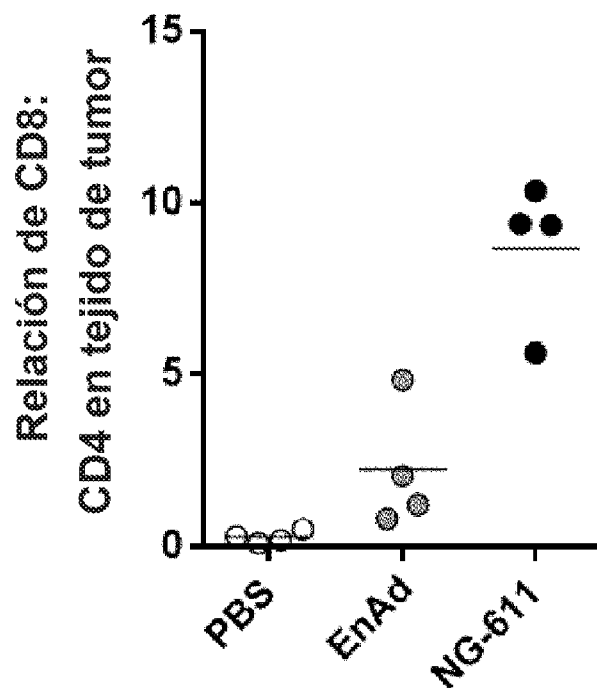


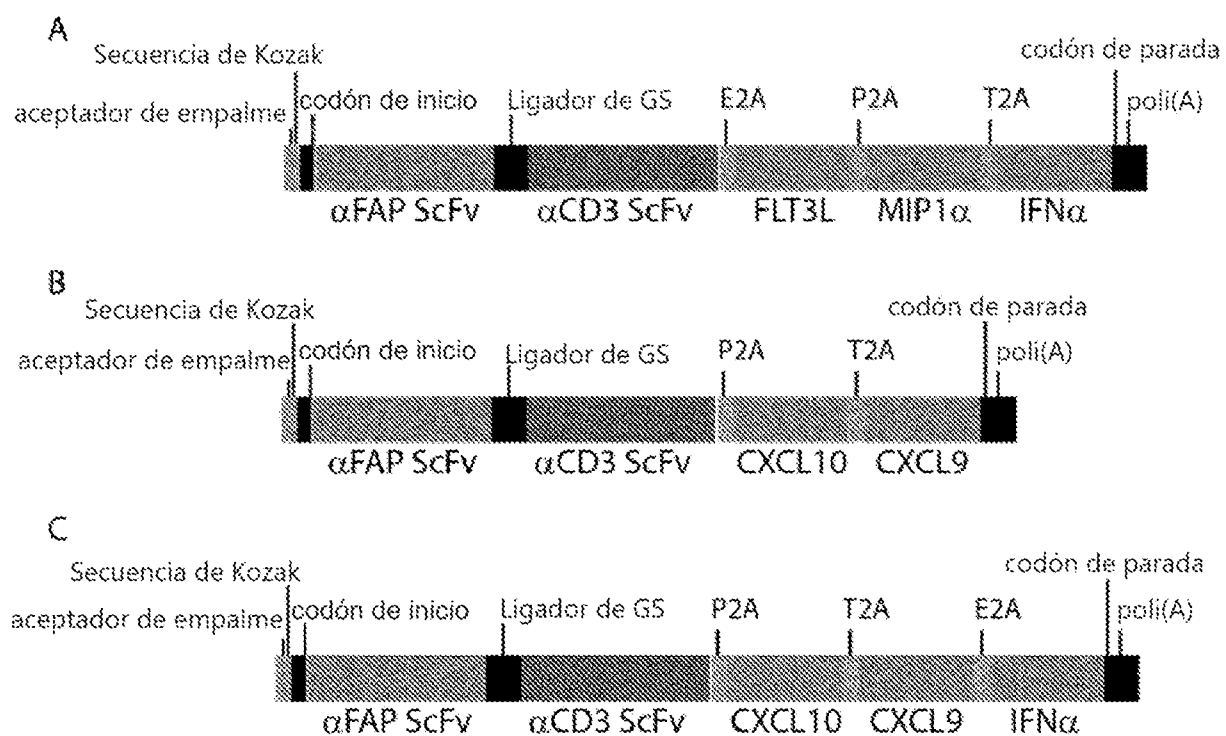
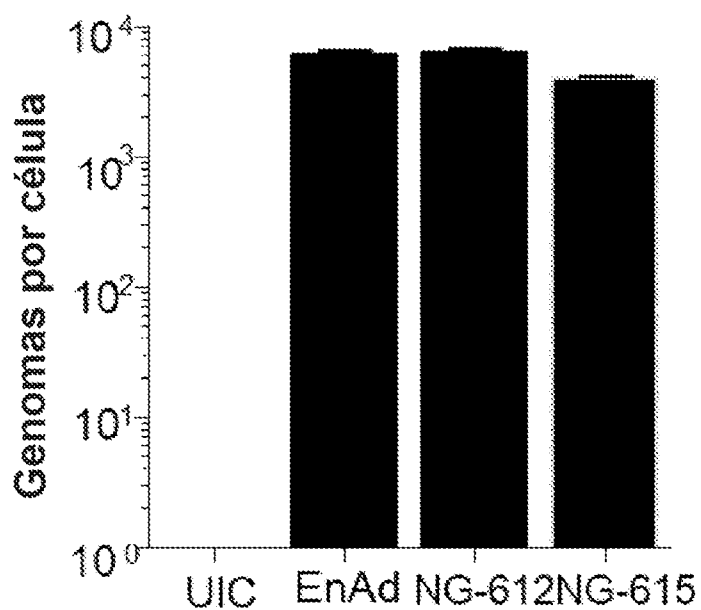
Figura 83**Figura 84**

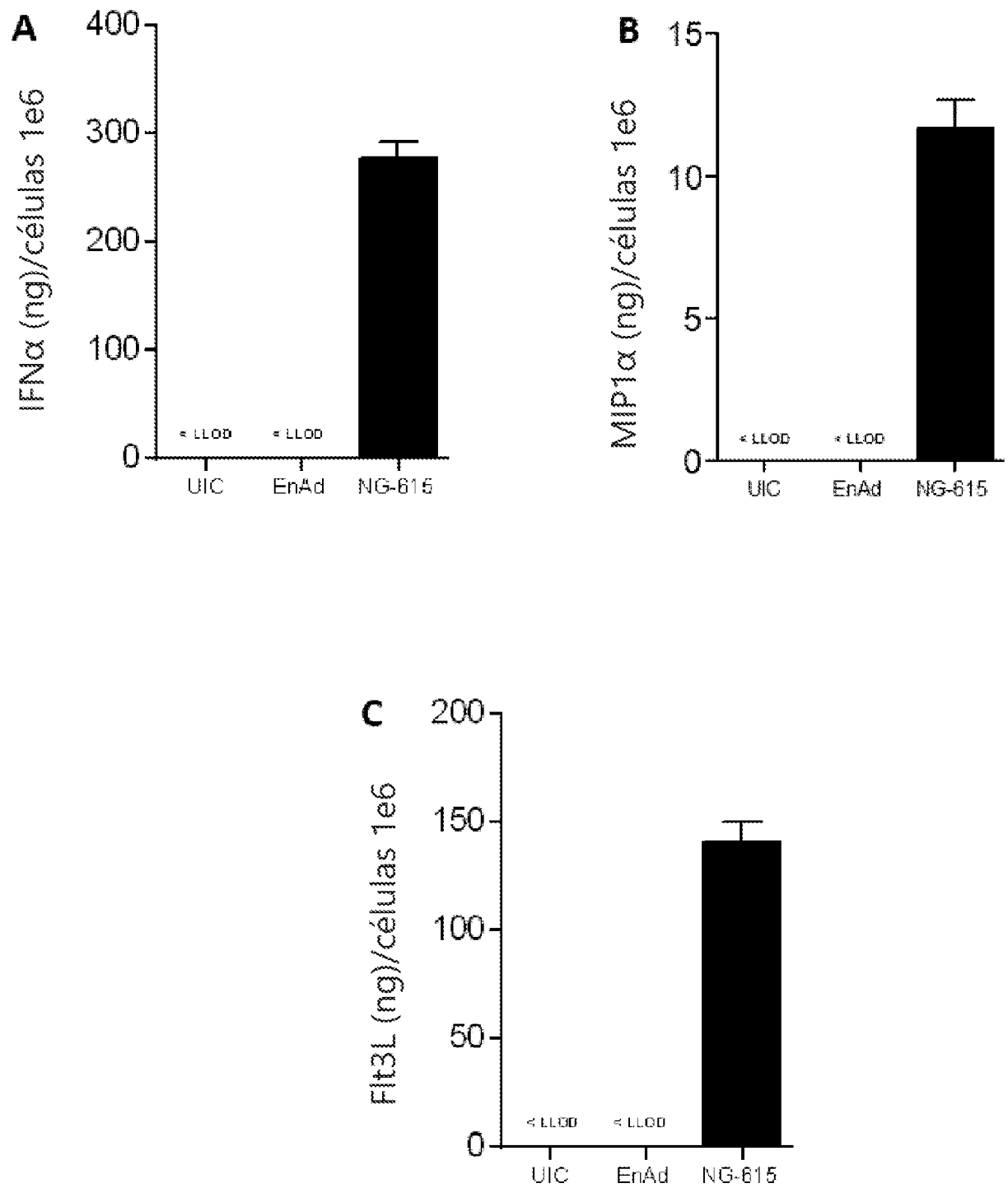
Figura 85

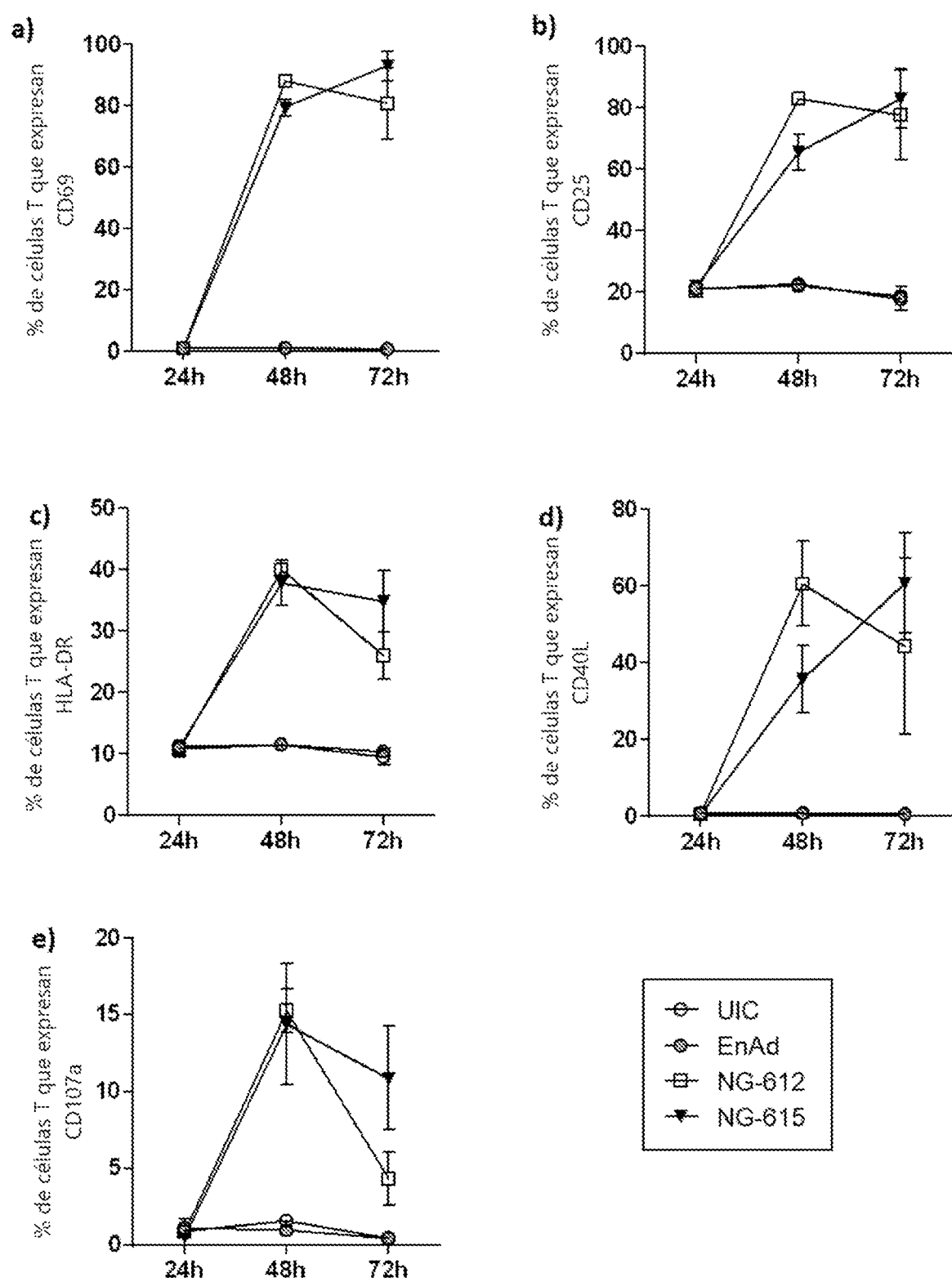
Figura 86

Figura 87

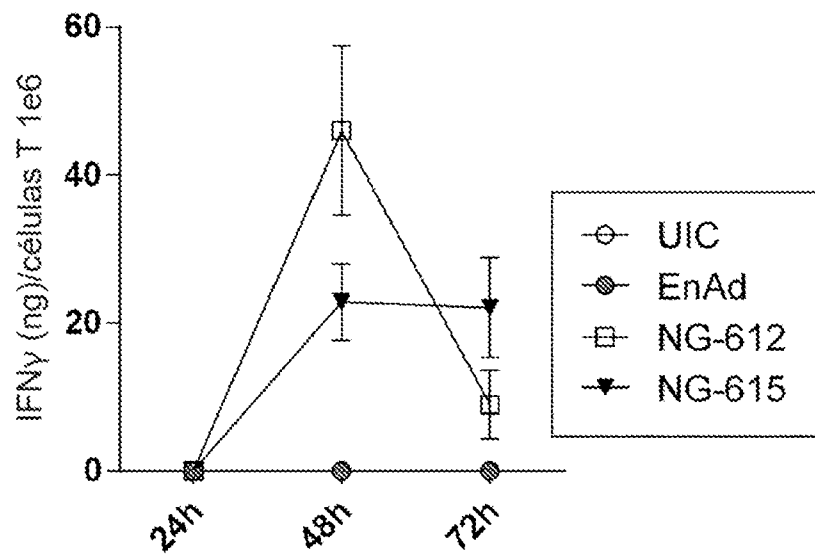


Figura 88

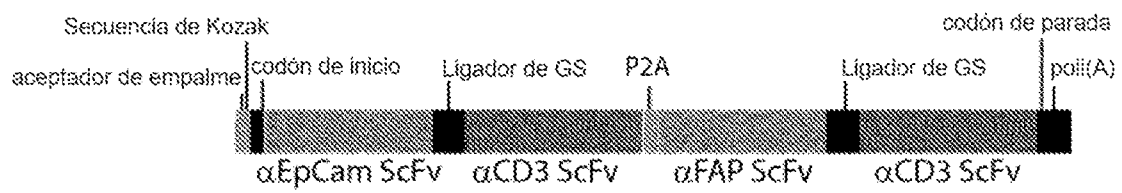


Figura 89

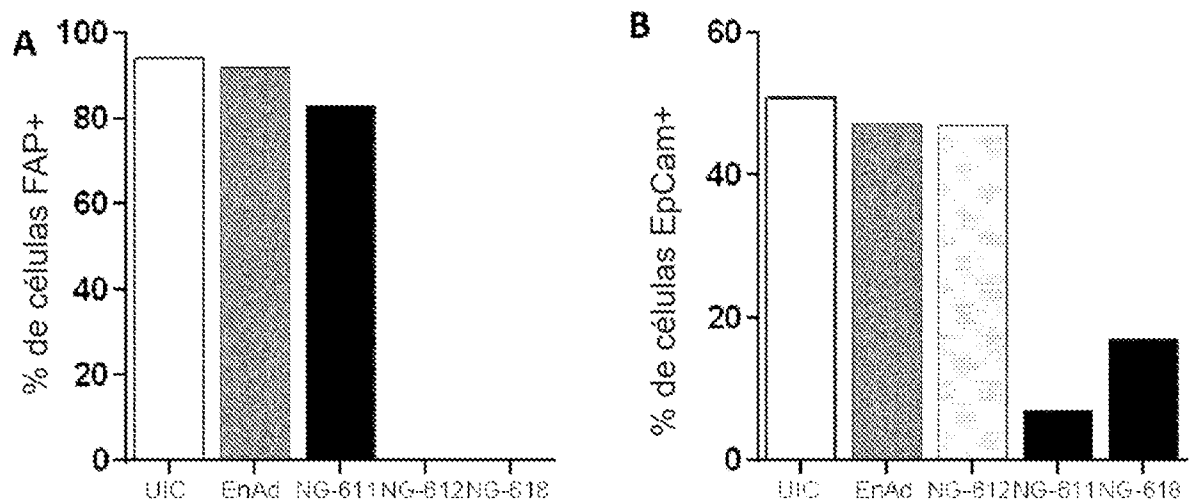


Figura 90

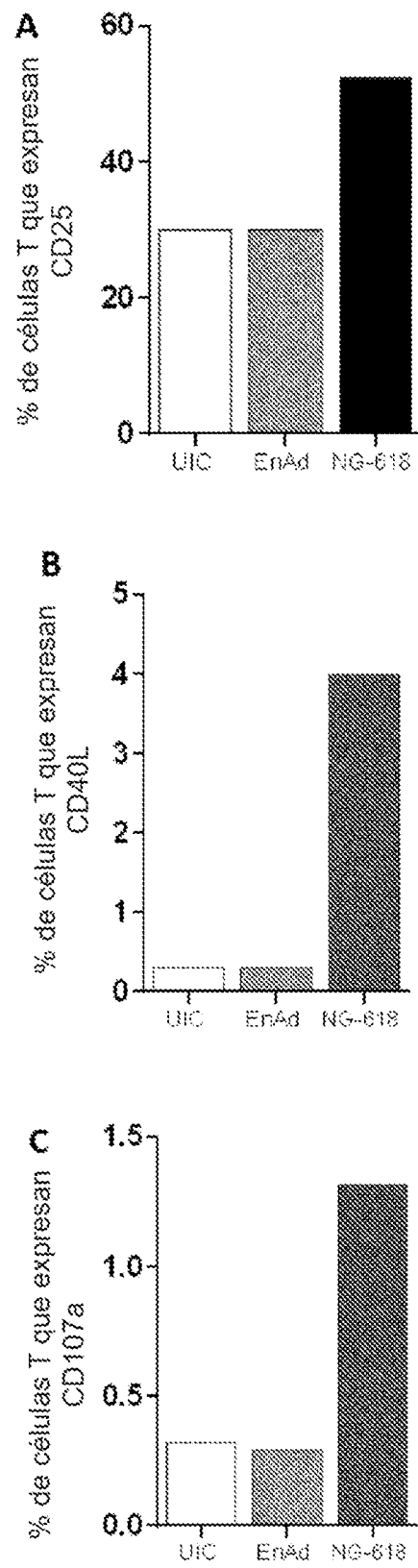


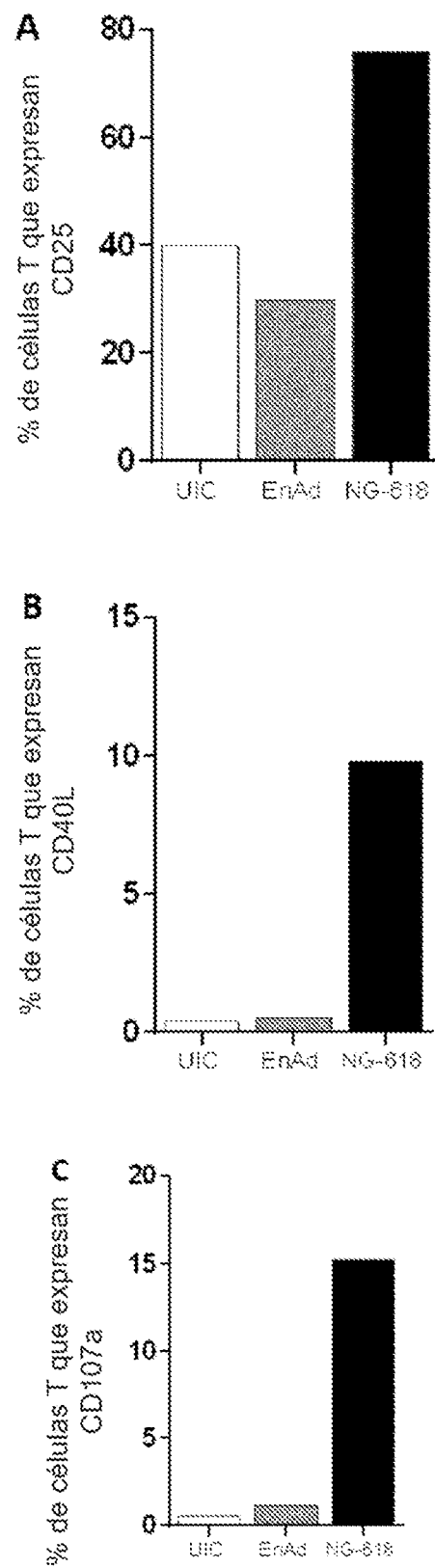
Figura 91

Figura 92