



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 1011445-9 B1

(22) Data do Depósito: 05/05/2010

(45) Data de Concessão: 04/10/2022



* B R P I 1 0 1 1 4 4 5 B 1 *

(54) Título: ADENOVÍRUS ONCOLÍTICOS PARA O TRATAMENTO DE CÂNCER

(51) Int.Cl.: A61K 48/00; C12N 15/861.

(30) Prioridade Unionista: 06/05/2009 ES P200901201.

(73) Titular(es): FUNDACIÓ INSTITUT D'INVESTIGACIÓ BIOMÈDICA DE BELLVITGE; INSTITUT CATALÀ D' ONCOLOGIA.

(72) Inventor(es): SONIA GUEDAN CARRIO; MANEL MARIA CASCALLO PIQUERAS; RAMON ALEMANY BONASTRE.

(86) Pedido PCT: PCT ES2010000196 de 05/05/2010

(87) Publicação PCT: WO 2010/128182 de 11/11/2010

(85) Data do Início da Fase Nacional: 07/11/2011

(57) Resumo: ADENOVÍRUS ONCOLÍTICOS PARA O TRATAMENTO DE CÂNCER A invenção se relaciona a um adenovírus oncolítico que compreende uma sequência que codifica uma enzima hialuronidase inserida no seu genoma. Este adenovírus distribui-se de forma mais eficiente pela massa do tumor e, conseqüentemente, o efeito oncolítico é aumentado. A injeção endovenosa do adenovírus oncolítico da invenção gera regressões no volume do tumor. Portanto, o adenovírus oncolítico da presente invenção é de utilidade para o tratamento de um câncer ou de um estado pré-maligno do mesmo.

ADENOVÍRUS ONCOLÍTICOS PARA O TRATAMENTO DE CÂNCER

A invenção se refere ao campo da medicina, com mais particularidade ao campo da oncologia, e especificamente à viroterapia.

5 Técnica anterior

O tratamento atual de câncer se baseia principalmente na quimioterapia, radioterapia e cirurgia. Apesar de uma taxa elevada de cura do câncer nos estágios iniciais, a maior parte dos casos de câncer avançados é
10 incurável, porque eles não podem ser extirpados cirurgicamente ou porque as doses de radio ou quimioterapia administradas são limitadas pela sua toxicidade em células normais. Para amenizar esta situação, desenvolveram-se estratégias de biotecnologia que buscam aumentar a potência
15 e a seletividade dos tratamentos oncológicos. Entre elas, a terapia genética e a viroterapia utilizam vírus com propósito terapêutico contra câncer. Na terapia genética, o vírus é modificado para prevenir a sua replicação e para servir como veículo ou vetor de material genético
20 terapêutico. Pelo contrário, a viroterapia utiliza vírus que se replicam e se propagam seletivamente nas células tumorais. Na viroterapia, a célula tumoral morre por meio do efeito citopático causado pela replicação do vírus no seu interior, em vez de pelo efeito de um gene terapêutico.
25 A replicação preferencial em uma célula tumoral é chamada de oncotropismo, e a lise do tumor é chamada de oncolise. Em um sentido estrito, os vírus que se replicam seletivamente em tumores são chamados oncolíticos, muito embora em um sentido mais amplo a palavra oncolítico possa
30 ser aplicada a qualquer vírus de replicação competente capaz de gerar a lise de células tumorais, mesmo sem seletividade. Nesta descrição, o termo oncolítico é usado nos dois sentidos.

A viroterapia do câncer é muito anterior à terapia genética. As primeiras observações das curas de tumores com vírus datam do início do século passado. Em 1912, De Pace obteve regressões de tumores depois da inoculação de vírus da raiva em carcinomas cervicais. Desde então, muitos tipos de vírus foram injetados em tumores para o seu tratamento. Existem vírus que exibem um oncotropismo natural, tais como parvovírus autônomo, vírus da estomatite vesicular, e reovírus. Outros vírus podem ser manipulados geneticamente para se replicarem seletivamente em tumores. Por exemplo, o vírus Herpes Simplex (HSV) tornou-se oncotrópico por meio da eliminação do gene da ribonucleotídeo redutase, uma atividade enzimática desnecessária nas células em proliferação ativa, tais como as células tumorais. Não obstante, o adenovírus, devido à sua baixa patogenicidade e alta capacidade de infectar células tumorais, tem sido o vírus utilizado com mais frequência na viroterapia e na terapia genética do câncer.

Cinquenta e um sorotipos humanos de adenovírus foram identificados e classificados em 6 grupos diferentes de A até F.

O adenovírus humano do tipo 5 (Ad5), que pertence ao grupo C, é um vírus formado por um capsídeo protéico icosaédrico que contém um DNA linear de 36 quilobases. Em adultos, a infecção com Ad5 é tipicamente assintomática, e nas crianças ela causa um resfriado comum e conjuntivite. De um modo geral, o Ad5 infecta as células epiteliais que, no decorrer de uma infecção natural são as células do epitélio brônquico. Ele entra na célula por meio da interação da fibra, a proteína viral que se estende como uma antena a partir dos doze vértices do capsídeo, com uma proteína celular envolvida na adesão intercelular

chamada Receptor de Cocksackie-Adenovírus (CAR). Quando o DNA viral chega ao interior do núcleo, ele inicia uma transcrição ordenada dos genes iniciais (E1 até E4) do vírus. Os primeiros genes virais que são expressos são os genes da região de início 1A (E1A). A E1A liga-se à proteína celular Rb para liberar E2F e ativar assim a transcrição de outros genes virais, tais como E2, E3, e E4, e dos genes celulares que ativam o ciclo celular. Por outro lado, a E1B se liga à p53 para ativar o ciclo celular e para impedir a apoptose da célula infectada. A E2 codifica as proteínas envolvidas na replicação do vírus; E3 codifica as proteínas que inibem a resposta imune antiviral; E4 codifica as proteínas envolvidas no transporte de RNA viral. A expressão dos genes iniciais conduz à replicação do DNA do vírus, e uma vez que este foi replicado, é ativado o promotor tardio que conduz à expressão de um transcrito de RNA mensageiro, que por splicing gera todos os RNAs que codificam as proteínas estruturais que formam o capsídeo.

Existem dois aspectos importantes a se considerar em relação à concepção dos adenovírus oncolíticos: seletividade e potência. Para obter-se seletividade na célula tumoral utilizaram-se três estratégias: a eliminação das funções virais que são necessárias para a replicação em células normais, mas que não são necessárias nas células tumorais; o controle dos genes virais que iniciam a replicação, utilizando-se promotores seletivos de tumores; e a modificação das proteínas do capsídeo viral implicadas na infecção da célula hospedeira. Com estas modificações genéticas, obteve-se um nível considerável de seletividade, com uma eficácia de replicação nas células tumorais da ordem de 10000 vezes superior à capacidade de replicação em células normais. Com relação à potência

oncolítica, diversas modificações genéticas também foram descritas para aumentar a mesma. Estas modificações incluem: a) o aumento da liberação de vírus, por exemplo, por meio de eliminação de E1B19K, super-expressão de E3-11.6K (ADP), ou realocação da proteína E3/19K na membrana plasmática; e b) a inserção de um gene terapêutico no genoma do adenovírus oncolítico para gerar um "adenovírus oncolítico armado". Neste caso, o gene terapêutico terá de mediar a morte das células tumorais não infectadas por meio da ativação de um pró-fármaco com efeito adjacente (quer dizer, que mata as células vizinhas não infectadas), a ativação do sistema imune contra o tumor, a indução da apoptose, a inibição da angiogênese, ou a eliminação da matriz extracelular, entre outras. Nestes casos, a maneira e o tempo de expressão do gene terapêutico serão críticos no resultado final da abordagem terapêutica.

Na última década, diferentes adenovírus oncolíticos foram administrados a pacientes com tumores da cabeça e pescoço, ovários, cólon retais, pancreáticos, e carcinomas hepatocelulares, entre outros. O perfil de segurança destes adenovírus nos ensaios clínicos foi muito promissor. Os efeitos prejudiciais detectados, tais como alguns sintomas semelhantes à gripe e aumento dos níveis de transaminases, foram bem tolerados, mesmo depois da administração sistêmica de altas doses de vírus (cfr. D. Ko et al., "Development of transcriptionally regulated oncolytic adenoviruses", Oncogene 2005, vol. 24, pp. 7763-74; e T. Reid et al., "Intravascular adenoviral agents in cancer patients: lessons from clinical trials", Cancer Gene Therapy 2002, vol. 9, pp. 979-86). Embora a administração dos adenovírus recombinantes induzisse uma supressão parcial do crescimento do tumor, a erradicação completa dos tumores não foi obtida e depois de um curto período de

tempo os tumores voltaram a crescer rapidamente. Estes resultados ocorreram provavelmente porque o adenovírus injetado distribuiu-se somente em uma pequena parte do tumor para produzir uma resposta antitumoral limitada, de modo que as células não infectadas continuaram a crescer rapidamente. Em um trabalho recente, observou-se que a replicação dos adenovírus oncolíticos em tumores xenógrafos humanos persistiu até 100 dias depois da administração sistêmica, muito embora esta replicação não se traduzisse em uma erradicação completa do tumor (cfr. H. Sauthoff et al., "Intratumoral spread of wild-type adenovirus is limited to after local injection of human xenograft tumors: virus persists and spreads systemically at late time points", Human Gene Therapy 2003, vol. 14, pp. 425-33). Esta baixa eficácia antitumoral se dá em parte porque o tecido conectivo e a matriz extracelular (ECM) presentes na célula tumoral impedem a correta distribuição dos adenovírus recombinantes pelo tumor.

Esta dificuldade dos adenovírus oncolíticos se distribuírem eficientemente pela massa tumoral também foi descrita para outros fármacos antitumorais, tais como doxorubicina, taxol, vincristina, ou metotrexato. São muitos os estudos que demonstram a função da ECM na resistência das células tumorais aos fármacos de quimioterapia (cfr. BP Toole et al., "Hyaluronan: a constitutive regulator of chemoresistance and malignancy in cancer cells", Seminars in cancer biology 2008, vol. 18, pp. 244-50). As células tumorais e estromais produzem e montam uma matriz de colágenos, proteoglicanos e outras moléculas que dificultam o transporte de macromoléculas para dentro do tumor. O ácido hialurônico (HA) é um dos componentes principais da ECM envolvidos na resistência das células tumorais aos fármacos terapêuticos. O HA é super-

expresso em uma grande variedade de tecidos malignos, e em muitos casos, os níveis de HA são um fator prognóstico da progressão tumoral. A interação de HA com os receptores CD44 e RHAMM aumenta a sobrevivência do tumor e a invasão.

- 5 Além disso, o HA pode promover metástases tumorais pela indução de aderência e migração de células, e proteção contra o sistema imune.

Por outro lado, a inibição das interações entre o ácido hialurônico e as células tumorais revertem a
10 resistência à grande quantidade de fármacos. Diferentes estudos realizados indicaram que as hialuronidases (enzimas que degradam o HA) aumentam a atividade de diferentes quimioterapias em pacientes com melanoma, sarcoma de Kaposi, tumores da cabeça e do pescoço, e metástases
15 hepáticas do cólon. O mecanismo de ação das hialuronidases ainda é desconhecido, sendo que de uma maneira geral ele é atribuído à diminuição das barreiras de aderência celular, uma diminuição da pressão intersticial, e uma melhora na penetração do fármaco anticancerígeno no tumor, mais que a
20 seus efeitos inibitórios das vias de sinalização relacionadas com a sobrevivência celular.

Recentemente, descreveu-se que a co-administração de hialuronidase com adenovírus oncolíticos por meio de injeção intratumoral reduz a progressão tumoral (cfr. S.
25 Ganesh et al., "Intratumoral coadministration of hialuronidase enzyme and oncolytic adenoviruses enhances virus potency in metastatic tumor models", Clin Cancer Res 2008, vol. 14, pp. 3933-41). Nestes estudos, os adenovírus oncolíticos são administrados em quatro injeções
30 intratumorais e a hialuronidase é administrada de forma intratumoral a cada dois dias durante todo o tratamento. Este regime de administração tem pouca aplicação para os pacientes, porque a maioria dos tumores são inacessíveis

para ser injetada de forma intratumoral. Tampouco os pacientes com doença disseminada (metástase) poderiam se beneficiar do tratamento proposto por Ganesh e colaboradores.

- 5 Apesar dos esforços até agora, ainda é necessário descobrir novas abordagens terapêuticas que sejam efetivas no tratamento do câncer.

Sumário da Invenção

- 10 Os inventores descobriram que um adenovírus que se replica e que contém o gene da hialuronidase no seu genoma é distribuído mais eficientemente na massa tumoral. A expressão da hialuronidase por parte do adenovírus oncolítico resulta na degradação do ácido hialurônico que é parte da matriz extracelular do tumor. A degradação do
- 15 ácido hialurônico resulta em uma diminuição da pressão intersticial no tumor e em uma resistência menor do tumor à distribuição do adenovírus, de modo que se melhora a distribuição do vírus de célula para célula pela massa tumoral. Esta melhor distribuição se traduz em um aumento
- 20 do efeito oncolítico. Os inventores descobriram que injetando o adenovírus oncolítico da invenção de forma endovenosa, são obtidas regressões do volume do tumor. Por essa razão, o adenovírus oncolítico da presente invenção é de utilidade para o tratamento do câncer. Além disso, a
- 25 expressão do gene da hialuronidase não afeta nem a replicação viral nem a citotoxicidade do adenovírus oncolítico.

- 30 Tal como mencionado anteriormente, descreveu-se que a co-administração intratumoral de um adenovírus oncolítico e hialuronidase solúvel aumenta a eficácia antitumoral do adenovírus oncolítico. Não obstante, anteriormente à presente invenção o gene da hialuronidase não havia sido introduzido em qualquer adenovírus

oncolítico para o tratamento do câncer.

Tal como se encontra descrito nos exemplos, a administração intratumoral *in vivo* do adenovírus oncolítico da invenção aperfeiçoa o efeito antitumoral com relação a um controle de adenovírus sem a hialuronidase inserida (vide a Figura 7). Porém, quando o adenovírus oncolítico da invenção é injetado de forma endovenosa (vide Figura 8 e Figura 9) e, em comparação aos resultados apresentados na Figura 2 do manuscrito de Ganesh et al., observa-se uma inibição de crescimento de tumor muito maior com o adenovírus da presente invenção, o que indica que o tratamento da invenção é mais eficiente. Os tumores dos camundongos injetados com o adenovírus oncolítico da invenção (ICOVIR17) mostram áreas necróticas muito extensas, áreas com células viáveis muito reduzidas, e grandes e numerosos focos de replicação viral, em comparação com os tumores injetados com o controle de adenovírus, ICOVIR15.

Além disso, com o adenovírus da invenção as doses administradas são menores: em Ganesh et al. (supra) quatro injeções intratumorais de 1×10^{10} partículas virais são administradas, enquanto que na presente invenção é administrada uma única dose endovenosa de 2×10^9 partículas virais. Isto significa uma redução da dose de 20 vezes, e a vantagem de se tratar de uma dose única. Na sua abordagem, Ganesh et al. administram hialuronidase de forma intratumoral de dois em dois dias durante toda a experiência. Além disso, o adenovírus também é administrado de forma intratumoral no início do tratamento. Esta administração intratumoral do vírus e hialuronidase é dificilmente aplicável à clínica, pelo fato de que a maior parte dos tumores não são acessíveis para uma administração intratumoral. Presumivelmente, a co-administração de

hialuronidase solúvel e adenovírus não foi realizada por uma via sistêmica, porque a probabilidade de que os dois componentes alcancem conjuntamente as células tumorais disseminadas no organismo é baixa.

5 A presente invenção permite a expressão da hialuronidase no local e no momento em que ocorre a replicação viral. Esta expressão de hialuronidase melhora a distribuição do vírus pela massa tumoral, e aumenta a sua potência antitumoral. É viável administrar doses
10 ajustadas, não tóxicas para o animal e com uma grande eficácia no tratamento.

Na presente invenção, os adenovírus oncolíticos chegam às células tumorais alvo, uma vez no interior se replicam, expressam as proteínas de capsídeo e, ao mesmo
15 tempo, a hialuronidase codificada no genoma adenoviral é expressa. Esta hialuronidase foi modificada para ser liberada para o meio extracelular que envolve as células. No meio extracelular, a hialuronidase destrói a matriz e ajuda os adenovírus que foram replicados na infecção das
20 células tumorais vizinhas.

Desta maneira, um aspecto da invenção se refere a um adenovírus oncolítico que compreende uma sequência que codifica uma enzima de hialuronidase inserida no seu genoma.

25 Tal como é usado neste contexto, o termo "adenovírus oncolítico" significa um adenovírus que é capaz de replicar-se ou que é competente para replicação na célula tumoral. Nesta descrição, adenovírus oncolítico e adenovírus replicativo são sinônimos. Eles se diferenciam
30 de um adenovírus não replicativo, porque este último é incapaz de se replicar na célula alvo. Os adenovírus não replicativos são aqueles usados na terapia genética como veículos de genes para as células alvo, uma vez que a meta

é expressar o gene terapêutico dentro da célula intacta e não a lise da célula. Em vez disso, a ação terapêutica dos adenovírus oncolíticos se baseia precisamente na capacidade de se replicar e lisar a célula alvo, e em particular a
5 célula tumoral que se quer eliminar.

Outro aspecto da invenção se refere a uma composição farmacêutica que compreende uma quantidade terapeuticamente efetiva do adenovírus oncolítico, em conjunto com veículos ou excipientes farmacêuticamente
10 aceitáveis.

Outro aspecto da invenção se refere ao adenovírus oncolítico da invenção para o seu uso como um medicamento.

Outro aspecto da invenção se refere ao adenovírus oncolítico da invenção para o tratamento de um câncer ou
15 um estado pré-maligno do mesmo em um mamífero, incluindo um ser humano.

Outro aspecto da invenção se refere ao uso do adenovírus oncolítico para a fabricação de um medicamento destinado ao tratamento de um câncer ou um estado pré-
20 maligno do mesmo em um mamífero, incluindo um ser humano. O tratamento é baseado na replicação destes adenovírus oncolíticos em tumores. Alternativamente, este aspecto da invenção pode ser formulado como um método para o tratamento em um mamífero, incluindo o homem, de um câncer
25 ou um estado pré-maligno do mesmo, que compreende a administração ao mamífero de uma quantidade efetiva do adenovírus oncolítico.

Outro aspecto da invenção se refere a um vetor de transporte que é capaz de recombinar-se com um genoma
30 adenoviral para a construção do adenovírus oncolítico da invenção. Este vetor compreende sequências repetidas terminais invertidas sequências adenovirais ("inverted terminal repeats", ITRs), uma sequência que promove a

expressão da sequência que codifica a enzima hialuronidase, a sequência que codifica a enzima, e uma sequência de poliadenilação.

De acordo com uma modalidade particular, o
5 adenovírus oncolítico da invenção é um adenovírus humano, ou seja, que infecciona seres humanos. Particularmente, o adenovírus humano é selecionado a partir do grupo que consiste dos sorotipos 1-51 do adenovírus humano e os seus derivados. Entende-se como "derivado" um adenovírus
10 recombinante híbrido de dois ou mais sorotipos diferentes de adenovírus, por exemplo, adenovírus de sorotipo 5 com a fibra do adenovírus de sorotipo 3. Em uma modalidade particular da invenção, o adenovírus oncolítico humano é do sorotipo 5.

15 As hialuronidases são compreendidas por uma família de enzimas que degradam o ácido hialurônico. Em seres humanos existem 6 genes que codificam as hialuronidases com diferentes propriedades e localizações. As isoformas Hyal1 e Hyal2 estão presentes na maior parte
20 dos tecidos, sendo que a Hyal1 constitui a forma predominante no plasma humano. A Hyal3 está presente na medula óssea e testículos, mas a sua função não é bem caracterizada. A hialuronidase PH20 é altamente expressa nos testículos e está envolvida no processo de fertilização
25 do ovócito pelo espermatozóide. A hialuronidase PH20 é ancorada à membrana plasmática e à membrana acrossômica interna dos espermatozóides, e confere ao espermatozóide a capacidade de penetrar através da matriz extracelular do cumulus (rico em ácido hialurônico) para alcançar a zona
30 pelúcida do ovócito. Durante a reação acrossômica, parte das hialuronidases ancoradas na membrana do espermatozóide é processada enzimaticamente para produzir uma forma solúvel da proteína, que é liberada a partir da membrana

acrossômica. Além disso, a hialuronidase foi identificada como o fator de dispersão do veneno de cobras, aranhas, escorpiões e marimbondos.

Em uma modalidade particular, a enzima hialuronidase é uma hialuronidase testicular de mamífero, e mais particularmente, hialuronidase testicular humana. A hialuronidase testicular humana (GenBank GeneID: 6677) também é conhecida como SPAM1, ou molécula de adesão do espermatozóide 1 ("sperm adesion molecule 1"), e PH-20. A proteína de membrana PH20 é a única enzima da família das hialuronidasas de mamífero com atividade sob pH neutro. O gene que o codifica produz duas variantes de transcrição: variante 1, mais longa, que codifica a isoforma 1 da proteína (número de acesso do GenBank NP_003108.2) e variante 2, que utiliza um splicing alternativo na região codificante 3' comparado com a variante 1, resultando em uma isoforma 2 com uma extremidade C-terminal mais curta (número de acesso do GenBank NP_694859.1).

Em uma modalidade particular da invenção, a sequência da enzima tem eliminada a sequência correspondente ao domínio carbóxiterminal de ligação à para que a enzima seja solúvel (vide Figura 2). A eliminação deste domínio carbóxiterminal resulta na secreção da hialuronidase para o meio extracelular. Desta forma, obteve-se um adenovírus oncolítico que expressa uma hialuronidase secretada com atividade enzimática em pH neutro. Em uma modalidade particular, a sequência inserida no genoma adenoviral é uma que codifica a SEQ ID NO: 1. Em uma modalidade mais particular, a sequência inserida é a SEQ ID NO: 2.

Em outra modalidade, a sequência da enzima é inserida no adenovírus oncolítico depois da sequência de nucleotídeos da fibra adenoviral.

Em outra modalidade particular, a expressão da enzima é controlada por meio de um promotor ativo nas células animais. Particularmente, o promotor é selecionado dentre grupo que consiste em promotor de citomegalovírus, 5 promotor principal tardio de adenovírus, promotor de SV40, promotor de timidina quinase de vírus herpes simplex, promotor de RSV, promotor EF1 alfa, promotor de beta-actina, promotor de IL-2 humana, promotor de IL-4 humana, promotor de IFN, promotor de E2F e promotor de GM-CSF 10 humano. O promotor que regula a expressão da enzima pode estar nno adenovírus de forma natural, como é o caso do promotor principal tardio do adenovírus (vide Figura 1 (a), MLP, "major late promotor"). O promotor também pode ser inserido próximo a uma sequência que codifica a enzima. Em 15 uma modalidade preferida, o promotor é o promotor principal tardio do adenovírus.

O adenovírus replicativo da invenção pode ser dotado de modificações na sua sequência genômica que conferem replicação seletiva nas células tumorais. Em uma 20 modalidade particular, isto é obtido com a inserção de um promotor específico de tecido ou um promotor específico de tumor, em que este promotor controla a expressão de um ou mais genes do grupo de Ela, Elb, E2, e E4. Particularmente, o promotor é selecionado dentre o grupo 25 que consiste em promotor de E2F, promotor de telomerase hTERT, promotor de tirosinase, promotor de antígeno específico de próstata (PSA), promotor de alfa-fetoproteína, promotor de COX-2, assim como os promotores artificiais formados por vários sítios de ligação de 30 fatores de transcrição, tais como sítios de ligação para o fator induzido por hipoxemia (HIF-1), o fator de transcrição de Ets, o fator citotóxico de tumor (tcf), o fator de transcrição E2F ou o fator de transcrição Spl.

Preferivelmente, o promotor controla a expressão de Ela.

Outra modificação para se obter a replicação seletiva em tumores é a eliminação das funções iniciais de Ela que bloqueiam a via de retinoblastoma (RB). Outros genes virais que interagem diretamente com a pRB como E4 e E4orf6/7 respectivamente, são candidatos a serem eliminados para a obtenção de replicação seletiva em células tumorais. Como ilustrado nos exemplos, o adenovírus oncolítico ICOVIR17 é caracterizado por conter simultaneamente o gene de hialuronidase, a eliminação de $\Delta 24$ que afeta a interação de Ela com pRB, a inserção de quatro sítios de ligação a E2F-1 e um sítio de ligação de Sp1 no promotor endógeno de Ela para controlar a expressão de Ela, e finalmente, a inserção do peptídeo RGD na fibra adenoviral para aumentar infectividade do vírus. O ICOVIR17 é uma modalidade preferida da invenção.

Outra modificação descrita para se obter a aplicação seletiva em tumores é a eliminação dos genes adenovirais que codificam os RNA associados ao vírus (VA-RNAs). Estes RNA bloqueiam a atividade antiviral do interferon e sua eliminação torna o adenovírus sensível a ser inibido pelo interferon. Uma vez que as células tumorais são caracterizadas pelo truncamento da via do interferon, esses adenovírus replicam-se sob níveis normais nos tumores. Desta forma, em outra modalidade particular, a aplicação seletiva em tumores é obtida com mutações em um ou mais genes do grupo Ela, Elb, E4, e VA-RNAs do adenovírus. Preferivelmente as mutações são realizadas em Ela.

Estas duas estratégias para obtenção de replicação seletiva em tumores não excluem uma à outra.

Em outra modalidade da invenção, o adenovírus tem modificações no seu capsídeo para aumentar a sua

infectividade, ou para dirigi-la para um receptor presente em uma célula tumoral. Em uma modalidade preferida, as proteínas de capsídeo do adenovírus foram modificadas geneticamente para incluir ligantes que aumentam a infectividade ou que dirigem o vírus para um receptor na célula tumoral. O direcionamento do adenovírus para o tumor também pode ser alcançado com ligantes bifuncionais que se ligam ao vírus por um lado e ao receptor tumoral por outro. Por outro lado, para aumentar-se a persistência do adenovírus no sangue, e com isto aumentar as possibilidades de alcançar nódulos tumorais disseminados, o capsídeo pode ser coberto com polímeros, como o polietileno glicol. Em uma modalidade preferida, o adenovírus oncolítico tem o capsídeo modificado para aumentar a sua infectividade ou para dirigi-lo melhor à célula alvo, por meio de uma substituição do domínio de ligação KKTK dos heparan-sulfatos presentes na fibra adenoviral pelo domínio RGDK. Nos exemplos, encontra-se exposta a construção de um adenovírus com estas características, ICOVIR17RGDK.

Em outra modalidade particular, o adenovírus compreende uma sequência que otimiza a tradução protéica da sequência que codifica a hialuronidase.

Em outra modalidade particular, o adenovírus compreende uma sequência que promove a expressão da sequência que codifica a hialuronidase. Mais particularmente, esta sequência é selecionada dentre o grupo que consiste de uma sequência de splicing que permite o processamento do RNA, uma sequência IRES ("internal ribosome entry site"), e a sequência 2A de picornavírus.

Em outra modalidade particular, o adenovírus oncolítico, por sua vez, compreende outros genes inseridos no seu genoma que são usados comumente no campo da terapia

genética de câncer para aumentar a citotoxicidade dos adenovírus oncolíticos às células tumorais. Alguns deles são o gene da timidina quinase, o gene da citosina deaminase, genes pro-apoptóticos, imunoestimuladores, 5 supressores tumorais ou ativadores de pró-fármacos.

Estas modificações no genoma do adenovírus não se excluem entre si. Existem vários métodos para manipular o genoma adenoviral. Os métodos de construção de um adenovírus geneticamente modificado são amplamente 10 estabelecidos no campo da terapia genética e da viroterapia com adenovírus. O método mais comumente usado é baseado na construção primeiro da modificação genética desejada em um plasmídeo que contém a região adenoviral a ser modificada, e posteriormente realizar uma recombinação homóloga em 15 bactérias com um plasmídeo que contém o restante do genoma viral.

O adenovírus que contém o gene de hialuronidase objeto da presente invenção é propagado e amplificado em linhagens celulares normalmente usadas no campo da terapia 20 genética e da viroterapia, tais como linhagens celulares HEK-293 e A549. O método de propagação preferido é por meio de infecção de uma linhagem celular permissiva para a replicação de adenovírus. A linhagem celular de adenocarcinoma pulmonar A549 é um exemplo de uma linhagem 25 com essas características. A propagação é realizada, por exemplo, da seguinte maneira: células A549 são semeadas em placas de cultivo celular de plástico e infectadas utilizando-se 100 partículas virais por célula. Dois dias depois, o efeito citopático que reflete a produção de 30 vírus é observado como um agrupamento e arredondamento das células. As células são colhidas e armazenadas em tubos. Depois de centrifugação a 1000 g durante 5 minutos, o precipitado celular é congelado e descongelado três vezes

para romper as células. O extrato de células resultante é centrifugado a 1000 g durante 5 minutos, e o sobrenadante com vírus é carregado em um gradiente de cloreto de cézio e centrifugado durante 1 hora a 35000 g. A banda de vírus obtidos a partir do gradiente é carregada em outro gradiente de cloreto de cézio e centrifugada novamente durante 16 horas a 35000 g. A banda de vírus é colhida e dialisada contra PBS-10% glicerol. O vírus dealisado é aliquotado e mantido a -80°C. A quantificação do número de partículas virais e de unidades de formação de placa é realizada seguindo-se protocolos padrão. O tampão fosfato-salino (PBS) com glicerol a 5% é uma formulação padrão para o armazenamento de adenovírus. Não obstante, novas formulações foram descritas que aperfeiçoam a estabilidade do vírus. Os métodos de purificação do adenovírus que contém o gene de hialuronidase para a sua utilização no tratamento do câncer são os mesmos que são descritos para outros adenovírus e vetores adenovirais usados em viroterapia e terapia genética do câncer.

O adenovírus oncolítico da presente invenção pode ser administrado a um mamífero, preferivelmente um ser humano. O propósito da administração do adenovírus oncolítico é terapêutico, incluindo, mas não limitando a, melanoma, câncer de pâncreas, câncer de cólon e câncer de pulmão. Da mesma forma, considera-se a administração do adenovírus oncolítico em um estágio pré-maligno de um tumor.

Entende-se que o adenovírus oncolítico é administrado em uma forma farmacêuticamente aceitável. Aqueles versados na técnica podem assegurar a dose apropriada mediante a utilização de procedimentos padrão. Entende-se que a dose deve ser uma quantidade efetiva do adenovírus oncolítico para produzir uma redução do tumor no paciente tratado. A administração pode ser diretamente do

vírus ao tumor, na cavidade onde o tumor está localizado, na vasculatura do tumor, em torno do tumor, ou por meio de injeção endovenosa sistêmica no paciente. Preferivelmente, a administração é sistêmica.

5 Os protocolos para usar os vírus descritos na presente invenção para o tratamento de câncer são os mesmos procedimentos usados nos campos da viroterapia com adenovírus e terapia genética com adenovírus. Existe uma ampla experiência no uso de adenovírus oncolíticos e não
10 oncolíticos no campo da terapia genética. Existem numerosas publicações que descrevem o tratamento de células tumorais em cultura, em modelos de animais, e em ensaios clínicos com pacientes. Para o tratamento de células em cultivos *in vitro*, o adenovírus purificado por meio de
15 qualquer uma das formulações descritas anteriormente é adicionado ao meio de cultura para obter a infecção das células tumorais. Para tratar tumores em modelos de animais ou em pacientes, o adenovírus pode ser administrado loco-regionalmente por meio de injeção no tumor ou na
20 cavidade corporal onde o tumor está localizado, ou sistemicamente por meio de injeção na corrente sanguínea.

O adenovírus oncolítico da invenção pode ser administrado isoladamente ou em combinação com veículos ou excipientes farmacologicamente aceitáveis. Aqueles versados
25 na técnica adaptarão a composição de acordo com a maneira particular de administração. As composições podem compreender o adenovírus oncolítico como o único agente contra o tumor, ou em combinação com outro agente terapêutico, tal como um fármaco quimioterapêutico ou um
30 vetor com um gene terapêutico inserido. Da mesma maneira, a terapia do adenovírus oncolítico poderá ser combinada com radioterapia.

A não ser que de outro modo definido, todos os termos técnicos e científicos usados neste contexto têm o mesmo significado que é usualmente compreendido por uma pessoa normalmente versada na técnica. Métodos e materiais
5 similares ou equivalentes àqueles descritos neste contexto podem ser usados na prática da presente invenção. Por toda a descrição e nas reivindicações, a palavra "compreende" e suas variações não pretendem excluir outros aspectos técnicos, aditivos, componentes ou etapas. Para aqueles
10 versados na técnica, objetivos, vantagens e aspectos adicionais da invenção serão evidenciados quando da descrição ou da prática da invenção. Os seguintes exemplos e desenhos são proporcionados com a finalidade de ilustração, e não pretende-se que sejam limitativos da
15 presente invenção.

Descrição dos Desenhos

A Figura 1 (a) mostra a estrutura de adenovírus oncolíticos caracterizados por conterem e expressarem o gene da hialuronidase PH20. O adenovírus AdwtRGD-PH20
20 contém o gene da proteína PH20 inserido depois do gene de fibra de adenovírus. A expressão do gene da proteína PH20 é regulada por meio do promotor principal tardio (MLP) do adenovírus, por meio de da inserção de splicing IIIa do adenovírus (SA) antes do gene da proteína PH20. A tradução
25 protéica deste gene está otimizada devido à introdução da sequência de kozak (K) antes da sequência de início da tradução. Os adenovírus ICOVIR15 e ICOVIR17 são adenovírus de replicação seletiva em tumores. Eles se caracterizam por conterem 4 sítios de ligação a E2F e um sítio de
30 ligação a Spl no promotor endógeno de Ela. Ambos os vírus também apresentam uma versão modificada da fibra viral na qual foi inserido o peptídeo RGD-4C, e uma versão mutante da proteína Ela na qual os aminoácidos 121-129 da cadeia de

polipeptídios foram eliminados (mutação de $\Delta 24$). Além disso, o ICOVIR17 contém o gene da hialuronidase PH20 da mesma forma que o adenovírus AdwtRGD-PH20. (b) mostra a sequência inserida no adenovírus Ad $\Delta 24$ RGD substituindo sua
 5 sequência dos nucleotídeos 419 até 422. Esta inserção é feita para inserir quatro sítios de ligação para o fator E2F-1 e um sítio de ligação para o fator Sp1. As sequências sublinhadas como "nt 385-419" e "nt 422-461" correspondem ao tipo selvagem Ad $\Delta 24$ RGD. (c) mostra o cassete completo
 10 inserido nos genomas de ICOVIR17 e AdwtRGD-PH20 com relação aos genomas de ICOVIR15 e AdwtRGD (SEQ ID NO: 4). Estão indicadas as sequências ativadoras de splicing IIIa, de Kozak, e de poliadenilação (polyA). A sequência codificante da proteína PH20 abrange desde a sequência de
 15 Kozak até a sequência de poliadenilação. A Figura 1 refere-se ao EXEMPLO 3.

A Figura 2 mostra a sequência de aminoácidos da proteína PH20 (SEQ ID NO: 1) e a representação gráfica hidropática de acordo com o algoritmo de Kyte-Doolittle.
 20 A proteína PH20 é uma proteína de membrana presente nas membranas plasmática e acrossômica dos espermatozóides. (a) A sequência de aminoácidos mostra a sequência sequênciahidrofóbica responsável pela ancoramento da proteína na membrana (sequência sublinhada). Na presente
 25 invenção, a proteína PH20 expressa pelo vírus apresenta uma cauda hidrofóbica eliminada. O ponto de corte está indicado dentro de um círculo. Desta forma, a proteína PH20 é secretada para o meio extracelular. (b) Representação gráfica hidropática dos 100 aminoácidos terminais da
 30 proteína PH20 de acordo com Kyte-Doolittle. A seta indica o início da cauda hidrofóbica que foi eliminada.

A Figura 3 demonstra que os adenovírus oncolíticos que contêm o gene da hialuronidase PH20

expressam uma proteína solúvel que exibe atividade de hialuronidase. Os géis mostram que as amostras de ácido hialurônico incubadas com o sobrenadante do vírus que expressa hialuronidase PH20 foram digeridas, produzindo
5 oligossacarídeos de diferentes dimensões. As amostras incubadas com os sobrenadantes do adenovírus de controle (AdwtRGD e ICOVIR15) exibem ácido hialurônico não digerido. A Figura 3 corresponde ao EXEMPLO 4.

A Figura 4 demonstra que a inserção e expressão
10 do gene de hialuronidase PH20 não interfere com a replicação de um adenovírus de replicação seletiva em tumor. As células provenientes das linhagens celulares A549 (a) e SKMel28 (b) foram infectadas com os adenovírus oncolíticos ICOVIR15 e ICOVIR17 (que diferem do ICOVIR15
15 por conterem o gene PH20) e a quantidade de vírus nos extratos celulares foi medida (vírus total, eixo X, em TU/ml) em tempos diferentes (eixo Y, em horas após infecção). Os gráficos mostram que a cinética da produção de vírus é idêntica para os dois vírus, demonstrando que a
20 inserção e expressão do gene da hialuronidase PH20 no adenovírus ICOVIR17 não afeta a replicação de vírus. A Figura 4 corresponde ao EXEMPLO 5.

A Figura 5 mostra a eficácia oncolítica *in vitro* de um adenovírus oncolítico que contém e expressa o gene da
25 hialuronidase PH20. A atividade oncolítica de um adenovírus que expressa hialuronidase PH20 (ICOVIR17) foi comparada *in vitro* com a atividade de um vírus oncolítico similar sem o gene da hialuronidase PH20 (ICOVIR15) em duas linhagens tumorais que expressam uma alta quantidade
30 de ácido hialurônico, SKMel28 (a) e PC3 (b). O efeito citopático (CPE) que o vírus induz é medido como uma diminuição da quantidade de proteína em uma monocamada celular infectada (método BCA). As células foram semeadas

em placas de 96 poços a 10000 células/poço. No dia seguinte, as células foram infectadas com diluições seriadas dos vírus. As células infectadas foram incubadas durante 5 dias, lavadas com PBS, e mediu-se a quantidade da
5 proteína restante no poço. Os resultados mostram que *in vitro* a expressão da hialuronidase PH20 não melhora a atividade oncolítica do adenovírus, sendo as curvas de citotoxicidade as mesmas para os dois vírus. A percentagem % de sobrevivência celular contra TU/célula está
10 representada. A Figura 5 corresponde ao EXEMPLO 5.

A Figura 6 é uma demonstração da atividade antitumoral de um adenovírus que expressa a hialuronidase PH20 *in vivo*. Células de melanoma humano (SKMel28) foram inoculadas em cada flanco posterior de camundongos atímicos
15 da estirpe Balb/c. Uma vez que os tumores alcançaram uma dimensão média de 150 mm³, foram injetados com PBS ou 1x10⁸ unidades de transdução de AdwtRGD-PH20 (10 tumores/grupo). (a) O gráfico mostra o crescimento médio do tumor (em %) em cada um dos grupos com relação ao dia 0 como uma função
20 de tempo pós-administração (em dias). O resultado demonstra que o adenovírus oncolítico que expressa o gene de hialuronidase PH20 apresenta uma atividade antitumoral mais alta, estatisticamente significativa em comparação com o grupo de controle (PBS), $p < 0,00001$. Os 100% dos tumores
25 injetados com AdwtRGD-PH20 regrediram entre um volume de 10% e de 50% no dia 27 pós-injeção, em relação a uma regressão de 0% no grupo injetado com PBS. (b) A quantidade de ácido hialurônico nos tumores injetados com PBS ou AdwtRGD-PH20 foi analisada no final da experiência por meio
30 de imuno-histoquímica. As imagens mostram que os tumores injetados com o AdwtRGD-PH20 tiveram uma quantidade mais baixa de ácido hialurônico em comparação com os tumores de controle. A Figura 6 corresponde ao EXEMPLO 6.1.

A Figura 7 mostra que a expressão da hialuronidase PH20 melhora o efeito antitumoral de um adenovírus oncolítico depois de sua administração intratumoral. Células (SKMel28) de melanoma humano foram inoculadas em cada flanco posterior de camundongos atímicos da estirpe Balb/c. Uma vez que os tumores alcançaram um volume médio de 130 mm^3 , eles foram injetados com PBS ou 1×10^8 unidades de transdução de ICOVIR15 ou ICOVIR17 (10 tumores/grupo) em uma única dose. (a) O gráfico mostra o crescimento médio dos tumores (em %) com relação ao dia 0 em função de tempo pós-administração (em dias). O adenovírus oncolítico que expressa hialuronidase PH20 (ICOVIR17) apresenta um melhor efeito antitumoral do que o adenovírus de controle que não expressa esta hialuronidase (ICOVIR15). (b) Depois de 42 dias de tratamento, os camundongos foram sacrificados e os tumores foram colhidos e pesados. A tabela mostra um resumo do volume de tumor, percentagem de crescimento do tumor, e peso dos tumores ao final da experiência. Os tumores injetados com ICOVIR17 apresentaram um peso tumoral significativamente mais baixo do que os tumores injetados com ICOVIR15 (* $p < 0,05$) e os tumores injetados com PBS (# $p < 0,05$). Diferentemente dos resultados obtidos *in vitro*, onde o vírus pode espalhar-se sem dificuldade através da monocamada de células, os resultados *in vivo* demonstram que dentro de um tumor, onde a matriz extracelular dificulta a propagação do vírus, a expressão da hialuronidase PH20 aumenta a potência antitumoral de um adenovírus oncolítico. A Figura 7 corresponde ao EXEMPLO 6.2.

A Figura 8 mostra que a expressão da hialuronidase PH20 melhora o efeito antitumoral de um adenovírus oncolítico depois de sua administração sistêmica. Células (SKMel28) de melanoma humano foram

inoculadas em cada flanco posterior de camundongos atímicos da estirpe Balb/c. Uma vez que os tumores alcançaram uma média de 100 mm^3 , os camundongos foram injetados com PBS ou 5×10^{10} de partículas físicas de ICOVIR15 ou ICOVIR17 (ICOVIR15 armado com PH20) (8-10 tumores/grupo) por via endovenosa. (a) O gráfico mostra o crescimento médio do tumor (em %) de cada grupo com relação ao dia 0 em função do tempo pós-administração (em dias). O resultado demonstra que a expressão de hialuronidase PH20 resulta em um aumento da potência oncolítica do adenovírus, uma vez que a supressão do crescimento tumoral induzida por ICOVIR17 é significativamente melhor do que a supressão induzida no grupo de controle (ICOVIR15), * $p < 0,00001$. (b) As imagens mostram a distribuição do adenovírus ICOVIR15 e ICOVIR17 pelas massas tumorais, extraídas ao final da experiência (dia 48). Os tumores dos camundongos injetados com o adenovírus oncolítico ICOVIR17 mostram áreas necrosadas muito extensas (seta grossa), um número reduzido de áreas com células viáveis (v), e grandes e numerosos focos de replicação viral (áreas com fluorescência verde indicadas com setas finas) em comparação com os tumores injetados com o controle de adenovírus, ICOVIR15. A Figura 8 corresponde ao EXEMPLO 6.3.

A Figura 9 demonstra que o aumento da atividade sistêmica antitumoral dos adenovírus que expressam a enzima hialuronidase PH20 não é restrito a um tipo de tumor. (a) O gráfico mostra o crescimento médio dos tumores pancreáticos NP-18 (em %) para cada grupo em relação ao dia 0, em função do tempo de pós-administração (em dias). #, expressa um resultado significativo ($p = 0,02$) em comparação com os tumores tratados com PBS a partir dia 14 ao dia 30; &, significativo ($p = 0,05$) em comparação com os tumores tratados com PBS do dia 14 ao dia 30; *,

significativo ($p = 0,02$) em comparação com os tumores tratados com ICOVIR-15 a partir do dia 12 até 30. (b) As imagens mostram a distribuição do adenovírus ICOVIR15 e ICOVIR17 em tumores NP-18 no dia 30. *, $p = 0,01$ comparado com os tumores tratados com ICOVIR15. "% a.p." significa % de área positiva. A Figura 9 corresponde ao EXEMPLO 6.4.

A Figura 10 (a) mostra a estrutura dos adenovírus oncolíticos ICOVIR17 e ICOVIR17RGDK. (b) mostra a sequência de aminoácidos da versão modificada da fibra em ICOVIR17RGDK (SEQ ID NO: 9). A sequência sublinhada corresponde aos aminoácidos ⁹¹RGDK⁹⁴, que diferem em relação à forma comum da fibra do adenovírus humano do tipo 5. A Figura 10 corresponde ao EXEMPLO 8.

A Figura 11 mostra a atividade oncolítica dos dois adenovírus (ICOVIR17 e ICOVIR17RGDK) em duas linhagens tumorais, sendo uma de pulmão A549 (a) e outra de pâncreas NP-18 (b). % de sobrevivência de células versus TU/célula. A Figura 11 corresponde ao EXEMPLO 9.

EXEMPLOS

20 **EXEMPLO 1. Construção dos adenovírus oncolíticos**

Construíram-se dois adenovírus oncolíticos contendo o gene de hialuronidase PH20: adenovírus AdwtRGD-PH20 e ICOVIR17.

O cDNA da hialuronidase PH20 foi obtida por meio de amplificação por PCR dos diferentes éxons da proteína a partir do genoma da linhagem celular A549 e posterior ligação destes éxons com oligonucleotídeos específicos que continham o alvo da enzima de restrição MfeI. O fragmento resultante foi digerido com MfeI e clonado por meio de ligação no plasmídeo de transporte, pNKFiberRGD (que contém a sequência da fibra de adenovírus modificada com RGD), para produzir o plasmídeo pNKFiberPH20. O cDNA correspondente à proteína PH20 clonado no plasmídeo

pNKFiberPH20 está mostrado na SEQ ID NO: 2. A SEQ ID NO: 2 mostra os nucleotídeos codificantes para a proteína PH20 (isoforma com número de acesso GenBank NP_694859.1) de seu início de transcrição (ATG) até a posição 1467. A
 5 sequência de nucleotídeos da região 1468 até 1527 desta sequência GenBank codifica a cauda hidrofóbica da proteína que ancora a proteína à membrana. Esta sequência foi eliminada e não aparece na SEQ ID NO: 2. Depois do nucleotídeo 1468 foi adicionado o códon de término da
 10 tradução TAA.

EXEMPLO 2. Construção dos adenovírus AdwtRGD-PH20: Com a finalidade de gerar o adenovírus AdwtRGD-PH20, o gene da fibra adenoviral do plasmídeo pVK50cau (que contém a sequência completa da Ad5 com um sítio de restrição SwaI na
 15 fibra) foi substituído por recombinação homóloga de levedura pelo gene da fibra seguido pelo gene da hialuronidase PH20 obtido a partir do plasmídeo pNKFiberPH20 digerido com NotI/KpnI.

O adenovírus AdwtRGD-PH20, caracterizado por
 20 expressar o gene de hialuronidase PH20 sob o controle do promotor principal tardio e por conter o tri-peptídeo RGD na fibra adenoviral, foi gerado por meio de digestão com PacI do plasmídeo pAdwtRGD-PH20 e transfecção em células HEK293. O adenovírus AdwtRGD, previamente descrito, é
 25 caracterizado por conter o tri-peptídeo na fibra adenoviral (cfr. M. Majem et al., "Control of E1A under an E2F-1 promoter insulated with the myotonic dystrophy locus insulator reduces the toxicity of oncolytic adenoviruses Ad-Delta24RGD", Cancer Gene Therapy 2006, vol. 13, pp. 696-
 30 705). O AdwtRGD foi construído por meio de digestão do plasmídeo pVK503, que contém o genoma completo de Ad5 com a fibra modificada RGD (cfr. I. Dmitriev et al., "An adenovirus vector with genetically modified fibres

demonstrates expanded tropism via utilization of a coxsackievirus and adenovirus receptor-independent cell entry mechanism", J. Virol. 1998, vol. 72, pp. 9706-13) com PacI seguido por transfecção de células 293.

5 EXEMPLO 3. Construção de adenovírus ICOVIR17: Para gerar este adenovírus, utilizou-se o plasmídeo adenoviral pICOVIR17. Para gerar este plasmídeo, o gene da fibra adenoviral do plasmídeo pICOVIR15 foi substituído por meio de recombinação homóloga em levedura com o gene da fibra
10 seguido pelo gene da hialuronidase PH20 do plasmídeo pAdwtRGD-PH20 digerido com SpeI/PacI.

O adenovírus ICOVIR15 deriva do adenovírus Ad Δ 24RGD, que é caracterizado por conter a eliminação Δ 24 na sequência codificadora da proteína Ela. Esta eliminação
15 afeta a interação de Ela com pRB. A Ad Δ 24RGD também tem a inserção do peptídeo RGD na fibra adenoviral para aumentar a infectividade do vírus. Estas duas modificações encontram-se descritas em K. Suzuki et al., "A conditionally replicative adenovirus with enhanced
20 infectivity shows improved oncolytic potency", Clin Cancer Res 2001, vol. 7, pp. 120-6. A partir do Ad Δ 24RGD, quatro sítios de ligação a E2F-1 e um sítio de ligação a Sp1 foram inseridos no promotor endógeno Ela para controlar a expressão de Ela. Desta maneira, obteve-se o ICOVIR15.
25 Esta inserção foi feita pela substituição da sequência 419-422 do genoma pela sequência com os 4 sítios de ligação a E2F-1 e um sítio de ligação a Sp1, de modo que a sequência final é aquela que aparece na SEQ ID NO: 3 e Figura 1 (b). Para realizar esta etapa, foi criado um sítio único de
30 corte de BsiWI por meio de mutagênese dirigida no promotor ElA do plasmídeo pEndK/Spe (cfr. J.E. Carette et al., "Conditionally replicating adenovirus expressing short hairpin RNAs silence the expression of a target gene in

cancer cells", Cancer Res 2004, vol. 64, pp. 2663-7). O sítio de ligação a Sp1 foi introduzido no plasmídeo pEndK/Spe com o sítio BsiW I por meio de ligação deste plasmídeo digerido com BsiWI com os oligonucleotídeos Sp1F

5 (5'-GTACGTCGACCACAAACCCCGCCCAGCGTCTTGTCATTGGCGTCGACGCT-3', SEQ ID NO: 5) e Sp1R (5'-GTACAGCGTCGACGCCAATGACAAGACGCTGGGCGGGGTTTGTGGTCGAC-3', SEQ ID NO: 6) hibridizados entre si. Os sítios de ligação a E2F foram introduzidos mediante ligação dos oligonucleotídeos E2FF2

10 GTACGTCGGCGGCTCGTGGCTCTTTCGCGGCAAAAAGGATTTGGCGCGTAAAAGTGGTTCGAA-3', SEQ ID NO: 7) e E2FR2 (5'-GTACTTCGAACACTTTTACGCGCCAAATCCTTTTTGCCGCGAAAGAGCCACGAGCCGCCGAC-3', SEQ ID NO: 8) hibridizados entre si, para criarem o plasmídeo pEndK415Sp1E2F2. Em seguida, introduziu-se por

15 recombinação homóloga em leveduras a sequência CAU, que contém os elementos necessários para a replicação do plasmídeo em leveduras (um centrômero, a sequência de recombinação autônoma ARS, e o marcador de seleção URS3) para criar o plasmídeo pEndK415Sp1E2F2CAU. Finalmente,

20 realizou-se uma recombinação homóloga em leveduras entre o plasmídeo pEndK415Sp1E2F2CAU digerido com KpnI e o genoma adenoviral do adenovírus AdΔ24RGD para construir o pICOVIR15cau. O ICOVIR15 foi obtido por transfecção da digestão PacI do pICOVIR15cau em células HEK293.

25 O vírus ICOVIR17, que contém as mesmas modificações que ICOVIR15, mais a inserção do gene de hialuronidase depois do gene da fibra adenoviral, foi gerado por digestão com PacI do plasmídeo pICOVIR17 e transfecção em células HEK293. A estrutura correta dos

30 genomas AdwtRGD-PH20 e ICOVIR17 foi verificada por meio de restrição com HindIII. Adicionalmente, a região do gene PH20 foi sequenciada com oligonucleotídeos específicos.

O cassete completo inserido nos genomas ICOVIR17 e AdwtRGD-PH20 em relação aos genomas ICOVIR15 e AdwtRGD está ilustrado na Figura 1 (c) e na SEQ ID NO: 4: A sequência codificadora da proteína PH20 se estende da
5 sequência kozak à sequência de poliadenilação.

EXEMPLO 4. Expressão de uma proteína solúvel com atividade de hialuronidase por um adenovírus que contém o gene de hialuronidase PH20

Para demonstrar que um adenovírus que contém o
10 gene da hialuronidase PH20 expressa uma proteína solúvel com atividade de hialuronidase, infectou-se cultivos celulares da linhagem A549 com vírus AdwtRGD, AdwtRGD-PH20, ICOVIR15, ou ICOVIR17 utilizando-se uma multiplicidade de infecção que permitiu mais de 80% de infecção (20 M.OI).
15 Depois de 24 horas pós-infecção, o meio de infecção foi substituído com um meio fresco. Então, depois de mais 24 horas, o meio fresco (ou sobrenadante) foi colhido e concentrado por meio de filtração em uma coluna de Amicon Ultra-4 (Millipore, Billerica, USA), segundo as instruções
20 do fabricante. Os sobrenadantes concentrados foram incubados durante a noite sob 37°C com uma solução de ácido hialurônico (1,5 mg/ml) em tampão fosfato (pH=6) contendo 0,1 M de NaCl e 0,05% de BSA. O ácido hialurônico digerido foi analisado por meio de eletroforese em gel de
25 poliacrilamida a 15% (cfr. M. Ikegami-Kawai et al., "Microanalysis of hyaluronan oligosaccharides by polyacrylamide gel electrophoresis and its application to assay of hialuronidase activity", Analytical biochemistry 2002, vol. 311, pp. 157-65). Os oligossacarídeos
30 resultantes da digestão do ácido hialurônico foram fixados na matriz do gel mediante banho com uma solução de azul de alcian durante 30 min. Finalmente, os oligossacarídeos foram corados com nitrato de prata. O resultado está

ilustrado na Figura 3. Os resultados demonstram que o sobrenadante de células infectadas com adenovírus que contém o gene de hialuronidase PH20 (AdwtRGD-PH20 e ICOVIR17) contém uma proteína solúvel capaz de digerir ácido hialurônico (polissacarídeo de peso molecular elevado) em oligossacarídeos de 5 até mais de 50 unidades de repetição de dissacarídeos.

EXEMPLO 5. Ausência de efeito na replicação viral e na citotoxicidade *in vitro* mediada pelo adenovírus oncolítico que expressa o gene da hialuronidase PH20

Para comprovar que a inserção do gene da hialuronidase PH20 não afetou a replicação do vírus, infectaram-se linhagens tumorais A549 e SKMel-28 com adenovírus oncolíticos ICOVIR15 ou ICOVIR17. Quatro horas após infecção, o meio de infecção foi substituído com meio fresco. Extratos celulares totais foram colhidos em diferentes tempos após infecção e foram congelados e descongelados três vezes para liberar o vírus. A quantidade de vírus no extrato celular foi determinada por meio de infecção de HEK293 e coloração anti-héxon (cfr. M. Majem supra). O resultado está ilustrado na Figura 4. A inserção do gene da hialuronidase PH20 não afeta a replicação do adenovírus ICOVIR17, sendo esta idêntica ao controle de adenovírus.

Para demonstrar o efeito da expressão da hialuronidase PH20 na citotoxicidade do adenovírus oncolítico *in vitro*, foram infectadas células das linhagens tumorais PC3 e SKMel-28 com diluições seriadas dos vírus ICOVIR15 ou ICOVIR17. Cinco e seis dias após a infecção, respectivamente, foi avaliada espectrofotometricamente a quantidade de proteína, como um indicador de sobrevivência de células. Os resultados estão ilustrados na Figura 5. A capacidade lítica de ICOVIR17 nestas duas linhagens

tumorais é a mesma que a atividade de ICOVIR15, indicando que a expressão da hialuronidase PH20 não oferece qualquer vantagem *in vitro*.

EXEMPLO 6. Uso de um adenovírus que se replica e contém o gene da hialuronidase PH20 para tratar tumores eficientemente

6.1. Uma experiência *in vivo* foi realizada utilizando-se camundongos atímicos da estirpe Balb/c que continham tumores SKMel-28. Um total de 5×10^6 células tumorais da linhagem SKMel-28 foram injetadas subcutaneamente em cada flanco posterior do camundongo. Depois de 21 dias, os camundongos com tumores formados (com um volume tumoral de 150 mm^3) foram distribuídos nos diferentes grupos experimentais ($n=10$ por grupo). Os tumores do grupo de controle receberam uma única injeção intratumoral de tampão salino (20 μl). Os camundongos do grupo tratado com AdwtRGD-PH20 receberam uma injeção intratumoral (20 μl) de 1×10^8 unidades de transdução deste vírus por tumor (equivalente a 2×10^9 partículas virais ou vp). Os tumores foram medidos a cada dois ou três dias com um calibrador, e o volume do tumor foi calculado de acordo com a fórmula: $V (\text{mm}^3) = A (\text{mm}) \times B^2 (\text{mm}^2) \times \pi/6$, em que A é o comprimento maior ou longitudinal, e B é o comprimento seccional. A Figura 6 mostra a percentagem de crescimento tumoral em relação ao início do tratamento (dia 0). Os resultados estão ilustrados como a média $\pm$ S.E. A existência de diferenças significativas entre os resultados foi calculada utilizando-se um ensaio não-paramétrico de dados não pareados de Mann-Whitney. As curvas de crescimento foram comparadas utilizando-se uma análise de variação. Os resultados foram considerados significativos se $p < 0,05$. O tratamento dos tumores com adenovírus AdwtRGD-PH20 proporcionou regressões tumorais em 100% dos

tumores tratados. A % de crescimento tumoral foi significativamente menor em comparação com o grupo de controle desde o primeiro dia após injeção. A análise dos tumores no final da experiência mostrou uma diminuição na
5 quantidade de ácido hialurônico contido na matriz extracelular dos tumores injetados com AdwtRGD-PH20.

6.2. Em outro experimento, o tratamento foi realizado por injeção intratumoral de ICOVIR15 ou ICOVIR17. Tumores da linhagem celular de melanoma humano
10 SKMel-28 foram implantados em camundongos atímicos Balb/C nu/nu, e uma vez estabelecidos foram tratados por administração intratumoral com PBS ou 1×10^8 unidades de transdução dos vírus ICOVIR15 ou ICOVIR17 (equivalente a 2×10^9 partículas virais ou vp). Os resultados estão
15 ilustrados na Figura 7. O tratamento com ICOVIR17 mostrou uma atividade oncolítica que resultou em uma supressão do crescimento tumoral significativamente distinta do grupo de controle (PBS), $p < 0,05$. Ao final do experimento, os tumores foram extraídos e pesados. A tabela da Figura 7
20 mostra as médias do volume tumoral, percentagem de crescimento tumoral, e peso dos tumores ao final do experimento. O peso dos tumores injetados com ICOVIR17 é significativamente mais baixo do que o peso dos tumores nos grupos de controle, PBS (# $p < 0,05$) e ICOVIR15 (* $p < 0,05$).

25 6.3. Em outro experimento, o tratamento foi realizado por injeção sistêmica de ICOVIR15 ou ICOVIR17. Tumores da linhagem celular de melanoma humano SKMel-28 foram implantados em camundongos atímicos Balb/C nu/nu, e uma vez estabelecidos, os animais foram tratados por
30 administração na veia caudal com PBS ou 5×10^{10} partículas físicas dos vírus ICOVIR15 ou ICOVIR17. Os resultados estão ilustrados na Figura 8. O tratamento com ICOVIR17 demonstrou uma atividade oncolítica que resultou em uma

supressão de crescimento tumoral significativamente distinta dos grupos de controle, PBS (# $p < 0,0001$) e ICOVIR15 (* $p < 0,00001$). Ao final do experimento, os tumores foram extraídos e congelados em OCT. As diferentes seções
5 provenientes dos tumores congelados em OCT foram tratadas com um anticorpo α -hexon (proteína do capsídeo de adenovírus) e foram contra-corados com 4',6-di-amidino-2-fenil-indol. A atividade antitumoral do ICOVIR17 relaciona-se com a replicação do adenovírus a nível
10 intratumoral, avaliada nos tumores obtidos no dia 48 após injeção. Os tumores tratados com ICOVIR17 apresentam grandes áreas necróticas, uma melhor distribuição viral, e menos áreas de células viáveis do que os tumores injetados com ICOVIR15.

15 6.4. Em outro experimento, o tratamento foi realizado por injeção sistêmica de ICOVIR15 ou ICOVIR17 em camundongos atímicos Balb/C nu/nu implantados com tumores provenientes da linhagem celular de adenocarcinoma pancreático humano NP-18. Uma vez que os tumores foram
20 estabelecidos, alcançando uma média de 60 mm^3 , os animais foram tratados por administração na veia caudal com PBS ou 5×10^{10} partículas físicas do vírus ICOVIR15 ou ICOVIR17 (10 tumores/grupo). Os resultados são ilustrados na Figura 9, onde é demonstrado que o aumento de atividade antitumoral
25 dos adenovírus que expressam a enzima hialuronidase PH20 não está restringido a um único tipo tumoral.

A Figura 9 (a) demonstra que a expressão de hialuronidase PH20 resulta também em um aumento da potência oncolítica do adenovírus em relação ao grupo PBS e
30 ao grupo de controle do vírus (ICOVIR15). #, significativo ($p = 0,02$) em comparação com os tumores tratados com PBS a partir do dia 14 ao dia 30. &, significativo ($p = 0,05$) comparado com os tumores tratados com PBS a partir do dia

14 ao dia 30. *, significativo ($p = 0,02$) comparado com os tumores tratados com ICOVIR15 a partir do dia 12 ao dia 30. No dia 30, os tumores foram extraídos e congelados em OCT, e posteriormente tratados com um anticorpo α -hexon e
5 contra-corados com DAPI.

Para quantificar o nível de replicação intratumoral de ICOVIR-17, cinco áreas viáveis de cada um dos tumores (7/10 animais por grupo) foram analisadas e a percentagem de áreas positivas foi medida utilizando-se um
10 programa de informática (software ImageJ). Os resultados desta análise estão ilustrados na Figura 9 (b) onde é observado que os tumores NP-18 tratados com ICOVIR17 exibem uma positividade significativamente maior para presença de adenovírus em comparação aos tumores tratados com ICOVIR15
15 (*, significativo $p=0,01$).

EXEMPLO 7. Perfil toxicológico dos adenovírus oncolíticos que expressam o gene da hialuronidase

Para comprovar que a inserção do gene da hialuronidase não modifica substancialmente o padrão de
20 toxicidade induzido pelos adenovírus oncolíticos depois da administração endovenosa, um modelo animal foi escolhido em que o adenovirus humano é capaz de se replicar, como o modelo de hamster sírio dourado (*Mesocricetus auratus*). O hamster constitui um modelo animal permissivo à replicação
25 do adenovírus humano. Utilizaram-se animais imunocompetentes com 5 semanas de idade (5-6 animais/grupo), que receberam uma única dose de 4×10^{11} vp de ICOVIR15 ou ICOVIR17 por via intravenosa através da veia cefálica no dia 0 e em um volume de 300 μ l de PBS. O
30 grupo de controle foi injetado com o mesmo volume de PBS. Cinco dias depois da administração, os animais foram sacrificados e de cada um deles se extraiu o sangue total e soro mediante punção cardíaca para a monitoração dos

parâmetros de toxicidade hepática (enzimas AST e ALT), assim como para contagem das diferentes populações sanguíneas mediante citometria de fluxo (hemograma). Simultaneamente, foram obtidos os fígados dos animais, que
5 foram fixados em paraformaldeído a 4% para coloração por hematoxilina/eosina.

Os resultados do estudo de toxicidade hepática indicaram que ambos os vírus induzem certa inflamação hepática neste modelo, com elevações dos níveis de
10 transaminases AST e ALT, mas não se observaram quaisquer diferenças entre os animais tratados com ICOVIR15 ou ICOVIR17. Ao nível hematológico, ambos os vírus provocaram elevações das populações de neutrófilos, basófilos e monócitos, assim como contagem plaquetária reduzida em
15 relação aos animais de controle, mas novamente sem diferenças entre ICOVIR15 e ICOVIR17.

EXEMPLO 8. Construção de vírus ICOVIR17RGDK

Para gerar este adenovírus, utilizou-se o plasmídeo adenoviral pICOVIR17RGDK. Neste plasmídeo, o
20 gene da fibra do adenovírus tipo 5 comum foi substituído com uma versão modificada do seu domínio de ligação de heparan-sulfato (aminoácidos ⁹¹KKTK⁹⁴ da sequência de polipeptídio substituído com ⁹¹RGDK⁹⁴). O plasmídeo pICOVIR17RGDK foi construído por meio de uma recombinação
25 homóloga em leveduras entre o produto da digestão parcial de pICOVIR17 com NdeI e a digestão com EcoRI do plasmídeo pBSattKKT (que continha a versão modificada da fibra de adenovírus, tal como descrita em N. Bayo et al. "Replacement of adenovirus type 5 fibre shaft heparan
30 sulphate proteoglycan-binding domain with RGD for improved tumor infectivity and targeting". Human Gene Therapy 2009, vol. 20, pp 1214-21).

A Figura 10 mostra a posição da modificação ⁹¹RGDK⁹⁴ no contexto de ICOVIR17RGDK, assim como a sequência completa da proteína de fibra neste adenovírus. O adenovírus ICOVIR17 contém uma versão do gene da fibra adenoviral onde o peptídeo RGD-4C foi inserido (Cys-Asp-Cys-Arg-Gly-Asp-Cys-Phe-Cys; CDCRGDCFC, SEQ ID NO: 10) na região HI da área de "cabeça" (domínio "knob") da proteína (laço hiper-variável evolutivamente, não conservado e muito exposto no capsídeo de adenovírus). ICOVIR17RGDK é totalmente análogo ao ICOVIR17, exceto no gene da fibra, uma vez que a fibra ICOVIR17RGDK difere somente em relação à forma comum do adenovírus humano tipo 5 na substituição dos aminoácidos ⁹¹KKTK⁹⁴ pelo peptídeo alta afinidade a integrinas ⁹¹RGDK⁹⁴ no domínio de "eixo" da proteína (domínio "shaft") (SEQ ID NO: 9).

EXEMPLO 9. Eficácia oncolítica do adenovírus com a modificação do capsídeo ICOVIR17RGDK

Tal como ilustrado na Figura 11, a modificação do capsídeo presente em ICOVIR17RGDK não altera a citotoxicidade *in vitro* de um adenovírus oncolítico que contém e expressa o gene da hialuronidase PH20. A atividade oncolítica dos dois adenovírus que expressam hialuronidase PH20 (ICOVIR17 e ICOVIR17RGDK) foi comparada em duas linhagens de células tumorais, uma de pulmão A549 (Figura 11 (a)) e outra de pâncreas NP-18 (Figura 11 (b)). O efeito citopático induzido pelo vírus é medido como uma diminuição da quantidade de proteína em uma monocamada celular infectada (método BCA). As células das duas linhagens celulares tumorais foram semeadas em placas de 96 poços a 10000 células/poço. No dia seguinte, as células foram infectadas com diluições seriadas de vírus. As células infectadas foram incubadas durante 6 dias, lavadas com PBS, e a quantidade de proteína remanescente no poço

foi medida. Os resultados mostram que *in vitro*, a modificação de capsídeo não altera de forma significativa a atividade oncolítica do adenovírus.

EXEMPLO 10. Perfil toxicológico de distintos adenovírus oncolíticos que expressam o gene de hialuronidase

Para avaliar o impacto da modificação de RGDK no entorno dos adenovírus oncolíticos que expressam hialuronidase, utilizaram-se camundongos Balb/C imuno-competentes sem tumor. Neste caso, foram usados machos de 6 semanas de idade (7 animais/grupo). Eles receberam uma única dose de 5×10^{10} vp de ICOVIR17 ou ICOVIR17RGDK por via intravenosa através da veia caudal no dia 0 e em um volume de 150 µl de PBS. No dia 7 (2 animais/grupo) e no dia 12 (5 animais/grupo) após administração, os animais foram sacrificados e de cada um deles extraiu-se o sangue total e o soro por meio de punção cardíaca para contagem das diferentes populações sanguíneas mediante citometria de fluxo (hemograma) e para a monitoração de parâmetros de toxicidade hepática (enzimas AST e ALT). O resultado deste estudo mostrou que ambos os vírus aumentaram os níveis das enzimas no dia 7, porém, estes níveis tendem a normalizar-se no dia 12. Não se observaram diferenças significativas entre os grupos ICOVIR17 e ICOVIR17RGDK em nenhum ponto, muito embora fosse observada uma tendência a menor hepatotoxicidade no grupo de animais injetados com ICOVIR17RGDK em comparação com o grupo de ICOVIR17 (níveis levemente de AST e ALT ligeiramente inferiores). Com relação ao perfil hematológico dos animais obtido no dia 12 após administração, observou-se que não existiam quaisquer diferenças significativas nem dos glóbulos brancos, nem na contagem plaquetária dos animais, exceto no número de linfócitos presentes no sangue de animais tratados com ICOVIR17, que era menor que o sangue dos animais dos grupos PBS e grupos ICOVIR17RGDK.

REIVINDICAÇÕES

1. Adenovírus oncolítico **caracterizado** pelo fato de que compreende uma sequência que codifica uma enzima hialuronidase inserida em seu genoma;

5 em que a sequência de enzima possui a sequência de domínio de ligação à membrana eliminada resultando em uma enzima solúvel;

em que a expressão da enzima é controlada pelo promotor principal tardio de adenovírus (MLP); e

10 em que o adenovírus possui modificações no capsídeo para aumentar sua infectividade ou alvejar um receptor presente em uma célula tumoral.

2. Adenovírus oncolítico, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que o
15 adenovírus é um adenovírus humano.

3. Adenovírus oncolítico, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado** pelo fato de que o adenovírus humano é selecionado do grupo que consiste em adenovírus humano de sorotipos 1 a 51.

20 4. Adenovírus oncolítico, de acordo com a reivindicação 3, **caracterizado** pelo fato de que o adenovírus humano é de sorotipo 5.

5. Adenovírus oncolítico, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, **caracterizado**
25 pelo fato de que a enzima hialuronidase é uma hialuronidase testicular de mamífero.

6. Adenovírus oncolítico, de acordo com a reivindicação 5, **caracterizado** pelo fato de que a enzima hialuronidase é hialuronidase testicular humana.

30 7. Adenovírus oncolítico, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, **caracterizado** pelo fato de que a sequência da enzima é inserida no

adenovírus oncolítico depois da sequência de nucleotídeos da fibra adenoviral.

8. Adenovírus oncolítico, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, **caracterizado** pelo
5 fato de que o adenovírus compreende um promotor específico de tecido ou de tumor, em que o promotor controla a expressão de um ou mais genes do grupo de Ela, Elb, E2 e E4, para obter replicação seletiva em tumores.

9. Adenovírus oncolítico, de acordo com a
10 reivindicação 8, **caracterizado** pelo fato de que o promotor específico de tecido ou de tumor é selecionado do grupo que consiste em promotor de E2F, promotor de telomerase hTERT, promotor de tirosinase, promotor de antígeno específico de próstata, promotor de alfa-fetoproteína e
15 promotor de COX-2.

10. Adenovírus oncolítico, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, **caracterizado** pelo
fato de que o adenovírus tem mutações em um ou mais genes selecionados do grupo que consiste em Ela, Elb, E4 e VA-
20 RNAs, para obter replicação seletiva em tumores.

11. Adenovírus oncolítico, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10, **caracterizado** pelo fato de
que a modificação do capsídeo é a substituição do domínio de ligação KKTK de heparan-sulfatos presente na fibra
25 adenoviral com o domínio RGDK.

12. Adenovírus oncolítico, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 11, **caracterizado** pelo fato de
que o adenovírus compreende a sequência de nucleotídeos de Kozak que otimiza a tradução em proteína da sequência que
30 codifica a hialuronidase.

13. Adenovírus oncolítico, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 12, **caracterizado** pelo fato de

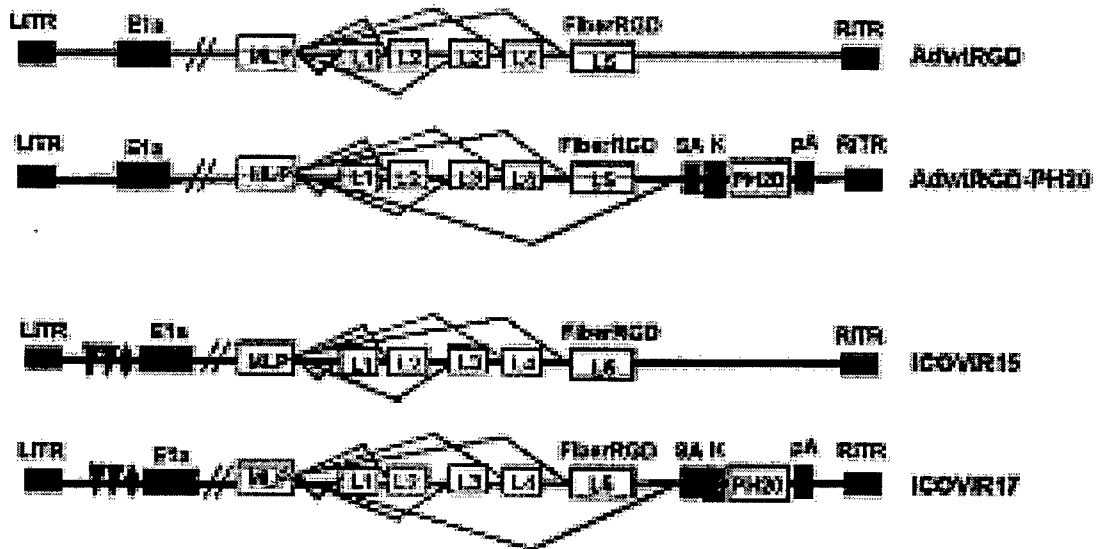
que o adenovírus compreende uma sequência que promove a expressão da sequência que codifica a hialuronidase.

14. Adenovírus oncolítico, de acordo com a reivindicação 13, **caracterizado** pelo fato de que a
5 sequência que promove a expressão é selecionada do grupo que consiste em uma sequência aceptora de *splicing* que permite o processamento do RNA, uma sequência de IRES e a sequência 2^a de picornavírus.

15. Adenovírus oncolítico, de acordo com qualquer
10 uma das reivindicações 1 a 14, **caracterizado** pelo fato de que o adenovírus compreende um ou mais genes inseridos em seu genoma.

16. Composição farmacêutica **caracterizada** pelo
fato de que compreende uma quantidade terapeuticamente
15 eficaz do adenovírus oncolítico, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 15, em conjunto com veículos ou excipientes farmacêuticamente aceitáveis.

17. Uso do adenovírus oncolítico, conforme
definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 15,
20 **caracterizado** pelo fato de ser para a fabricação de um medicamento para o tratamento de um câncer em um mamífero incluindo um ser humano; em que o câncer é selecionado do grupo que consiste em melanoma, câncer de pâncreas e câncer de pulmão.

FIG. 1**A)****B)**

CCAGGTGTTTTCTCAGGTGTTTTCCGCGTACTCGGCGGCTCGTGGCTC
 nt 385-419

TTTCGGCGGCAAAAAGGATTTCGGCGGTAAAGTGTTTCAAGTACTCGG
 E2F-1 E2F-1

CGGCTCGTGGCTCTTCGGCGGCAAAAAGGATTTCGGCGGTAAAGTGTTT
 E2F-1 E2F-1

TCGAAGTACGTGACCACAAACCCGCGCCAGCGTCTTGTCATTGGCGTC
 Sp1

GACGCTGTACGGGGTCAAAAGTTCGGGTTTTATTATTATAGTCAGCTGAG
 nt 422-451

FIG. 1

C)

IIIa

K

TACTAAGCGGTEATGTTTCTGATCAGCCACCATGGGAGTGCTAAAATTCA
 AGCACATCTTTTTCAGAAGCTTTGTTAAATCAAGTGGAGTATCCCAGATA
 GTTTTGACCTTCCTTCTGATTCCATGTTGCTTGACTCTGAATTTGAGAGCA
 CCTCCTGTTATTCCMAATGTGCCTTTCCCTCTGGGCCTGGAATGCCCCAAG
 TGAATTTTGTCTTGGAATAATTGATGAGCCACTAGATATGAGCCTCTTCTC
 TTTCATAGGAAGCCCCGAATAAACGCCACCGGGCAAGGTGTTACAATAT
 TTTATGTTGATAGACTTGGCTACTATCCTTACATAGATTCAATCACAGGAG
 TAACTGTGAATGGAGGAATCCCCAGAAGATTTCCCTTACAAGACCATCTG
 GACAAAGCTAAGAAAGACATTACATTTTATATGCCAGTAGACAATTTGGG
 AATGGCTGTTATTGACTGGGAAGAATGGAGACCCACTTGGGCAAGAAAC
 TGGAAACCTAAAGATGTTTACAAGAATAGGTCTATTGAATTGGTTCAGCA
 ACAAAATGTACAACCTTAGTCTCACAGAGGCCACTGAGAAAGCAAAACAAG
 AATTTGAAAAGGCAGGGAAGGATTTCCCTGGTAGAGACTATAAAATTGGGA
 AAATTACTTCGGCCAAATCACTTGTGGGGTTATTATCTTTTTCCGGAATTGT
 TACAACCATCACTATMGAAAACCCGGTTACAATGGAAGTTGCTTCAATGT
 AGAAATAAAAAGAAATGATGATCTCAGCTGGTTGTGGAATGAAAGCACTG
 CTGTTTACCCATCCATTTATTTGAACACTCAGCAGTCTCCTGTAGCTGCTA
 CACTCTATGTGCCAATCGAGTTCGGGAAGCCATCAGAGTTTCCAAAATA
 CCTGATGCAAAAAGTCCAGTTCGGGTTTTTGCATATACCCGCATAGTTTTT
 ACTGATCAAGTTTTGAAATTCCTTTCTCAAGATGAACCTTGTGTATACATTT
 GGCGAAACTGTTGCTCTGGGTGCTTCTGGAATTGTAATATGGGGAACCC
 TCAGTATAATGCCAAGTATGAAATCTTGCTTGCTCCTAGACAATTACATG
 GAGACTATACTGAATCCTTACATAATCAACGTCACACTAGCAGCCAAAAT
 GTGTAGCCCAAGTGCTTTGCCAGGAGCAAGGAGTGTGTATAAGGAAAAAC
 TCGAATTCAAGTGACTATCTTCACCTCAACCCAGATAATTTTGCTATTCAA
 CTTGAGAAAGGTGGAAAGTTCACAGTACGTGGAAAACCGACACTTGAAG
 ACCTGGAGCAATTTTGTGAAAAATTTTATTGCAGCTGTTATAGCACCCTTGA
 GTTGTAAGGAGAAAGCTGATGTAAAAGACACTGATGCTGTTGATGTGTGT
 ATTGCTGATGGTGTCTGTATAGATGCTTTTCTAAAACCTCCCATGGAGAC
 AGAAGAACCTCAAATTTCTAGAATGCTTCACCCTCCACACTATCTTAATA
AA

polA

FIG. 2**A)**

MGVLKFKHIFFRSFVKSSGVSQIVFTFLIPCCLTNFRAPPVIPNVPLWAW
 NAPSEFCGLGKFDEFLDMSLFSFIGSPRINATGQGVTFYVDRLGYYPYIDSITG
 VTVNGGIPQKISLQDHLKAKKDITFYMPVDNLGMAVIDWEEWRPTWARNW
 KPKDVYKNRSIELVQQQNVQLSLTEATEKAKQEFKAGKDFLVETIKLGKLLR
 PNHLWGYLLFPDCYNHHYKKPGYNGSCFNVEIKRNDLSQLWLVNESTALYP
 SIYLNTOQSPVAATLYVRNRVREARVSKIPDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKF
 LSQDELVYTFGETVALGASGIVVWGTLSIMRSMKSCULLDNYMETILNPYIINV
 TLAAKMCSQVLCQEQGVCIRKNWNSDYHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRGK
 PTLEDLEQFSEKFCYCSYSTLSCKEKAADVKTDAVDVCIADGVCIDAFILKPPM
 ETEEPQIFYNASPSTLSATMFIVSILFLISSVASL

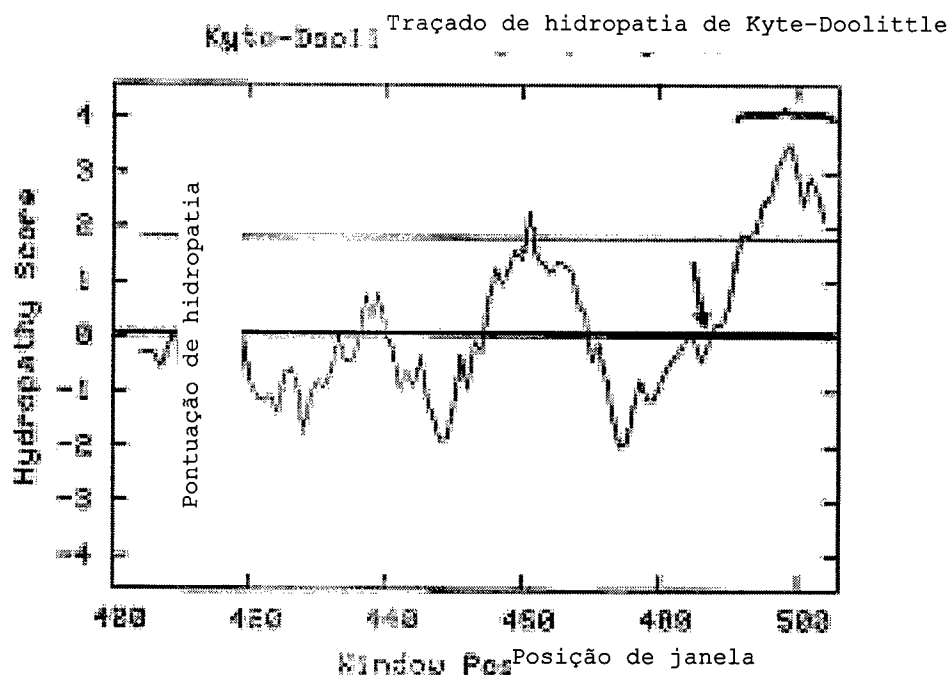
B)

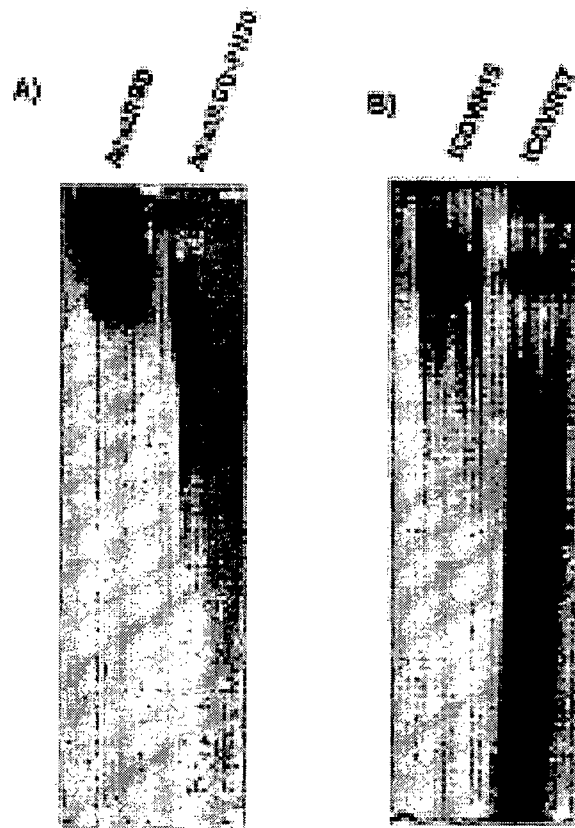
FIG. 3

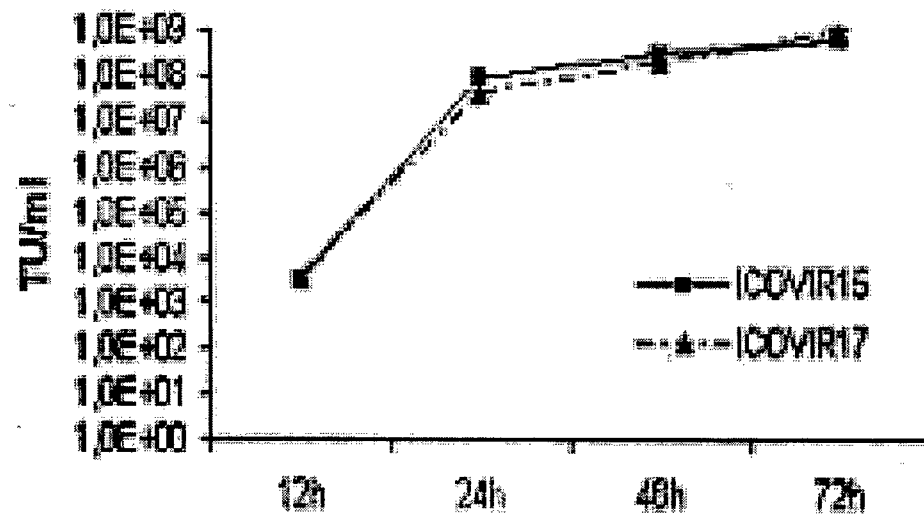
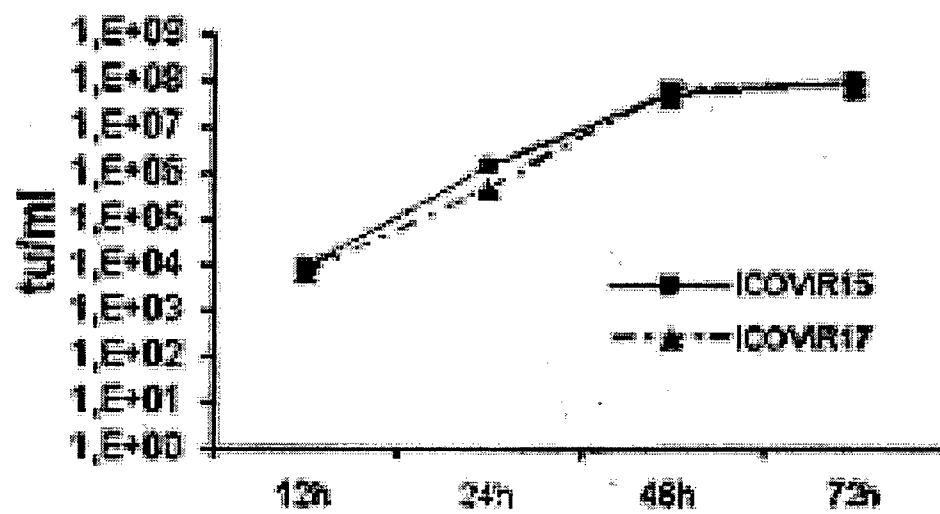
FIG. 4**A)****B)**

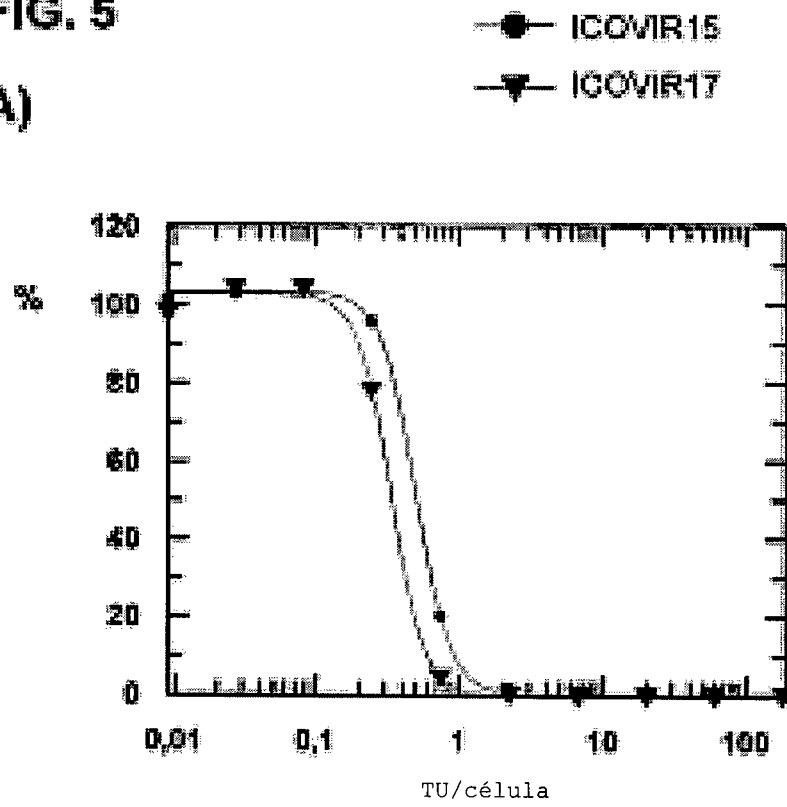
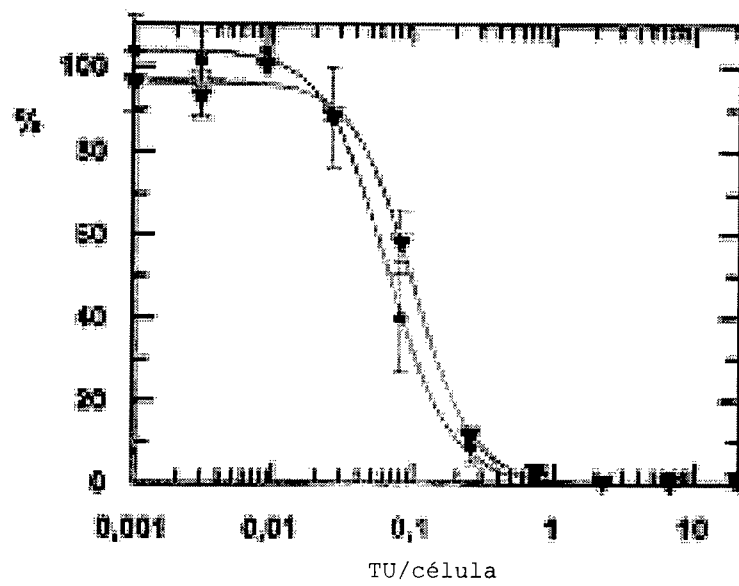
FIG. 5**A)****B)**

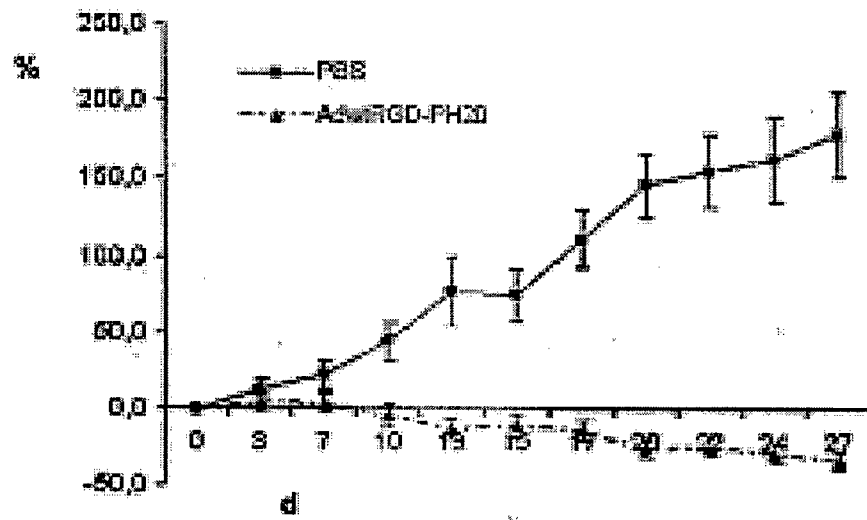
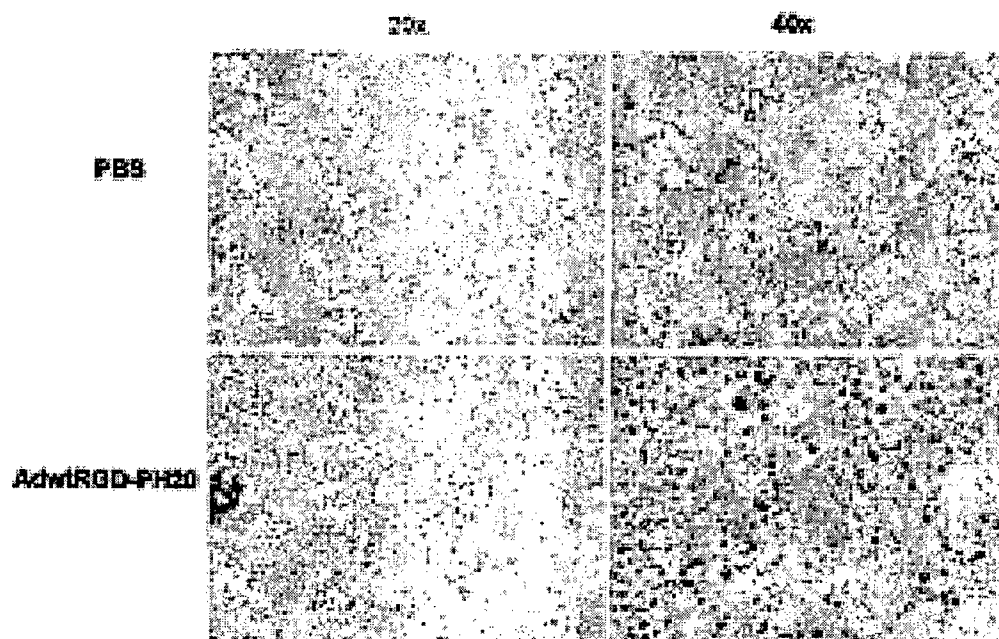
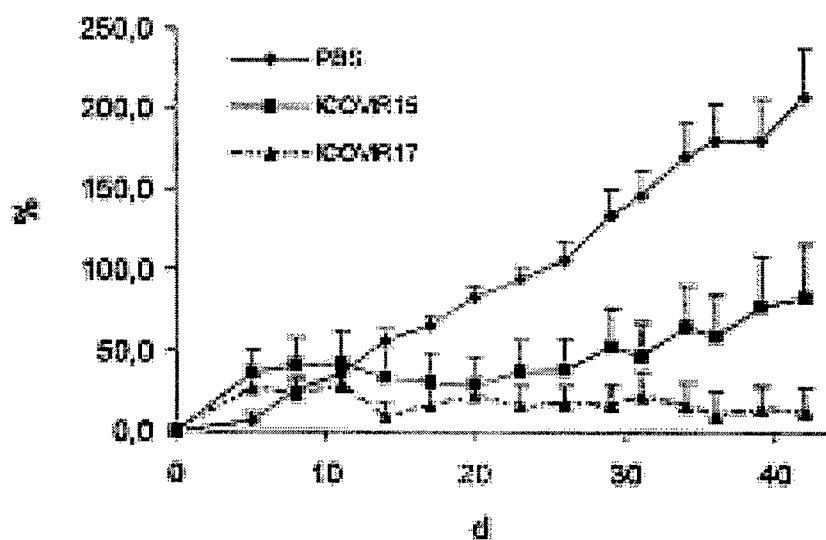
FIG. 6**A)****B)**

FIG. 7**A)****B)**

	Volume tumor dia 0	Volume tumor dia 49	% cresci- mento tumor dia 49	Peso tumor dia 49	% peso vs. PBS
PBS	123.88	394.3	207.17	0.552	100
ICOVIR16	129.2	221.6 #	92.8 #	0.342	61.95
ICOVIR17	128.4	137.8 #	12.2 #	0.199 * #	36.12

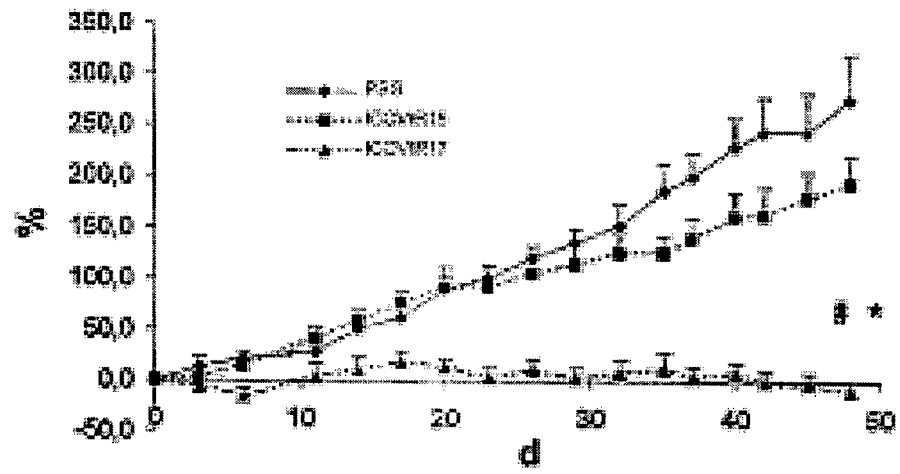
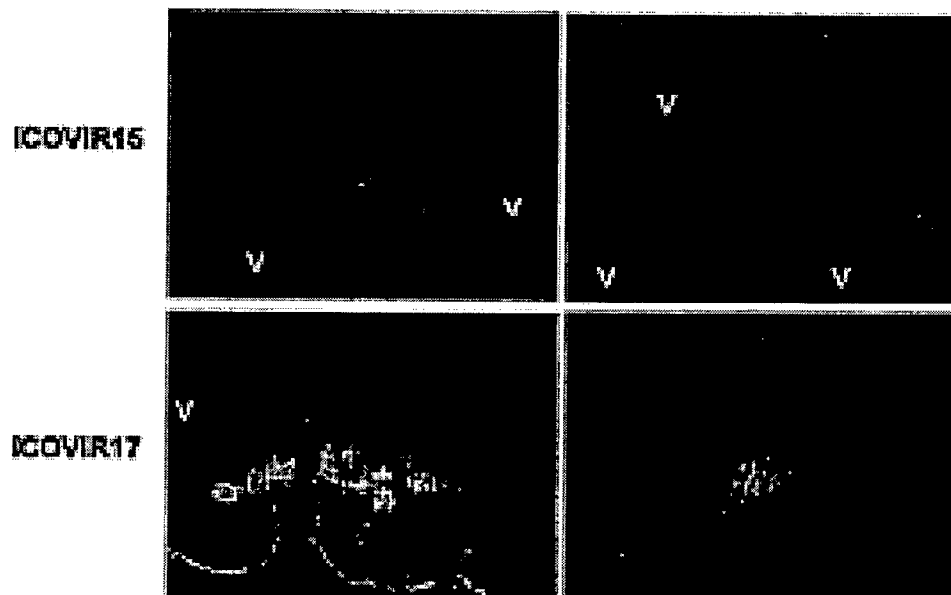
FIG. 8**A)****B)**

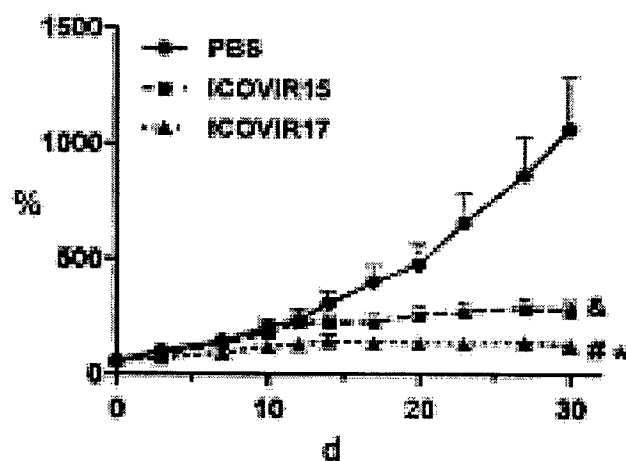
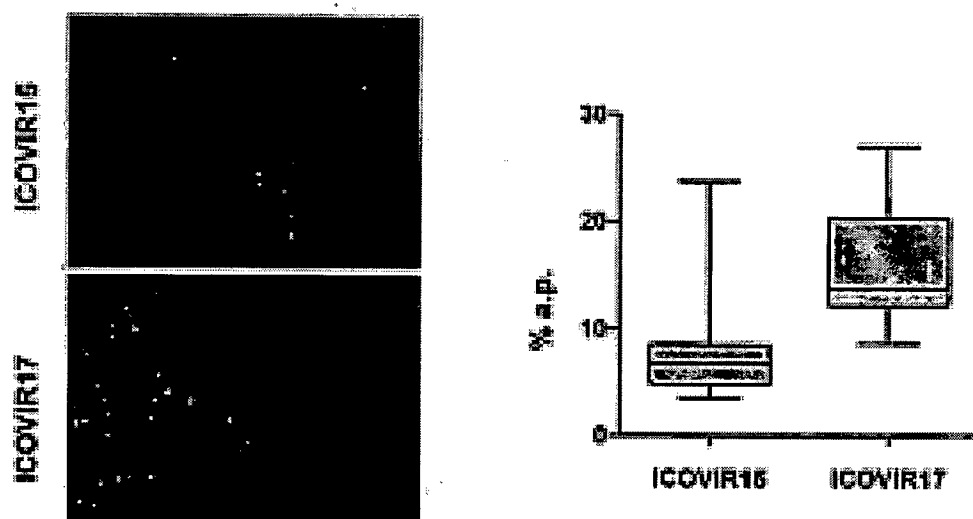
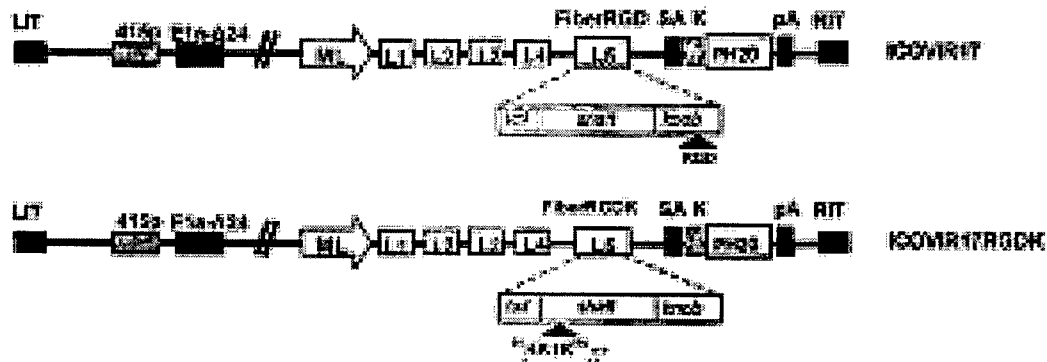
FIG. 9**A)****B)**

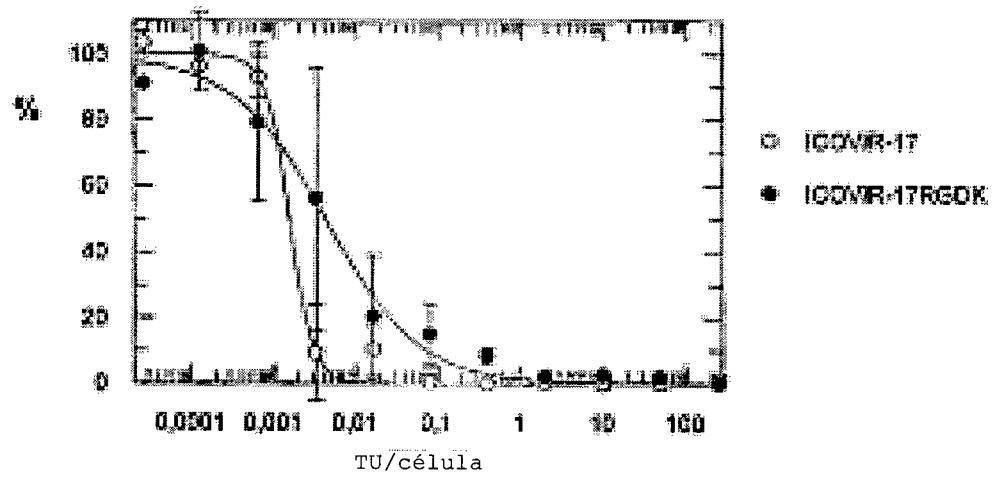
FIG. 10

A)



B)

¹MKRARPS EDTFNPVYPYDTETGPPTVPFLTTPPFVSPNGFQES
 PPGVLSRLSEPLVTSNGMLALKMGNGLSLDEAGNLTSONVT
 TVSPPLRRGDKSNINLEISAPLTVTSEALTVA⁵²AAAPLMVAGNTLT
 MGSQAPLTVHDSKLSIATQGPLTVSEGKLALQTSGPLTTTDDSS
 TLTITASPPLTTATGSLGIDLKEPIYTQNGKLGLKYGAPLHVTD
 LNTLTVATGPGVTINNTSLGTKVTGALGFDSQGNMQLNVAGG
 LRIDSQNRRLILDVSYPFDAQNQLNLRRLGQGPLFINS⁵³AHNLDIN
 YNKGLYLFTASNNSKKLEVNLS⁵⁴TAKGLMFDATAIAINAGDGLF
 GSPNAPNTNPLKTKIIGHGLEFDSN⁵⁵KAMVPKLG⁵⁶TGLSFDSTGAI
 TVGNKNNDKLT⁵⁷LW⁵⁸TPAPSPNCDLNAEKDAKLT⁵⁹LVLT⁶⁰KCGSQI
 LATVSVLAVKGS⁶¹LAPISGT⁶²VQSAHLIRFDENG⁶³VLLNNSFLDPEY
 WNF⁶⁴RNGDLTEGTAYTNAVGFMPNLSAYPKSHGKTAKSNIVSQ
 VYLNGDKTKPVTLTITLNGTQETGDTTPSAYSMSFSWDWSGH
 NYINEIFATSSYTF⁶⁵SYIAQE⁵²

FIG. 11**A)****B)**