

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 943 150**

(51) Int. Cl.:
C12N 7/00
(2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.01.2017 PCT/GB2017/050037**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **13.07.2017 WO17118865**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.01.2017 E 17700384 (5)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.04.2023 EP 3400290**

(54) Título: **Cepa de virus oncolítico**

(30) Prioridad:

**08.01.2016 GB 201600380
08.01.2016 GB 201600381
08.01.2016 GB 201600382**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
09.06.2023

(73) Titular/es:

**REPLIMUNE LIMITED (100.0%)
69 Innovation Centre Milton Park
Oxford, Oxfordshire OX14 4RQ, GB**

(72) Inventor/es:

COFFIN, ROBERT

(74) Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 943 150 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

Cepa de virus oncolítico

5 Campo de la invención

La invención se refiere a un agente inmunoterapéutico oncolítico y al uso del agente inmunoterapéutico oncolítico en el tratamiento del cáncer.

10 Antecedentes de la invención

Los virus tienen una capacidad única para entrar en las células con alta eficiencia. Después de entrar en las células, los genes víricos se expresan y el virus se replica. Esto habitualmente da como resultado la muerte de la célula infectada y la liberación de los componentes antigenicos de la célula a medida que la célula se rompe al morir. Como resultado, la muerte celular mediada por virus tiende a dar como resultado una respuesta inmunitaria a estos componentes celulares, incluyendo tanto los derivados de la célula hospedadora como los codificados o incorporados en el propio virus.

Los virus también se acoplan con diversos mediadores de la respuesta inmunitaria innata como parte de la respuesta del hospedador al reconocimiento de una infección vírica a través de, por ejemplo, receptores tipo Toll y señalización de cGAS/STING que dan como resultado la activación de respuestas de interferón y la inflamación que también son señales inmunogénicas para el hospedador. Estas respuestas inmunitarias pueden resultar en un beneficio inmunogénico para los pacientes con cáncer de tal manera que las respuestas inmunitarias a los antígenos tumorales proporcionan un beneficio general sistémico que da como resultado el tratamiento de tumores que no han sido infectados con el virus, incluyendo la enfermedad micro-metastásica y proporcionando vacunación contra la recaída.

Los efectos directos combinados ("oncolíticos") del virus y las respuestas inmunitarias contra los antígenos tumorales (incluyendo "neoantígenos" no propios, es decir, derivados de los genes mutados particulares en tumores individuales) se denominan "inmunoterapia oncolítica".

Los virus también pueden usarse como vehículos de administración ("vectores") para expresar genes heterólogos insertados en el genoma vírico en células infectadas. Estas propiedades hacen que los virus sean útiles para una diversidad de aplicaciones médicas y biotecnológicas. Por ejemplo, los virus que expresan genes terapéuticos heterólogos pueden usarse para terapia génica. En el contexto de la inmunoterapia oncolítica, los genes administrados pueden incluir los que codifican antígenos tumorales específicos, genes destinados a aumentar la inmunogenicidad de los antígenos liberados tras la replicación del virus y la muerte celular, para aumentar el estado de activación inmunitaria general del tumor o genes para aumentar las propiedades oncolíticas directas (es decir, efectos citotóxicos) del virus.

Se ha demostrado que varios virus incluyendo el virus del herpes simple (VHS) tiene utilidad en el tratamiento oncolítico del cáncer. El VHS para su uso en el tratamiento oncolítico del cáncer debe desactivarse de tal manera que ya no sea patógeno, pero aún puede entrar y destruir células tumorales. Varias mutaciones inhabilitantes del VHS, incluyendo la alteración de los genes que codifican ICP34.5, ICP6 y/o timidina quinasa, se han identificado, que no impiden que el virus se replique en cultivo o en tejido tumoral *in vivo*, pero que previenen una replicación significativa en el tejido normal. Los VHS en los que solo se han alterado los genes ICP34.5 se replican en muchos tipos de células tumorales *in vitro* y se replican selectivamente en tejido tumoral, pero no en el tejido circundante, en modelos de tumores de ratón. Los ensayos clínicos de VHS con ICP34.5 eliminado o con ICP34.5 e ICP6 eliminados, también han mostrado seguridad y replicación selectiva en tejido tumoral en el ser humano.

Como se ha analizado anteriormente, un virus oncolítico, incluyendo VHS, también puede usarse para administrar un gen terapéutico en el tratamiento del cáncer. Un virus con ICP34.5 eliminado de este tipo adicionalmente eliminado para ICP47 y que codifica un gen heterólogo para GM-CSF también se ha probado en ensayos clínicos, incluyendo un ensayo de fase 3 en melanoma en el cual se demostró la seguridad y efectividad en el hombre. Los datos del ensayo demostraron que podían observarse respuestas tumorales en tumores inyectados y, en menor medida, en tumores no inyectados. Las respuestas tendían a ser muy duraderas (meses-años) y parecía que se lograba un beneficio de supervivencia en los pacientes que respondían. Cada uno de ellos indicó la participación del sistema inmunológico en el tratamiento del cáncer, además del efecto oncolítico directo. Sin embargo, este y otros datos con virus oncolíticos generalmente mostraron que no todos los tumores responden al tratamiento y que no todos los pacientes logran una ventaja de supervivencia.

Liu et al. (2003, Gene Therapy, 10 (4): 292-303) describen virus del herpes simple con ICP34.5 eliminado con propiedades oncolíticas, inmunoestimulantes y antitumorales mejoradas.

Senzer et al. (2009, Journal of Clinical Oncology, 27(34): 5763-5771) describe un ensayo clínico de fase II de un virus del herpes oncolítico de segunda generación que codifica el factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos en pacientes con melanoma metastásico irresecable.

- Simpson *et al.* (2006, Cancer Research, 66(9): 4853-4842) desvela la combinación de una glucoproteína fusogénica, la activación de profármacos y un virus del herpes simple oncolítico para un control local de tumores mejorado.
- 5 Piasecki *et al.* desvela que Talilmogene laherparepvec aumenta la efectividad antitumoral del bloqueo de punto de control inmunitario anti-PD-1 (2015, URL [10 Sokolowski *et al.* \(2015, Oncolytic virotherapy, 4: 207-219\) revisa hasta dónde hemos llegado en la viroterapia oncolítica usando el virus del herpes simple.

El documento WO 2006/002394 desvela cepas del virus del herpes oncolíticas no virulentas modificadas por ingeniería genética para contrarrestar la respuesta innata del hospedador.

15 Por lo tanto, claramente se necesitan mejoras en la técnica de la terapia oncolítica y de la inmunoterapia oncolítica. Estas pueden servir para aumentar los efectos oncolíticos directos de la terapia, los efectos inmunoestimulantes antitumorales de la terapia o ambos de estos efectos juntos.

20 Recientemente se ha demostrado que la inmunoterapia oncolítica puede producir efectos terapéuticos aditivos o sinérgicos junto con el bloqueo del punto de control inmunológico \(es decir, inhibición o 'antagonismo' de las vías del punto de control inmunitario\), también conocido como bloqueo de la ruta inmunitaria co-inhibitoria. El bloqueo del punto de control \(ruta inmunitaria co-inhibidora\) pretende bloquear los mecanismos inmunitarios inhibidores del hospedador que normalmente sirven para prevenir la aparición de autoinmunidad. Sin embargo, en pacientes con cáncer, estos mecanismos también pueden servir para inhibir o bloquear los efectos potencialmente beneficiosos de cualquier respuesta inmunitaria inducida a los tumores. Como alternativa, es posible que las respuestas inmunitarias no se potencien por completo debido a la falta de activación o la falta de activación completa de las rutas de potenciación inmunitarias. Por lo tanto, los fármacos que alivian estos bloqueos o estimulan las rutas inmunopotenciadoras \(es decir, que activan o son "agonistas" de estas rutas inmunopotenciadoras\) son atractivos para probar y desarrollar tratamientos contra el cáncer. Las dianas de dichos fármacos aprobados o experimentales incluyen CTLA-4, PD-1, PD-L1, LAG-3, TIM-3, VISTA, CSF1R, IDO, CEACAM1, GITR, 4-1-BB, KIR, SLAMF7, OX40, CD40, ICOS o CD47.

Para que estos enfoques tengan éxito, se necesitan respuestas inmunitarias preexistentes a los tumores, es decir, de tal manera que se pueda potenciar una respuesta inmunitaria preexistente o se pueda aliviar un bloqueo de una respuesta inmunitaria antitumoral. La presencia de un microambiente tumoral inflamado, lo que es indicativo de una respuesta en curso, también es necesaria. Las respuestas inmunitarias preexistentes a los neoantígenos tumorales parecen ser particularmente importantes para la actividad del bloqueo de la ruta inmunitaria co-inhibidora y fármacos relacionados. Solo algunos pacientes pueden tener una respuesta inmunitaria continua a los antígenos tumorales, incluyendo los neoantígenos y/o un microambiente tumoral inflamado, ambos de los cuales son necesarios para la actividad de estos fármacos. Por lo tanto, los agentes oncolíticos que pueden inducir respuestas inmunitarias a los antígenos tumorales, incluyendo los neoantígenos y/o que pueden inducir un microambiente tumoral inflamado son atractivos para su uso en combinación con el bloqueo de la ruta inmunitaria co-inhibidora y fármacos potenciadores del sistema inmunitario. Esto probablemente también explica los prometedores efectos antitumorales combinados de los agentes oncolíticos y el bloqueo de la ruta inmunitaria co-inhibidora en ratones y seres humanos que se han observado hasta ahora.

La ruta de la indolamina 2,3-dioxigenasa \(IDO\) contribuye a la tolerancia inducida por el tumor al crear un entorno tolerogénico en el tumor y los ganglios linfáticos que drenan el tumor, tanto por supresión directa de células T como por mejora de la inmunosupresión mediada por células T reguladoras \(Treg\) locales. La IDO cataliza la etapa limitante de la degradación del triptófano a lo largo de la ruta de la quinurenina, y tanto la reducción de la concentración local de triptófano como la producción de metabolitos immunomoduladores del triptófano contribuyen a los efectos inmunosupresores de IDO. La IDO se activa crónicamente en muchos pacientes con cáncer y la activación de IDO se correlaciona con una enfermedad más extensa. También puede funcionar como antagonista de otros activadores de la inmunidad antitumoral. Por lo tanto, los inhibidores de la ruta de IDO se están desarrollando como agentes anticancerígenos, particularmente en combinación con agentes de bloqueo de puntos de control tales como los que se dirigen a CTLA-4, PD-1 o PDL-1. Los inhibidores de IDO también pueden ser sinérgicos con la inmunoterapia oncolítica, incluyendo junto con fármacos que se dirigen a otras rutas de punto de control inmunitario o coestimulador inmunitario.

60 **Sumario de la invención**

La invención proporciona virus oncolíticos mejorados. Los virus oncolíticos mejorados tienen efectos oncolíticos directos mejorados. Los efectos oncolíticos directos mejorados proporcionados por los virus de la invención también darán lugar a efectos inmunitarios antitumorales sistémicos mejorados. Los efectos oncolíticos directos mejorados proporcionados por los virus de la invención también darán lugar a efectos terapéuticos mejorados en los pacientes. La replicación mejorada en y la destrucción de las células tumorales dará como resultado la liberación de antígeno](http://www.abstractsonline.com/Plan/ViewAbstract.aspx?mID=3682&sKey=ebc7290a-af22-4fa6-9436-c276011fb181&cKey=b61c1150-5517-456b-acd3-2f8048807587&mKey=19573a54-ae8f-4e00-9c23-bd6d62268424)

tumoral mejorada y respuestas inmunitarias sistémicas mejoradas a los antígenos liberados. Los niveles de expresión de cualquier gen insertado para aumentar los efectos oncolíticos directos y/o la inmunoestimulación también se aumentarán.

- 5 Las especies de virus existen de forma natural en un abanico de variantes (cepas) dentro de la población natural que pueden diferir en un pequeño o gran número de nucleótidos mientras que aún retienen las características antigenicas y la suficiente identidad de secuencia para aún ser reconocidos como la misma especie de virus. Estas cepas, debido a sus diferentes secuencias, pueden exhibir un abanico de propiedades que difieren, incluyendo propiedades que se han seleccionado por selección natural en su hospedador u hospedadores naturales (por ejemplo, la capacidad de infectar o replicarse en los tipos de células diana del virus en cuestión, diseminarse entre estas células o evadir el sistema inmunitario innato o adaptativo del hospedador, o diseminarse entre individuos infectados de la especie del hospedador) y propiedades que no se han seleccionado específicamente (por ejemplo, la capacidad de replicarse en y destruir o diseminarse entre tipos celulares que no son las dianas naturales del virus en cuestión, incluyendo tipo celulares o tejidos tumorales u otros no diana). Los inventores han reconocido que muestrear un abanico de cepas víricas de una especie vírica particular que están presentes en la población del hospedador natural (en el caso de virus que infectan a seres humanos, denominados en este punto "aislados clínicos") y comparar estas entre sí para seleccionar la cepa con las mejores propiedades para el fin previsto para el que va a usarse (por ejemplo, infección y destrucción de células tumorales) puede usarse para identificar un virus (por ejemplo, una cepa vírica) con propiedades óptimas para ese fin. Las propiedades óptimas pueden ser propiedades que ofrecen el mejor punto de partida para el desarrollo para producir un virus que puede usarse como un producto terapéutico. Un virus identificado por este enfoque es probable que tenga más propiedades óptimas para el fin previsto que una cepa vírica "prototipo" o "de laboratorio" o una cepa clínica que no se ha seleccionado para la propiedad o propiedades requeridas de un amplio grupo de cepas víricas. Esto es porque la complejidad biológica completa en la población natural, particularmente con respecto a la propiedad o propiedades deseables particulares, es improbable que se haya muestreado a través de tomar un enfoque estrecho para la búsqueda de la propiedad o propiedades deseadas, teniendo en mente el grado de variación de secuencias presente en las poblaciones víricas naturales. En particular, estas pueden variar en secuencia dentro de un hospedador infectado (como es a menudo el caso con poblaciones de ARN o retrovíricas donde las denominadas casi especies están presentes a menudo), entre hospedadores infectados individuales o entre diferentes poblaciones víricas separadas geográficamente.
- 30 Los virus de la invención se han seleccionado, por lo tanto, muestreando un intervalo de cepas víricas presentes en la población natural de una especie vírica particular y probando estas contra otras para la propiedad o propiedades deseadas (por ejemplo, la capacidad de infectar y destruir células tumorales). La cepa o cepas víricas con las mejores propiedades para el fin previsto se usan para el desarrollo adicional.
- 35 Cuando el uso previsto es terapia vírica oncolítica, tomar un enfoque tal proporciona un punto de partida mejorado para el desarrollo de un agente oncolítico, que puede requerir la manipulación adicional de las cepas víricas ventajosas. Tal manipulación incluye la eliminación de genes víricos para proporcionar, por ejemplo, selectividad tumoral u/o la inserción de genes exógenos para mejorar además las propiedades oncolíticas o inmunopotenciadoras.
- 40 Los virus de la invención incluyen, por lo tanto, aislados clínicos novedosos de una especie vírica que tiene mejores efectos antitumorales que los otros aislados clínicos con los que se compararon y a través de cuya comparación se identificaron. En particular, los virus de la invención destruyen líneas celulares tumorales *in vitro* más rápidamente y/o a una menor dosis que estos aislados clínicos de referencia del mismo tipo de virus. Los virus de la invención se han identificado a través de comparación de >20 aislados clínicos de la especie vírica.
- 45 Normalmente, un virus de la invención puede destruir dos o más líneas celulares tumorales *in vitro* en 24 a 48 horas después de la infección a una multiplicidad de infección (MOI) de 0,01 a 0,001 o menos.
- 50 Los virus de la invención pueden modificarse para potenciar además sus efectos antitumorales. El genoma de un virus de la invención puede modificarse para eliminar o alterar la expresión de uno o más genes víricos y/o el genoma del aislado clínico puede modificarse para expresar uno o más genes heterólogos, tales como genes que codifican una proteína fusogénica y/o una molécula o moléculas inmunoestimulantes.
- 55 Los virus oncolíticos para su uso de acuerdo con la invención proporcionan un tratamiento mejorado del cáncer a través de efectos oncolíticos directos mejorados, replicación vírica y diseminación a través de tumores, que (i) aumenta la cantidad de antígenos tumorales, incluyendo los neoantígenos, que se liberan para la inducción de una respuesta inmunitaria antitumoral; y (ii) mejora la expresión de la molécula o moléculas inmunoestimulantes codificadas por virus. La expresión de la molécula o moléculas inmunoestimulantes por el virus puede mejorar y potenciar aún más el efecto inmunitario antitumoral. La expresión de la proteína o proteínas fusogénicas por el virus puede mejorar aún más la diseminación vírica a través de los tumores. La expresión de la proteína o proteínas fusogénicas por el virus puede mejorar aún más la destrucción de células tumorales.
- 60 La efectividad antitumoral de un virus oncolítico de la invención se logra cuando el virus se usa como agente único y también cuando el virus se usa en combinación con otras modalidades anticáncer, incluyendo quimioterapia, tratamiento con agentes dirigidos, radiación, bloqueo de puntos de control inmunológico (es decir, la administración

de uno o más antagonistas de una ruta coinhidatoria inmunitaria) y/o fármacos potenciadores del sistema inmunitario (por ejemplo, uno o más agonistas de una ruta coestimuladora inmunitaria). Los efectos oncolíticos directos mejorados (es decir, replicación del virus en, diseminarse entre y destrucción directa de células tumorales) y los efectos inmunitarios antitumorales sistémicos mejorados de los virus de la invención mejorado sobre los beneficios combinados de la terapia oncolítica y el bloqueo de rutas coinhiditorias inmunitarias y/o la activación de rutas coestimuladoras inmunitarias.

- 5 En consecuencia, la presente invención proporciona un virus oncolítico que es una cepa del virus del herpes simple (VHS) 1 RH018A que tiene el número de registro ECCAC 16121904; RH004A que tiene el número de registro ECCAC 10 16121902; RH031A que tiene el número de registro ECCAC 16121907; RH040B que tiene el número de registro ECCAC 16121908; RH015A que tiene el número de registro ECCAC 16121903; RH021A que tiene el número de registro ECCAC 16121905; RH023A que tiene el número de registro ECCAC 16121906; o RH047A que tiene el número de registro ECCAC 16121909.
- 15 La invención también proporciona un virus oncolítico que es una cepa del virus del herpes simple (VHS) 1 RH018A que tiene el número de registro ECCAC 16121904; RH004A que tiene el número de registro ECCAC 16121902; RH03 1A que tiene el número de registro ECCAC 16121907; RH040B que tiene el número de registro ECCAC 16121908; RH015A que tiene el número de registro ECCAC 16121903; RH021A que tiene el número de registro ECCAC 20 16121905; RH023A que tiene el número de registro ECCAC 16121906; o RH047A que tiene el número de registro ECCAC 16121909, que comprende (a) una mutación que previene la expresión de ICP24.5, ICP6 y/o timidina quinasa funcionales; (b)una o más moléculas inmunoestimulantes o uno o más genes que codifican moléculas inmunoestimulantes; y/o (c) uno o más genes que codifican proteínas fusogénicas.

25 El virus puede comprender (i) un gen que codifica una proteína fusogénica; y/o (ii) un gen que codifica una proteína inmunoestimulante o un gen que codifica una molécula inmunoestimulante. El virus puede codificar más de una proteína fusogénica y/o más de una molécula inmunoestimulante. La proteína fusogénica es preferentemente la glucoproteína del virus de la leucemia del mono gibón (GALV, por sus siglas en inglés) y tiene el péptido transmembrana R mutado o retirado (GALV-R-). La molécula inmunoestimulante es preferentemente GM-CSF y/o un agonista de una ruta coestimuladora inmunitaria incluyendo GITRL, 4-1-BBL, OX40L, ICOSL o CD40L, o una proteína 30 capaz de bloquear la señalización a través de CTLA-4, por ejemplo, un anticuerpo o un fragmento del mismo que se une a CTLA-4.

La invención también proporciona:

- 35 - una composición farmacéutica que comprende un virus de la invención y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable;
- el virus de la invención para su uso en un método de tratamiento del cuerpo humano o animal mediante terapia; y
- el virus de la invención para su uso en un método de tratamiento de cáncer, en donde el método comprende opcionalmente administrar un agente anticáncer adicional.

40 El agente anticáncer adicional puede ser un antagonista de una ruta coinhidatoria inmunitaria o un agonista de una ruta coestimulante inmunitaria.

Breve descripción de las figuras

- 45 La Figura 1 representa la estructura de un virus ejemplar de la invención que comprende un gen que codifica GALV-R- y un gen que codifica GM-CSF insertado en el locus del gen ICP34.5, y en el cual el gen ICP47 se elimina de manera que el gen US11 está bajo el control del promotor temprano inmediato ICP47 (panel superior). La Figura 1 también muestra virus ejemplares similares de la invención que expresan solo un gen que codifica GALV-R (segundo panel), o solo un gen que codifica GM-CSF (tercer panel). También se muestra un virus ejemplar en el que se eliminan el gen ICP34.5 y el gen ICP47, pero sin ningún gen insertado.
- 50 La Figura 2 representa la estructura de un virus ejemplar de la invención que comprende un gen que codifica GALV-R-, un gen que codifica GM-CSF y un gen que codifica CD40L.
- 55 La Figura 3 muestra las capacidades diferenciales de las ocho cepas aisladas clínicas de VHS1 de mayor rango evaluadas mediante tinción con violeta cristal 24 horas o 48 horas después de la infección con una MOI de 0,1, 0,01 o 0,001 como se indica en la Figura para matar líneas de células tumorales humanas Fadu, SK-mel-28, A549, HT1080, MIA-PA-CA-2, HT29 y MDA-MB-231. Se indican las cepas de virus clasificadas en primer y segundo lugar en cada línea celular. El virus RH018A ocupó el primer lugar en cada una de las líneas celulares Fadu, HT1080, MIA-PA-CA-2 y HT29 y el segundo en cada una de las líneas celulares SK-mel-28, A549 y MDA-MB-231. RH004A ocupó el primer lugar junto con RH018A y RH015A en la línea celular HT29, el primero en las líneas celulares SK-mel-28 y A549 y el segundo en la línea celular Fadu. RH023A ocupó el primer lugar en la línea celular MDA-MB-231 y el segundo en la línea celular HT1080. RH031A ocupó el segundo lugar en cada una de las líneas celulares MIA-PA-CA-2 y HT29. RH040A ocupó el segundo lugar en la línea celular HT29.
- 60 La Figura 4 muestra una comparación entre la cepa RH018A, la cepa que ocupó el primer lugar entre todas las cepas probadas, con una deformación "promedia" de la detección (es decir, la cepa RH065A). Se necesitó aproximadamente 10 veces menos de la cepa RH018A para matar una proporción igual de células que la de la
- 65

cepa RH065A, como se muestra en la tinción con violeta cristal 24 o 48 horas después de la infección con MOI de 0,1, 0,01 y 0,001 en líneas celulares SK-mel-28, HT1080, MDA-MB-231, Fadu, MIA-PA-CA-2 y A549.

La Figura 5 representa las estructuras de los virus VHS1 modificados por la delección de ICP34.5 e ICP47 de manera que el gen US11 está bajo el control del promotor temprano inmediato ICP457 y contiene genes heterólogos en el locus ICP34.5. Los virus se construyeron usando la cepa RH018A a menos que se indique lo contrario en la Figura.

La Figura 6 muestra los resultados de un ELISA para detectar la expresión de GM-CSF humano o de ratón en sobrenadantes de células BHK infectadas con el virus 16 (mGM-CSF y GALVR-), el virus 17 (hGM-CSF y GALVR-) y el virus 19 (mGM-CSF).

La Figura 7 es una comparación entre las capacidades de destrucción de células de la cepa RH018A en la que se elimina ICP34.5 y que expresa GALVR- y GFP (virus 10) con un virus que expresa solo GFP (virus 12) según lo determinado por tinción con violeta cristal en tres líneas celulares a bajo aumento.

La Figura 8 es una comparación entre las capacidades de destrucción celular de la cepa RH018A en la que se eliminan ICP34.5 e ICP47 y que expresa GALVR- y GM-CSF (virus 17) con una cepa de la técnica anterior con las mismas modificaciones determinadas por tinción con cristal violeta en cuatro líneas celulares.

La Figura 9 muestra la eficacia del Virus 16 (ICP34.5 e ICP47 eliminados que expresa GALVR- y mGM-CSF) en el tratamiento de ratones que albergan tumores de linfoma A20 en ambos flancos. A los tumores de los flancos derechos se les injectó el virus o vehículo y se observaron los efectos sobre el tamaño del tumor durante 30 días. El virus fue eficaz tanto contra tumores injectados como contra tumores no injectados.

La Figura 10 demuestra los efectos del Virus 15 (ICP34.5 e ICP47 eliminados que expresa GALVR- y GFP) y el Virus 24 (ICP34.5 e ICP47 eliminados que expresa GFP) en células 9L de rata *in vitro* según lo evaluado por tinción con violeta cristal. El virus que expresa GALV (Virus 15) mostró una mayor destrucción de células 9L de rata *in vitro* en comparación con un virus que no expresa GALV (Virus 24).

La Figura 11 muestra los efectos antitumorales del Virus 16 en ratones Balb/c que albergan tumores CT26 de ratón en los flancos izquierdo y derecho. Despues se trataron grupos de 10 ratones con: Vehículo (3 inyecciones en los tumores del flanco derecho cada dos días); 5x10^{exp6} ufp de Virus 16 (mRP1) injectados en el tumor del flanco derecho cada dos días; anti-PD1 de ratón solo (10 mg/kg i.p. cada tres días, clon RMP1-14 de BioXCell); anti-CTLA-4 de ratón (3 mg/kg i.p. cada tres días, clon 9D9 de BioXCell); anti-PD1 de ratón junto con Virus 16; anti-CTLA4 de ratón junto con Virus 16; 1-metil tripotófano (IMT; Inhibidor de IDO (5 mg/ml en agua para beber)); anti-PD1 de ratón junto con 1-metil tripotófano; o anti-PD1 de ratón junto con 1-metil tripotófano y Virus 16. Se observaron los efectos sobre el tamaño del tumor durante 30 días más. Se observó una mayor reducción del tumor en los animales tratados con combinaciones de virus y bloqueo del punto de control que con los grupos de tratamiento únicos. La Figura 11A muestra que el uso de Virus 16 y anti-PD1 en combinación tiene un mejor efecto antitumoral que el uso de anti-PD1 o el virus solo. La Figura 11B muestra que el efecto antitumoral del Virus 16 en combinación con anti-CTLA-4 fue mejor que el efecto antitumoral del Virus 16 o del anti-CTLA-4 solo. La Figura 11C muestra que se observó una mayor reducción del tumor usando el Virus 16 junto con la inhibición tanto de anti-PD1 como de IDO en comparación con la inhibición de anti-PD1 y 1-MT en ausencia del virus.

La Figura 12 muestra la actividad antitumoral potenciada del Virus 16 en combinación con el bloqueo del punto de control inmunitario en tumores A20 de ratón en ambos flancos de ratones Balb/c en comparación con el virus solo o el bloqueo del punto de control solo (anti-PD1).

La Figura 13 muestra la estructura de los virus ICP34.5 e ICP47 eliminados que expresan construcciones de anticuerpos anti-CTLA-4 anti-ratón o anti-humano GALVR-, GM-CSF y optimizados por codones (moléculas scFv secretadas enlazadas a regiones Fc de IgG1 humana o de ratón). Los scFv contienen las cadenas variables ligeras y pesadas ([G₄S]₃) enlazadas del anticuerpo 9D9 (documento US2011044953: versión para ratón) y de ipilimumab (documento US20150283234; versión humana). También se muestra la estructura resultante del inhibidor de CTLA-4.

La Figura 14 muestra los efectos antitumorales del Virus 16 y del Virus 19 en un modelo de xenoinjerto humano (A549). Hubo tres inyecciones de Virus 16, Virus 19 o del vehículo durante una semana a tres niveles de dosis diferentes (N = 10/grupo). Se indican las dosis de los virus usados. Los efectos antitumorales del Virus 16 que expresa GALV fueron mejores que los del Virus 19 que no expresa GALV.

La Figura 15 demuestra los efectos de los virus de la invención que expresan GALVR- en células 9L en los flancos de ratas Fischer 344. Los siguientes tratamientos se administraron a grupos de ratas (diez por grupo), en un flanco de cada rata solo tres veces por semana durante tres semanas: 50 µl de vehículo; 50 µl de 10⁷ ufp/ml de Virus 19 (expresa mGM-CSF pero no GALV R-); o 50 µl de 10⁷ ufp/ml de Virus 16 (expresa tanto GM-CSF de ratón como GALV-R-). A continuación, se observaron los efectos sobre el crecimiento tumoral durante 30 días más. Se observó un control y una contracción superiores del tumor con el virus que expresa GM-CSF y GALV-R- en comparación con el virus que expresa GM-CSF solo.

La Figura 16 muestra los efectos antitumorales de virus que expresan anti-mCTLA-4 (virus 27), mCD40L (virus 32), mOX4OL (virus 35), m4-2BBL (virus 33), cada uno también con mGM-CSF y GALV- R- en comparación con el virus 16 (expresa GALV y mGM-CSF).

Breve descripción del listado de secuencias

- SEQ ID NO: 1 es la secuencia de nucleótidos de GM-CSF de ratón.
 SEQ ID NO: 2 es la secuencia de nucleótidos de una versión de codones optimizados de GM-CSF de ratón.
 SEQ ID NO: 3 es la secuencia de nucleótidos de GM-CSF de humano.

- SEQ ID NO: 4 es la secuencia de nucleótidos de una versión de codones optimizados de GM-CSF de humano.
 SEQ ID NO: 5 es la secuencia de aminoácidos de GM-CSF de ratón.
 SEQ ID NO: 6 es la secuencia de aminoácidos de GM-CSF de humano.
 SEQ ID NO: 7 es la secuencia de nucleótidos de GALV-R-.
 5 SEQ ID NO: 8 es la secuencia de nucleótidos de una versión de codones optimizados de GALV-R- (los primeros tres nucleótidos son opcionales)
 SEQ ID NO: 9 es la secuencia de aminoácidos de GALV-R-.
 SEQ ID NO: 10 es la secuencia de nucleótidos de una versión de codones optimizados de una versión de CD40L unida a la membrana humana.
 10 SEQ ID NO: 11 es la secuencia de aminoácidos de una versión de CD40L unida a la membrana humana.
 SEQ ID NO: 12 es la secuencia de nucleótidos de una versión de codones optimizados de una versión secretada multimérica de CD40L de humano.
 15 SEQ ID NO: 13 es la secuencia de aminoácidos de una versión secretada multimérica de CD40L de humano.
 SEQ ID NO: 14 es la secuencia de nucleótidos de una versión de codones optimizados de una versión secretada multimérica de CD40L de ratón.
 SEQ ID NO: 15 es la secuencia de aminoácidos de una versión secretada multimérica de CD40L de ratón.
 20 SEQ ID NO: 16 es una versión de codones optimizados de la secuencia de nucleótidos de CD40L humano de tipo silvestre.
 SEQ ID NO: 17 es la secuencia de aminoácidos de CD40L humano de tipo silvestre.
 SEQ ID NO: 18 es una versión de codones optimizados de la secuencia de nucleótidos de CD40L de ratón de tipo silvestre.
 SEQ ID NO: 19 es la secuencia de aminoácidos de CD40L de ratón de tipo silvestre.
 25 SEQ ID NO: 20 es la secuencia de nucleótidos de una versión de codones optimizados de 4-1BBL murino.
 SEQ ID NO: 21 es la secuencia de nucleótidos de una versión de codones optimizados de 4-1BBL de humano.
 SEQ ID NO: 22 es la secuencia de nucleótidos de una versión de codones optimizados de 4-1BBL de ratón secretado.
 SEQ ID NO: 23 es la secuencia de nucleótidos de una versión de codones optimizados de 4-1BBL secretado humano.
 30 SEQ ID NO: 24 es la secuencia de nucleótidos de una versión de codones optimizados de GITRL murino.
 SEQ ID NO: 25 es la secuencia de nucleótidos de una versión de codones optimizados de GITRL de humano.
 SEQ ID NO: 26 es la secuencia de nucleótidos de una versión de codones optimizados de GITRL murino secretado.
 SEQ ID NO: 27 es la secuencia de nucleótidos de una versión de codones optimizados de GITRL humano secretado.
 35 SEQ ID NO: 28 es la secuencia de nucleótidos de una versión de codones optimizados de OX40L murino.
 SEQ ID NO: 29 es la secuencia de nucleótidos de una versión de codones optimizados de OX40L de humano.
 SEQ ID NO: 30 es la secuencia de nucleótidos de una versión de codones optimizados de OX40L murino secretado.
 SEQ ID NO: 31 es la secuencia de nucleótidos de una versión de codones optimizados de OX40L de humano secretado.
 40 SEQ ID NO: 32 es la secuencia de nucleótidos de una versión de codones optimizados de ICOSL murino.
 SEQ ID NO: 33 es la secuencia de nucleótidos de una versión de codones optimizados de ICOSL de humano.
 SEQ ID NO: 34 es la secuencia de nucleótidos de un anticuerpo scFv CTLA-4 murino. Los primeros seis y los últimos ocho nucleótidos son sitios de restricción añadidos con fines de clonación.
 45 SEQ ID NO: 35 es la secuencia de nucleótidos de un anticuerpo scFv CTLA-4 murino. Los primeros seis y los últimos ocho nucleótidos son sitios de restricción añadidos con fines de clonación.
 SEQ ID NO: 36 es la secuencia de nucleótidos del promotor de CMV.
 SEQ ID NO: 37 es la secuencia de nucleótidos del promotor de RSV.
 50 SEQ ID NO: 38 es la secuencia de nucleótidos de poliA de BGH.
 SEQ ID NO: 39 es la secuencia de nucleótidos de la poliA tardía de SV40.
 SEQ ID NO: 40 es la secuencia de nucleótidos del promotor potenciador de SV40.
 SEQ ID NO: 41 es la secuencia de nucleótidos de poliA de beta-globulina (RBG) de conejo.
 SEQ ID NO: 42 es la secuencia de nucleótidos de GFP.
 55 SEQ ID NO: 43 es la secuencia de nucleótidos del promotor LTR de MoMuLV.
 SEQ ID NO: 44 es la secuencia de nucleótidos del promotor de EF1a.
 SEQ ID NO: 45 es la secuencia de nucleótidos de poliA de HGH.

Descripción detallada de la invención

60 *Virus oncolítico*

El virus de la invención es oncolítico. Un virus oncolítico es un virus que infecta y se replica en las células tumorales, de tal manera que las células tumorales mueran. Por lo tanto, el virus de la invención es competente para la replicación. Preferentemente, el virus tiene capacidad de replicación selectiva en tejido tumoral. Un virus es selectivamente competente para la replicación en tejido tumoral si se replica más eficazmente en tejido tumoral que en tejido no tumoral. La capacidad de un virus para replicarse en diferentes tipos de tejidos puede determinarse usando técnicas

convencionales en la técnica.

Los virus de la invención pueden ser el virus del herpes simple (VHS) 1 de tipo silvestre (es decir, inalterado de la especie de virus parental) cepa RH018A que tiene el número de registro ECCAC 16121904; RH004A que tiene el

- 5 número de registro ECCAC 16121902; RH031A que tiene el número de registro ECCAC 16121907; RH040B que tiene el número de registro ECCAC 16121908; RH015A que tiene el número de registro ECCAC 16121903; RH021A que tiene el número de registro ECCAC 16121905; RH023A que tiene el número de registro ECCAC 16121906; o RH047A que tiene el número de registro ECCAC 16121909. Los virus de la invención pueden ser cualquiera de estas cepas de
- 10 VHS1 que comprenden una mutación que evita la expresión de ICP34.5, ICP6 y/o timidina quinasa funcionales por el VHS, una o más moléculas inmunoestimulantes o uno o más genes que codifican moléculas inmunoestimulantes; y/o uno o más genes que codifican proteínas fusogénicas.

La cepa del virus del herpes simple (VHS) 1 RH018A que tiene el número de registro ECCAC 16121904; RH004A que tiene el número de registro ECCAC 16121902; RH031A que tiene el número de registro ECCAC 16121907; RH040B

- 15 que tiene el número de registro ECCAC 16121908; RH015A que tiene el número de registro ECCAC 16121903; RH021A que tiene el número de registro ECCAC 16121905; RH023A que tiene el número de registro ECCAC 16121906; y RH047A que tiene el número de registro ECCAC 16121909 son aislados clínicos que se seleccionaron basándose en que tienen propiedades ventajosas particulares para el tratamiento del cáncer. El virus de la invención tiene efectos antitumorales sorprendentemente buenos en comparación con otras cepas del mismo virus aisladas de otros pacientes, en donde un paciente es un individuo que alberga la especie de virus que se va a probar. Las cepas de VHS1 pueden aislarse del herpes labial de individuos que albergan VHS1, típicamente tomando un hisopo usando, por ejemplo, hisopo/recipiente de la marca Virocult (Sigma) que contiene el medio de transporte seguido de transporte a la instalación para usarse para más pruebas.

- 20 25 Después del aislamiento de los virus para compararlos de los individuos, pueden prepararse reservas de virus, por ejemplo, cultivando los virus aislados en células BHK o vero. Preferentemente, esto se hace después de no más de 3 ciclos de congelación y descongelación entre la toma de la muestra y el cultivo, por ejemplo, células BHK o vero para preparar la reserva de virus para su uso adicional. Más preferentemente, la muestra de virus se ha sometido a 2 o menos de 2 ciclos de congelación descongelación antes de la preparación de la reserva para su uso adicional, más preferentemente un ciclo de congelación descongelación, lo más preferentemente sin ciclos de congelación descongelación. Los lisados de las líneas celulares infectadas con los virus preparados de esta manera después del aislamiento pueden compararse, típicamente probando la capacidad del virus para matar líneas de células tumorales *in vitro*. Como alternativa, las reservas víricas pueden almacenarse en condiciones adecuadas, por ejemplo congelando, antes de las pruebas. Los virus de la invención tienen efectos antitumorales sorprendentemente buenos en comparación con otras cepas del mismo virus aisladas de otros individuos, preferentemente en comparación con los aislados de >5 individuos, más preferentemente >10 individuos distintos, lo más preferentemente >20 individuos distintos.

- 30 35 40 Las reservas de los aislados clínicos identificados como virus de la invención (es decir, que tienen propiedades sorprendentemente buenas para matar células tumorales en comparación con otras cepas víricas con las que se compararon) se pueden almacenar en condiciones adecuadas, antes o después de la modificación, y se usan para generar más reservas según sea apropiado.

- 45 Un aislado clínico es una cepa de una especie de virus que se ha aislado de su hospedador natural. El aislado clínico se ha aislado preferentemente con el propósito de probar y comparar el aislado clínico con otros aislamientos clínicos de esa especie de virus para una propiedad deseada, en el caso de los virus de la invención siendo esa la capacidad de matar células tumorales humanas. Los aislados clínicos que pueden usarse para la comparación también incluyen los de muestras clínicas presentes en repositorios clínicos, es decir, recopilados previamente para diagnóstico clínico u otros fines. En cualquier caso los aislados clínicos usados para la comparación preferentemente se habrán sometido a un cultivo mínimo *in vitro* antes de ser probado para la propiedad deseada, preferentemente habiendo sido sometido solamente a un cultivo suficiente para permitir la generación de suficientes reservas para fines de pruebas comparativas. Como tal, los virus usados para la comparación también pueden incluir cepas depositadas, en donde la cepa depositada se ha aislado de un paciente, preferentemente una cepa de VHS1 aislada del herpes labial de un paciente.

- 55 60 65 El virus de la invención es un virus oncolítico que es, o deriva de, un aislado clínico que se ha seleccionado comparando las capacidades de un panel de tres o más aislados clínicos de la misma especie vírica para matar células tumorales de dos o más líneas celulares tumorales *in vitro* y seleccionando un aislado clínico que es capaz de matar células de dos o más líneas celulares tumorales más rápidamente y/o a una dosis más baja *in vitro* de uno o más de los otros aislados clínicos en el panel. Por lo tanto, el virus es un aislado clínico que mata dos o más líneas de células tumorales más rápidamente y/o a una dosis más baja *in vitro* de uno o más aislados clínicos de referencia de la misma especie de virus.

- Normalmente, el virus de la invención matará dos o más líneas de células tumorales en 72 horas, preferentemente en 48 horas, más preferentemente en 24 horas, y puede infectar en multiplicidades de infección (MOI) menores o iguales a 0,1, preferentemente menor o igual a una MOI de 0,01, más preferentemente menor o igual a una MOI de 0,001. El

- virus puede ser capaz de matar un amplio intervalo de líneas de células tumorales humanas, tales como 2, 3, 4, 5, 6, 7 o todas de las siguientes líneas celulares: HT29 (colorrectal), MDA-MB-231 (mama), SK-MEL-28 (melanoma), Fadu (carcinoma de células escamosas), MCF7 (mama), A549 (pulmón), MIAPACA-2 (páncreas), HT1080 (fibrosarcoma). Por lo tanto, el virus de la invención puede ser capaz de matar células de dos o más, tales como 3, 4, 5, 6, 7 o más, tipos diferentes de tumores tales como dos o más, tales como 3, 4, 5, 6, 7 o más, tumores sólidos, incluyendo pero no limitado a células de tumor colorrectal, células de tumor de próstata, células de tumor de mama, células de tumor de ovario, células de melanoma, células de carcinoma de células escamosas, células de tumor de pulmón, células de tumor pancreático, células de sarcoma y/o células de fibrosarcoma.
- 5
- 10 La muerte de la línea de células tumorales puede determinarse mediante cualquier método adecuado. Normalmente, una muestra se aísla primero de un paciente, preferentemente, en el caso de VHS1, de un herpes labial, se usa para infectar células BHK u otra línea celular adecuada tal como las células vero. Las muestras positivas se identifican típicamente por la presencia de un efecto citopático (CPE) 24-72 horas después de la infección, tal como 48 horas después de la infección, y se confirman que es la especie vírica diana mediante, por ejemplo, inmunohistoquímica o PCR. Despues se generan reservas víricas a partir de las muestras positivas. Normalmente se prueba una muestra de la reserva vírica y se compara con otras muestras generadas de la misma manera usando hisopos de diferentes pacientes. Las pruebas pueden llevarse a cabo determinando el nivel de CPE alcanzado en un intervalo de multiplicidad de infecciones (MOI) y en diversos momentos después de la infección.
- 15
- 20 Por ejemplo, las líneas celulares al 80 % de confluencia pueden infectarse con la muestra vírica a MOI de 1, 0,1, 0,01 y 0,001 y las placas duplicadas se incuban durante 24 y 48 horas a 37 °C, 5 % de CO₂ antes de la determinación del grado de destrucción de las células víricas. Esto puede determinarse mediante, por ejemplo, fijación de las células con glutaraldehído y tinción con violeta cristal usando métodos convencionales. El nivel de lisis celular puede evaluarse mediante métodos convencionales tales como la observación general, microscopía (recuento de células) y fotografía.
- 25
- 25 El método puede repetirse incubando las células durante períodos de tiempo más cortos, tales como 8, 12 o 16 horas, o períodos de tiempo más largos, tales como 72 horas, antes de que se determine la muerte celular, o a MOI adicionales tales como 0,0001 o menos.
- 30
- También pueden realizarse experimentos de curva de crecimiento para evaluar la capacidad de diferentes aislados clínicos para replicarse en líneas de células tumorales *in vitro*. Por ejemplo, las líneas celulares al 80 % de confluencia pueden infectarse con la muestra vírica a MOI de 1, 0,1, 0,01 y 0,001, incubada a 37 °C, 5 % de CO₂ y las células lisadas, típicamente por congelación/descongelación, a 0, 8, 16, 24 y 48 horas después de la infección antes de determinar el grado de muerte de las células víricas. Esto puede determinarse mediante, por ejemplo, evaluación de los títulos víricos mediante un ensayo en placa convencional.
- 35
- 35 Un virus de la invención puede matar líneas de células tumorales infectadas más rápidamente y/o a una menor MOI que los otros aislados clínicos con los que se compara, preferentemente 2, 3, 4, 5 o 10 o más, aislados clínicos distintos de la misma especie de virus. Un virus de la invención normalmente mata a una proporción un 10 %, 25 % o 50 % mayor de las células tumorales presentes a una MOI y un punto de tiempo particulares que al menos uno, preferentemente 2, 3, 4, 5 o 10 o más, aislados clínicos distintos del mismo tipo de virus a la misma MOI y punto de tiempo con el que se comparó. El virus de la invención normalmente mata la misma o una mayor proporción de células tumorales a una MOI que es la mitad o menos de la mitad de la MOI en el que uno o más, preferentemente 2, 3, 4, 5, 10 o 15 o más, aislados clínicos distintos de la misma especie de virus usados para la comparación en el mismo momento, típicamente a las 12, 24 y/o 48 horas, mata la misma proporción de células tumorales. Preferentemente, un virus de la invención normalmente mata la misma o una mayor proporción de células tumorales a una MOI que es la 5 o 10 veces menor que la MOI en la cual uno o más, preferentemente 2, 3, 4, 5, 10 o 15 o más, aislados clínicos distintos del mismo virus usados para la comparación en el mismo momento, típicamente a las 12, 24 y/o 48 horas mata la misma proporción de células tumorales. Las capacidades mejoradas de muerte de células tumorales de un virus de la invención se logran típicamente en comparación con al menos el 50 %, el 75 % o el 90 % de los otros aislamientos clínicos de la misma especie vírica usada para la comparación. El virus se compara preferentemente con al menos 4 cepas distintas de virus, tales como, por ejemplo, 7, 9, 19, 39 o 49 cepas distintas de virus de la misma especie.
- 40
- 55 Las cepas aisladas pueden probarse en lotes, por ejemplo, de 4-8 cepas víricas a la vez, en, por ejemplo, 4-8 de las líneas de células tumorales a la vez. Para cada lote de experimentos, el grado de muerte alcanzado se clasifica en cada línea celular de la mejor (es decir, menos células supervivientes en cada punto temporal/MOI) a la peor (es decir, la mayoría de células supervivientes para cada punto temporal/MOI) para los virus que se comparan en ese experimento. Las cepas de virus de cada experimento que se desempeñan mejor en toda la gama de líneas de células tumorales probadas (es decir, que se clasificaron consistentemente como una de las mejores para matar las líneas celulares) pueden luego compararse directamente en experimentos adicionales usando otros aislados clínicos y/u otras líneas de células tumorales para identificar las mejores cepas de virus en el total de, por ejemplo, > 20 cepas de virus muestreadas. Esas clasificadas como las mejores entre todas son los virus de la invención.
- 60
- 65 Un virus de la invención es una cepa seleccionada de:
- cepa RH018A que tiene el número de registro ECCAC 16121904;

5 cepa RH004A que tiene el número de registro ECCAC 16121902;
 cepa RH031A que tiene el número de registro ECCAC 16121907;
 cepa RH040B que tiene el número de registro ECCAC 16121908;
 cepa RH015A que tiene el número de registro ECCAC 16121903;
 cepa RH021A que tiene el número de registro ECCAC 16121905;
 cepa RH023A que tiene el número de registro ECCAC 16121906; y
 cepa RH047A que tiene el número de registro ECCAC 16121909.

10 Más preferentemente, el virus de la invención es una cepa seleccionada de:

10 cepa RH018A que tiene el número de registro ECCAC 16121904;
 cepa RH004A que tiene el número de registro ECCAC 16121902;
 cepa RH031A que tiene el número de registro ECCAC 16121907;
 15 cepa RH040B que tiene el número de registro ECCAC 16121908; y
 cepa RH015A que tiene el número de registro ECCAC 16121903;

Lo más preferentemente, el virus de la invención es la cepa RH018A que tiene el número de registro EACC 16121904.

20 Un VHS de la invención es capaz de replicarse selectivamente en tumores, tales como tumores humanos.

20 Normalmente, el VHS se replica eficazmente en tumores diana pero no se replica eficazmente en tejido no tumoral. Este VHS comprende una o más mutaciones en uno o más genes víricos que inhiben la replicación en tejido normal pero aún permiten la replicación en tumores. La mutación puede, por ejemplo, ser una mutación que impide la expresión de ICP34.5 funcional, ICP6 y/o timidina quinasa por el VHS.

25 En una realización preferida, los genes que codifican ICP34.5 se mutan para conferir actividad oncolítica selectiva al VHS. Las mutaciones de los genes que codifican ICP34.5 que impiden la expresión de ICP34.5 funcional se describen en Chou *et al.* (1990) *Science* 250:1262-1266, Maclean *et al.* (1991) *J. Gen. Virol.* 72:631-639 y Liu *et al.* (2003) *Gene Therapy* 10:292-303. El gen que codifica ICP6 y/o el gen que codifica la timidina quinasa también pueden estar inactivados, al igual que otros genes, siempre que dicha inactivación no evite que el virus infecte o se replique en los tumores.

30 El VHS puede contener una mutación o mutaciones adicionales que potencian la replicación del VHS en tumores. La mejora resultante de la replicación vírica en tumores no solo da como resultado una mejor destrucción directa de las células tumorales 'oncolíticas' por el virus, sino que también mejora el nivel de expresión génica heteróloga (es decir, un gen insertado en el virus, en el caso de virus para su uso en la invención, genes que codifican proteína o proteínas fusogénicas y molécula o moléculas inmunomoduladoras) y aumenta la cantidad de antígeno tumoral liberado cuando las células tumorales mueren, ambos de los cuales pueden también mejorar las propiedades inmunogénicas de la terapia para el tratamiento del cáncer. Por ejemplo, en una realización preferida de la invención, la delección del gen que codifica ICP47 de una manera que coloca el gen US11 bajo el control del promotor temprano inmediato que normalmente controla la expresión del gen que codifica ICP47 conduce a una replicación mejorada en tumores (véase Liu *et al.*, 2003).

35 Otras mutaciones que colocan la secuencia codificante de US11, que es un gen tardío del VHS, bajo el control de un promotor que no depende de la replicación vírica también puede introducirse en un virus de la invención. Tales mutaciones permiten la expresión de US11 antes de que se produzca la replicación del VHS y mejoran la replicación vírica en tumores. En particular, tales mutaciones potencian la replicación de un VHS que carece de genes que codifican ICP34.5 funcionales.

40 En consecuencia, en una realización el VHS de la invención comprende un gen US11 unido operativamente a un promotor, en donde la actividad del promotor no depende de la replicación vírica. El promotor puede ser un promotor temprano inmediato (IE) o un promotor distinto del VHS que sea activo en mamíferos, preferentemente en, células tumorales de seres humanos. El promotor puede, por ejemplo, ser un promotor eucariota, tal como un promotor derivado del genoma de un mamífero, preferentemente un ser humano. El promotor puede ser un promotor ubícuo (tal como un promotor de β-actina o tubulina) o un promotor específico de célula, tal como un promotor específico de tumor. El promotor puede ser un promotor vírico, tales como el promotor de repetición terminal larga del virus de la leucemia murina de Moloney (LTR MMLV) o el promotor IE de citomegalovirus (CMV) humano o de ratón. Los promotores tempranos inmediatos (IE) de VHS son bien conocidos en la técnica. El promotor IE de VHS puede ser el promotor que impulsa la expresión de ICP0, ICP4, ICP22, ICP27 o ICP47.

45 Los genes mencionados anteriormente pueden volverse funcionalmente inactivos por cualquier método adecuado, por ejemplo, por delección o sustitución de todo o parte del gen y/o secuencia de control del gen o por inserción de uno o más ácidos nucleicos en o en lugar del gen y/o la secuencia de control del gen. Por ejemplo, los métodos de recombinación homóloga, que son convencionales en la técnica, pueden usarse para generar el virus de la invención.

50 Como se usa en el presente documento, el término "gen" significa la secuencia de nucleótidos que codifica una proteína, es decir, la secuencia codificante del gen. Los diversos genes mencionados anteriormente pueden volverse

- no funcionales mutando el propio gen o las secuencias de control que flanquean el gen, por ejemplo, la secuencia promotora. Las delecciones pueden eliminar una o más porciones del gen, el gen completo o el gen completo y todas o algunas de las secuencias de control. Por ejemplo, puede hacerse la delección de un solo nucleótido dentro del gen, dando como resultado un desplazamiento de marco. Sin embargo, puede realizarse una supresión más grande, por ejemplo, al menos aproximadamente el 25 %, más preferentemente al menos aproximadamente el 50 % de la secuencia codificante y/o no codificante total. En una realización preferida, el gen que se vuelve funcionalmente inactivo se elimina. Por ejemplo, el gen completo y, opcionalmente, algunas de las secuencias flanqueantes pueden eliminarse del virus. Cuando dos o más copias del gen están presentes en el genoma vírico, ambas copias del gen se vuelven funcionalmente inactivas.
- Un gen puede inactivarse sustituyendo otras secuencias, por ejemplo, sustituyendo todo o parte del gen endógeno por un gen heterólogo y opcionalmente una secuencia promotora. Cuando no se sustituye ninguna secuencia promotora, el gen heterólogo puede insertarse de manera que esté controlado por el promotor del gen que se vuelve no funcional. En un VHS de la invención, se prefiere que los genes que codifican ICP34.5 se vuelvan no funcionales mediante la inserción de un gen o genes heterólogos y una secuencia promotora o secuencias unidas operativamente al mismo, y opcionalmente otros elementos reguladores tales como secuencias de poliadenilación, en cada uno de los loci génicos que codifican ICP34.5.
- Un virus de la invención puede usarse para expresar una proteína fusogénica y una proteína inmunoestimulante en tumores. Esto se logra normalmente insertando un gen heterólogo que codifica la proteína fusogénica y un gen heterólogo que codifica la proteína inmunoestimulante en el genoma de virus competente para la replicación en el que cada gen está bajo el control de una secuencia promotora. Como la replicación de dicho virus se producirá de forma selectiva en el tejido tumoral, la expresión de la proteína fusogénica y/o la proteína inmunoestimulante por parte del virus también se mejora en el tejido tumoral en comparación con el tejido no tumoral en el cuerpo. La expresión mejorada se produce cuando la expresión es mayor en los tumores en comparación con otros tejidos del cuerpo. En consecuencia, la invención proporciona beneficios de expresión de una proteína fusogénica y/o de una proteína inmunoestimulante de forma selectiva en tumores combinados con el efecto antitumoral proporcionado por la replicación del virus oncolítico.
- Proteína fusogénica**
- El virus de la invención puede comprender un gen que codifica una proteína fusogénica. La proteína fusogénica puede ser cualquier proteína heteróloga capaz de promover la fusión de una célula infectada con el virus de la invención a otra célula. Una proteína fusogénica, preferentemente una glucoproteína vírica de tipo silvestre o modificada (es decir, modificada para aumentar sus propiedades fusogénicas), es una proteína que es capaz de inducir la fusión de célula a célula (formación de sincicios) de las células en las que se expresa. Algunos ejemplos de glucoproteínas fusogénicas incluyen VSV-G, sincitina-1 (de retrovirus-W endógeno humano (HERV-W)) o sincitina-2 (de HERVFRDE1), paramixovirus SV5-F, virus del sarampión-H, virus del sarampión-F, RSV-F, la glucoproteína de un retrovirus o lentivirus, tal como el virus de la leucemia del mono gibón (GALV), virus de la leucemia murina (MLV), virus del mono Mason-Pfizer (MPMV) y virus de la anemia infecciosa equina (EIAV) con el péptido transmembrana R eliminado (versiones R-). En una realización preferida la proteína fusogénica es de GALV y tiene el péptido R eliminado (GALV-R-).
- El virus de la invención puede comprender múltiples copias del gen que codifica la proteína fusogénica, preferentemente 1 o 2 copias. El virus puede comprender dos o más proteínas fusogénicas diferentes, incluyendo cualquiera de las proteínas fusogénicas enumeradas anteriormente.
- La proteína o proteínas fusogénicas expresadas por un virus de la invención pueden ser idénticas a una proteína de origen natural o pueden ser una proteína modificada.
- El gen que codifica la proteína fusogénica (gen fusogénico) puede tener una secuencia de ácido nucleico de origen natural o una secuencia modificada. La secuencia del gen fusogénico puede, por ejemplo, modificarse para aumentar las propiedades fusogénicas de la proteína codificada, o para proporcionar optimización de codones y, por lo tanto, aumentar la eficiencia de expresión de la proteína codificada.
- Molécula inmunoestimulante**
- El virus de la invención puede comprender una o más moléculas inmunoestimulantes y/o uno o más genes que codifican una molécula inmunoestimulante. Las moléculas inmunoestimulantes incluyen proteínas que pueden ayudar en la inducción de una respuesta inmunitaria, proteínas que pueden aliviar las señales inhibidoras de la inducción o eficacia de una respuesta inmunitaria y moléculas de ARN (por ejemplo, ARNhP, ARN antisentido, ARNi o micro ARN) que inhiben la expresión de moléculas inhibidoras inmunes.
- Algunos ejemplos de moléculas estimulantes inmunitarias incluyen IL-2, IL12, IL-15, IL-18, IL-21, IL-24, ligando de CD40, ligando de GITR, ligando de 4-1-BB, ligando de OX40, ligando de ICOS, ligando de flt3, interferones tipo I, incluyendo interferón alfa e interferón beta, interferón gamma, interferón tipo III (IL-28, IL-29), otras citocinas tales

- como TNF alfa o GM-CSF, TGF beta o antagonistas de los puntos de control inmunitarios. Los antagonistas de los puntos de control inmunitarios incluyen anticuerpos, anticuerpos monocatenarios y enfoques de atenuación de ARN1/ARNip/microARN/ARN antisentido. Los agonistas de las rutas inmunopotenciadoras/coestimuladoras incluyen ligandos mutantes o de tipo silvestre, solubles, ligandos secretados y/o unidos a la membrana y anticuerpos agonistas que incluyen anticuerpos monocatenarios. Con respecto a la selección de rutas inmunitarias co-inhibidoras o coestimuladoras inmunitarias, proteínas u otras moléculas (agonistas o antagonistas según el caso) dirigidas a CTLA-4 (antagonista), PD-1 (antagonista), PD-L1 (antagonista), LAG-3 (antagonista), TIM-3 (antagonista), VISTA (antagonista), CSF1R (antagonista), IDO (antagonista), CEACAM1 (antagonista), GITR (agonista), 4-1-BB (agonista), KIR (antagonista), SLAMF7 (antagonista), OX40 (agonista), CD40 (agonista). Se prefieren particularmente ICOS (agonista) o CD47 (antagonista). Por tanto, los virus de la invención codifican preferentemente una o más de estas moléculas. Más preferentemente, los virus de la invención codifican GM-CSF y/o un tipo silvestre o versión modificada de CD40L, ICOSL, 4-1-BBL, GITRL u OX40L, lo más preferentemente GM-CSF.
- El inhibidor de una ruta co-inhibidora puede ser un inhibidor de CTLA-4. El inhibidor de CTLA-4 es típicamente una molécula tales como un péptido o proteína que se une a CTLA-4 y reduce o bloquea la señalización a través de CTLA-4, por ejemplo, reduciendo la activación por B7. Al reducir la señalización CTLA-4, el inhibidor reduce o retira el bloqueo de las vías inmunoestimulantes por CTLA-4.
- El inhibidor de CTLA-4 es preferentemente un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo. El término "anticuerpo" como se hace referencia en el presente documento incluye anticuerpos completos y cualquier fragmento de unión a antígeno (es decir, la "porción de unión a antígeno") o cadenas sencillas de los mismos. Un anticuerpo se refiere a una glucoproteína que comprende al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (kappa) (L) interconectadas por enlaces disulfuro o una porción de unión a antígeno de las mismas. Cada cadena pesada está compuesta por una región variable de cadena pesada (abreviada en el presente documento como VH) y una región constante de cadena pesada. Cada cadena ligera está formada por una región variable de cadena ligera (abreviada en el presente documento como VL) y una región constante de cadena ligera. Las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras contienen un dominio de unión que interacciona con un antígeno. Las regiones VH y VL pueden subdividirse además en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco (FR). Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar la unión de la inmunoglobulina a los tejidos o factores del hospedador, incluyendo diversas células del sistema inmunitario (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (Clq) del sistema del complemento clásico.
- El anticuerpo es típicamente un anticuerpo monoclonal. El anticuerpo puede ser un anticuerpo químico. El anticuerpo es preferentemente un anticuerpo humanizado y más preferentemente un anticuerpo humano.
- La frase "fragmento de unión a antígeno" de un anticuerpo se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que retienen la capacidad de unirse específicamente a CTLA-4. El fragmento de unión al antígeno también conserva la capacidad de inhibir CTLA-4 y, por lo tanto, de reducir o retirar el bloqueo de CTLA-4 de una respuesta inmunitaria estimulante. Los ejemplos de fragmentos de adecuados incluyen un fragmento Fab, un fragmento F(ab')₂, un fragmento Fab', un fragmento Fd, un fragmento Fv, un fragmento dAb y una región determinante de complementariedad (CDR) aislada. Los anticuerpos monocatenarios como scFv y los anticuerpos de cadena pesada como VH y los anticuerpos de camello también pretenden incluirse dentro del término "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo. En una realización preferida, el anticuerpo es un scFv. Se desvelan ejemplos de moléculas scFv adecuadas en, por ejemplo, el documento WO2007/123737 y el documento WO2014/066532. El scFv puede estar codificado por la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 34 la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 35.
- Los virus de la invención pueden codificar una o más moléculas estimulantes inmunitarias, preferentemente 1, 2, 3 o 4 moléculas inmunoestimulantes, más preferentemente 1 o 2 moléculas inmunoestimulantes.
- La secuencia del gen que codifica la molécula inmunoestimulante puede tener un codón optimizado para aumentar los niveles de expresión de las proteínas respectivas en las células diana en comparación con si se usa la secuencia inalterada.
- Modificación de cepas víricas*
- Los virus modificados de la invención son versiones modificadas de aislados clínicos depositados identificados como que tienen propiedades ventajosas para matar células tumorales en comparación con otras cepas víricas usadas para la comparación. Los virus modificados de la invención se construyen usando métodos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, los plásmidos (para virus más pequeños y virus de ARN de componente único y múltiple del genoma) o BAC (para virus de ADN más grandes, incluyendo virus del herpes) que codifican el genoma vírico que se va a empaquetar, incluyendo cualquier gen que codifica las moléculas fusogénicas y/o inmunoestimulantes bajo un control regulador adecuado, pueden construirse mediante técnicas de biología molecular convencionales y transfecarse en células permisivas de las que se pueden recuperar virus recombinantes.

- Como alternativa, en una realización preferida, los plásmidos que contienen regiones de ADN que flanquean el sitio de inserción deseado pueden construirse y luego cotransfектarse en células permisivas con ADN genómico vírico de manera que se produzca la recombinación homóloga entre las regiones flanqueantes del sitio de inserción diana en el plásmido y las mismas regiones en el aislado clínico parental. Después los virus recombinantes pueden seleccionarse y purificarse mediante la pérdida o adición de una función insertada o eliminada por el plásmido usado para la modificación, por ejemplo, inserción o delección de un gen marcador tal como GFP o lacZ del virus parental en el sitio de inserción pretendido. En una realización más preferida, el sitio de inserción es el locus ICP34.5 de HSV y, por lo tanto, el plásmido usado para la manipulación contiene secuencias de VHS que flanquean este sitio de inserción, entre los cuales se encuentran un casete de expresión que codifica una proteína fusogénica y una molécula inmunoestimulante. En este caso, el aislado clínico parental puede contener un casete que codifica GFP en lugar de ICP34.5 y las placas de virus recombinantes se seleccionan mediante la pérdida de expresión de GFP. En una realización más preferida, el gen US11 de VHS también se expresa como un gen IE. Esto puede lograrse a través de la eliminación de la región que codifica ICP47 o por otros medios.
- Las secuencias que codifican la proteína fusogénica y las secuencias que codifican la molécula inmunoestimulante pueden insertarse en el genoma vírico bajo un control regulador apropiado. Esto puede estar bajo el control regulatorio de los promotores naturales de la especie de virus de la invención usada, dependiendo de la especie y el sitio de inserción, o preferentemente bajo el control de promotores heterólogos. Los promotores heterólogos adecuados incluyen promotores de mamíferos, tales como el promotor IEF2a o el promotor de actina. Son más preferidos los promotores víricos fuertes tales como el promotor CMV IE, el LTR de RSV, el LTR de MMLV o promotores derivados de SV40. Preferentemente, cada gen exógeno (es decir, que codifica la proteína fusogénica y la molécula inmunomoduladora) estará bajo un control de promotor separado, pero también puede expresarse a partir de un único transcripto de ARN, por ejemplo, mediante la inserción de sitios de entrada de ribosomas internos (IRES) entre secuencias codificantes de proteínas. El ARN derivado de cada promotor se termina típicamente usando una secuencia de poliadenilación (por ejemplo, secuencias de mamíferos tales como la secuencia poli A de la hormona de crecimiento bovina (BGH), secuencias de poliadenilación sintéticas, o secuencias víricas tales como la secuencia de poliadenilación temprana o tardía de SV40).
- La invención también proporciona un virus, tal como un virus de la viruela o un VHS, preferentemente VHS1, que expresa al menos tres genes heterólogos, en donde cada uno de los tres genes heterólogos está impulsado por un promotor diferente seleccionado del promotor de CMV, el promotor de RSV, el promotor de EF1a, el promotor de SV40 y un promotor de LTR retrovírico. El virus puede, por ejemplo, expresar cuatro genes heterólogos, en donde cada uno de los cuatro genes heterólogos está impulsado por un promotor diferente seleccionado del promotor de CMV, el promotor de RSV, el promotor de EF1a, el promotor de SV40 y un promotor de LTR retrovírico. El promotor retrovírico de LTR es preferentemente de MMLV (SEQ ID NO: 43), también conocido como MoMuLV. Los genes heterólogos pueden terminarse mediante secuencias de poliadenilación. Las secuencias de poliadenilación pueden ser iguales o diferentes. Preferentemente cada gen heterólogo está terminado por una secuencia de poliadenilación diferente, que se selecciona preferentemente de secuencias de poliadenilación de BGH, SV40, HGH y RBG.
- La invención también proporciona un virus, tal como un virus de la viruela o un VHS, preferentemente VHS1, que expresa al menos tres genes heterólogos, en donde cada uno de los tres genes heterólogos está terminado por una secuencia de poliadenilación diferente seleccionada de las secuencias de poliadenilación de BGH, SV40, HGH y RBG. El virus puede, por ejemplo, expresar cuatro genes heterólogos terminados por cada una de las secuencias de poliadenilación de BGH, SV40, HGH y RBG, respectivamente.
- Composiciones farmacéuticas*
- La invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un virus de la invención y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. Los vehículos y diluyentes adecuados incluyen soluciones salinas isotónicas, por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato. La composición puede comprender además otros constituyentes tales como azúcares o proteínas para mejorar propiedades tales como la estabilidad del producto. Alternativamente puede usarse una formulación liofilizada, que se reconstituye en un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable antes de su uso.
- La elección del vehículo, si se requiere, es frecuentemente una función de la vía de administración de la composición. Dentro de esta invención, las composiciones pueden formularse para cualquier vía y medio de administración adecuados. Los vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables son los que se usan en composiciones adecuadas para administración intratumoral, administración intravenosa/intraarterial, administración en el cerebro o administración en una cavidad corporal (por ejemplo, vejiga, cavidad pleural o por administración intraperitoneal). La composición puede administrarse en cualquier forma adecuada, preferentemente como un líquido.

El virus de la invención puede estar incluido en un vial, ampolla o jeringa estériles como un producto de fabricación.

Usos médicos

- La invención proporciona el virus de la invención para su uso en el tratamiento del cuerpo humano o animal mediante

- terapia, particularmente para su uso en un método de tratamiento de cáncer. El cáncer está normalmente en un mamífero, preferentemente en un ser humano. El virus mata las células tumorales infectadas mediante toxicidad mediada por virus, incluyendo mediante lisis, necrosis o apoptosis, preferentemente mediante lisis o necrosis. El virus de la invención también provoca una respuesta inmunitaria antitumoral sistémica, aumentada a través de la expresión de la molécula estimulante inmunitaria, que también mata las células cancerosas.
- El virus de la invención es particularmente útil en el tratamiento de cualquier tumor sólido incluyendo cualquier adenocarcinoma, carcinoma, melanoma o sarcoma. Por ejemplo, el virus de la invención es útil para el tratamiento de cánceres de cabeza y cuello, próstata, mama, ovario, pulmón, hígado, endometrio, vejiga, vesícula biliar, páncreas, colon, riñón, estómago/gástrico, esófago o cuello uterino, mesotelioma, melanoma u otro cáncer de piel, linfoma, glioma u otro cáncer del sistema nervioso, o sarcomas tales como sarcoma de tejidos blandos.
- El virus de la invención puede usarse para tratar tumores malignos, incluyendo tumores que han hecho metástasis desde el sitio del tumor original. En esta realización, el virus puede administrarse al tumor primario o a uno o más tumores secundarios.
- El virus de la invención puede administrarse en combinación con otros agentes terapéuticos, incluyendo quimioterapia, terapia dirigida, inmunoterapia (incluyendo bloqueo de una ruta inmunitaria co-inhibidora y/o activación de una ruta inmunitaria coestimuladora) y/o en combinación con radioterapia y/o en combinación con cualquier combinación de estos. El agente terapéutico es preferentemente un agente anti-cáncer.
- El virus de la invención puede administrarse en combinación con un segundo virus, tal como un segundo virus oncolítico.
- Por ejemplo, el agente terapéutico puede comprender un inmunógeno (que incluye un antígeno recombinante o de origen natural, incluyendo tal antígeno o combinación de antígenos administrados como ADN o ARN en el cual está/están codificados), para estimular aún más una respuesta inmunitaria, tal como una respuesta inmunitaria celular o humoral, a las células tumorales, particularmente neoantígenos tumorales. El agente terapéutico puede ser un agente destinado a aumentar o potenciar una respuesta inmunitaria, tales como una citocina, un agente destinado a inhibir una ruta de punto de control inmunológico o estimular una ruta de potenciación inmunitaria o un agente que inhibe la actividad de las células T reguladoras (Treg).
- El agente terapéutico puede ser un agente conocido para su uso en un tratamiento terapéutico del cáncer existente. El agente terapéutico puede ser radioterapia o un agente quimioterapéutico. El agente terapéutico puede seleccionarse de ciclofosfamida, agentes de tipo alquilante tales como cisplatino o melfalán, alcaloides y terpenoides vegetales tales como vincristina o paclitaxel (Taxol), antimetabolitos tales como 5-fluorouracilo, inhibidores de la topoisomerasa tipo I o II tales como camptotecina o doxorrubicina, antibióticos citotóxicos tales como actinomicina, antraciclinas tales como epirubicina, glucocorticoides tales como triamcinolona, inhibidores de la síntesis de proteínas, ADN y/o ARN tales como metotrexato y dacarbaxina, inhibidores de la histona desacetilasa (HDAC) o cualquier otro agente de quimioterapia.
- El agente terapéutico puede ser uno o una combinación de: inmunoterapéuticos o inmunomoduladores, tales como agonistas de TLR; agentes que regulan negativamente las células T reguladoras tales como ciclofosfamida; o agentes diseñados para bloquear puntos de control inmunitarios o estimular rutas de potenciación inmunitaria, incluyendo pero no limitado a anticuerpos monoclonales, tales como un inhibidor de CTLA-4, un inhibidor de PD-1, un inhibidor de PD-L1, un inhibidor de LAG-3, un inhibidor de TIM-3, un inhibidor de VISTA, un inhibidor de CSF1R, un inhibidor de IDO, un inhibidor de CEACAM1, un agonista de GITR, un agonista de 4-1-BB, un inhibidor de KIR, un inhibidor de SLAMF7, un agonista de OX40, un agonista de CD40, un agonista de ICOS o un inhibidor de CD47. En una realización preferida, el agente terapéutico es un inhibidor de CTLA-4 tal como un anticuerpo anti-CTLA-4, un inhibidor de PD1, tal como un anticuerpo anti-PD-1 o un inhibidor de PD-L1 tal como un anticuerpo anti-PD-L1. Tales inhibidores, agonistas y anticuerpos pueden generarse y probarse mediante métodos convencionales conocidos en la técnica.
- Los agentes inmunoterapéuticos también pueden incluir anticuerpos biespecíficos, terapias basadas en células basadas en células dendríticas, linfocitos NK o células T modificadas genéticamente, tales como células CAR-T o células T que expresan receptores de células T modificados genéticamente. Los agentes inmunoterapéuticos también incluyen agentes que se dirigen a una mutación genética específica que se produce en tumores, agentes destinados a inducir respuestas inmunitarias a antígenos tumorales específicos o combinaciones de antígenos tumorales, incluyendo neoantígenos y/o agentes destinados a activar la ruta STING/cGAS, TLR u otra respuesta inmunitaria innata y/o ruta inflamatoria, incluyendo agentes intratumorales.
- Por ejemplo, un virus de la invención puede usarse: en combinación con dacarbazina, un inhibidor de BRAF y o CTLA-4, bloqueo de PD1 o PD-L1 para tratar melanoma; en combinación con taxol, doxorrubicina, vinorelbina, ciclofosfamida y/o gemcitabina para tratar el cáncer de mama; en combinación con 5-fluorouracilo y opcionalmente leucovorina, irinotecán y/u oxaliplatin para tratar el cáncer colorrectal; en combinación con taxol, carboplatino, vinorelbina y/o gemcitabina, bloqueo de PD-1 o PD-L1 para tratar el cáncer de pulmón; en combinación con cisplatino y/o radioterapia para tratar el cáncer de cabeza y cuello.

El agente terapéutico puede ser un inhibidor de la ruta de la idolamina 2,3-dioxigenasa (IDO). Algunos ejemplos de inhibidores de IDO incluyen epacadostat (INCB024360), 1-metil-triptófano, Indoximod (1-metil-D-triptófano), GDC-0919 o F001287.

- 5 El mecanismo de acción de IDO en la supresión de las respuestas inmunitarias antitumorales también puede suprimir las respuestas inmunitarias generadas después de la terapia con virus oncolíticos. La expresión de IDO se induce por la activación del receptor de tipo toll (TLR) y el interferón-γ ambos de los cuales pueden resultar de una infección por virus oncolítico. Una realización del uso de la terapia con virus oncolíticos para el tratamiento del cáncer incluye la combinación de un virus oncolítico, incluyendo un virus que expresa una proteína o proteínas inmunoestimulantes y/o una proteína fusogénica, con un inhibidor de la ruta IDO y opcionalmente, uno o más antagonistas adicionales de una ruta co-inhibitoria inmunitaria y/o uno o más agonistas de una ruta coestimuladora inmunitaria, incluyendo los que se dirigen a CTLA-4, PD-1 y/o PD-L1.
- 10 15 Cuando se usa un agente terapéutico y/o radioterapia junto con un virus de la invención, la administración del virus y el agente terapéutico y/o la radioterapia pueden ser contemporáneas o separadas en el tiempo. La composición de la invención puede administrarse antes, junto con o después del agente terapéutico o la radioterapia. El método de tratamiento del cáncer puede comprender múltiples administraciones del virus de la invención y/o del agente terapéutico y/o radioterapia. Un médico experto será fácilmente capaz de determinar cursos de administración del virus y el agente terapéutico adecuados.
- 20 25 En realizaciones preferidas, en el caso de combinación con uno o más antagonistas de una ruta coinhidatoria inmunitaria, uno o más agonistas de una ruta coestimulante inmunitaria y/u otros agentes potenciadores del sistema inmunológico, el virus de la invención se administra una o varias veces antes de la administración simultánea del antagonista de una ruta coinhidatoria inmunitaria, agonista de una ruta coestimulante inmunitaria y/u otro agente o agentes potenciadores inmunitarios en lo sucesivo, o simultáneamente con la administración del antagonista de una ruta coinhidatoria inmunitaria, agonista de una ruta coestimulante inmunitaria y/u otro agente o agentes potenciadores inmunitarios sin la administración previa del virus de la invención.
- 30 35 40 45 50 55 60 65 El virus de la invención puede administrarse a un sujeto por cualquier vía adecuada. Normalmente, un virus de la invención se administra mediante inyección intratumoral directa, incluyendo a través del uso de guía por imágenes para dirigirse al tumor o tumores. El virus puede administrarse en una cavidad corporal, por ejemplo en la cavidad pleural, la vejiga o por administración intraperitoneal. El virus puede inyectarse en un vaso sanguíneo, preferentemente un vaso sanguíneo que irriga un tumor.
- Los agentes terapéuticos que pueden combinarse con un virus de la invención pueden administrarse a un sujeto humano o animal *in vivo* usando una diversidad de vías y técnicas conocidas. Por ejemplo, la composición puede proporcionarse como una solución, suspensión o emulsión inyectables y se administra a través de inyección parenteral, subcutánea, oral, epidérmica, intradérmica, intramuscular, interarterial, intraperitoneal, intravenosa usando una aguja y jeringuilla convencionales, o usando un sistema de inyección de chorro de líquido. La composición puede administrarse por vía tópica a la piel o al tejido de las mucosas, tal como por vía oral, por vía intraatraqueal, por vía intestinal, por vía sublingual, por vía rectal o por vía vaginal, o se proporciona como un pulverizador finamente dividido adecuado para administración respiratoria o pulmonar. En realizaciones preferidas, las composiciones se administran por infusión intravenosa, por vía oral o directamente en un tumor.
- El virus y/o el agente terapéutico pueden administrarse a un sujeto en una cantidad que sea compatible con la composición de dosificación que será terapéuticamente eficaz. La administración del virus de la invención es para un fin "terapéutico". Como se usa en el presente documento, el término "terapéutico" o "tratamiento" incluye uno o más de los siguientes como su objeto: la prevención de cualquier metástasis o metástasis adicional que se produzca; la reducción o eliminación de síntomas; la reducción o eliminación completa de un tumor o cáncer, un aumento en el tiempo hasta la progresión del cáncer del paciente; un aumento del tiempo de recaída después del tratamiento; o un aumento en el tiempo de supervivencia.
- Puede administrarse tratamiento terapéutico a cánceres de Estadio I, II, III o IV, preferentemente de Estadio II, III o IV, más preferentemente de Estadio III o IV, intervención pre- o posquirúrgica, preferentemente antes de cualquier intervención quirúrgica (ya sea para la resección de una enfermedad primaria o recurrente/metastásica), es decir, mientras permanece el tumor residual.
- El tratamiento terapéutico puede llevarse a cabo después de la inyección directa de la composición del virus en el tejido diana que puede ser el tumor, en una cavidad corporal o un vaso sanguíneo. Como guía, la cantidad de virus administrada está en el caso del VHS en el intervalo de 10^4 a 10^{10} ufp, preferentemente de 10^5 a 10^9 ufp. En el caso del VHS, una dosis inicial más baja (por ejemplo, 10^4 a 10^7 ufp) puede darse a pacientes para seroconvertir pacientes que son seronegativos para el VHS y reforzar la inmunidad en aquellos que son seropositivos, seguido de una dosis más alta que se administrará en lo sucesivo (por ejemplo, 10^6 a 10^9 ufp). Normalmente pueden usarse hasta 20 ml de una composición farmacéutica que consiste esencialmente en el virus y un vehículo o diluyente adecuado farmacéuticamente aceptable para inyección directa en tumores o hasta 50 ml para administración en una cavidad

corporal (que puede estar sujeta a dilución adicional en un diluyente apropiado antes de la administración) o en el torrente sanguíneo. Sin embargo, para algunas aplicaciones de terapia oncolítica también pueden usarse volúmenes mayores o menores, dependiendo del tumor y de la vía y lugar de administración.

- 5 Las vías de administración y las dosis descritas están destinadas únicamente a ser una guía, ya que un médico experto
 será capaz de determinar fácilmente la vía de administración y la dosificación óptimas. La dosificación puede
 determinarse de acuerdo con diversos parámetros, especialmente de acuerdo con la ubicación del tumor, el tamaño
 del tumor, la edad, el peso y la condición del paciente a tratar y la vía de administración. Preferentemente el virus se
 administra mediante inyección directa en el tumor. El virus también puede administrarse mediante inyección en un
 10 vaso sanguíneo o en una cavidad corporal. La vía de administración óptima dependerá de la ubicación y el tamaño
 del tumor. Pueden ser necesarias múltiples dosis para lograr un efecto inmunológico o clínico, que, si se requiere, se
 administrará normalmente entre 2 días y 12 semanas de diferencia, preferentemente con 3 días a 3 semanas de
 15 diferencia. Pueden administrarse dosis repetidas hasta 5 años o más, preferentemente de hasta un mes a dos años
 dependiendo de la velocidad de respuesta del tipo de tumor que se está tratando y la respuesta de un paciente
 particular, y cualquier terapia de combinación que también pueda estar dándose.

Los siguientes Ejemplos ilustran la invención.

Ejemplo 1. Aislados clínicos con efectos antitumorales mejorados

- 20 La especie de virus usada para ejemplificar la invención es VHS, específicamente VHS1. Se tomaron hisopos de
 herpes labiales de más de 20 voluntarios de otra manera sanos. Se usó una muestra de cada hisopo para infectar
 células BHK. Las muestras que contenían VHS1 se identificaron por la presencia de un efecto citopático (CPE) 24-72
 25 horas después de la infección y mediante inmunohistoquímica y se generaron soluciones madre víricas de los aislados
 clínicos primarios a partir de las muestras positivas.

- Las capacidades de los aislados clínicos primarios de VHS1 para matar un panel de líneas celulares derivadas de
 tumores humanos se prueban y se elige la cepa del virus con la mayor capacidad para matar una amplia gama de
 30 estos rápidamente y a dosis bajas. Las líneas de células tumorales usadas para esta comparación son HT29
 (colorrectal), MDA-MB-231 (mama), SK-MEL-28 (melanoma), Fadu (carcinoma de células escamosas), MCF7 (mama),
 A549 (pulmón), MIAPACA-2 (páncreas), CAPAN-1 (páncreas), HT1080 (fibrosarcoma). Las líneas celulares se usan
 para probar el nivel de CPE logrado a un intervalo de MOI y tiempos después de la infección para cada uno de los
 aislados primarios.

- 35 Más específicamente, las líneas celulares tumorales se usan para sembrar placas de cultivo tisular de múltiples pocillos
 de tal manera que sean aproximadamente un 80 % confluentes el día de la infección. Los pocillos representativos de
 cada línea celular tumoral se tripsinizan y se determina el número de células en el pocillo. Estos recuentos celulares
 se usan para determinar el volumen de cada aislado clínico requerido para dar una MOI de 1, 0,1, 0,01 y 0,001. Los
 40 pocillos separados de una línea celular tumoral se infectan con el aislado clínico a estas MOI y se superpone con
 medio de crecimiento y carboximetilcelulosa. Todas las infecciones se llevan a cabo por cuadruplicado. Unos pocillos
 duplicados se incuban durante 24 horas y unos pocillos duplicados se incuban durante 48 horas, ambos a 37 °C, CO₂
 al 5 %, antes de la fijación de las células con glutaraldehído y tinción con cristal violeta. El nivel de lisis celular se
 evalúa después mediante observación a simple vista, microscopio (recuentos celulares) y fotografía o usando un
 ensayo metabólico tal como un ensayo MTT.

- 45 También se llevan a cabo experimentos de curva de crecimiento para evaluar las capacidades de diferentes aislados
 clínicos de replicarse en líneas celulares tumorales *in vitro*. Las líneas celulares tumorales se usan para sembrar placas
 de cultivo tisular de múltiples pocillos de tal manera que sean aproximadamente un 80 % confluentes el día de la
 50 infección. Los recuentos celulares se determinan como anteriormente y se usan para determinar el volumen de virus
 para dar MOI de 1, 0,1, 0,01 y 0,001. Las líneas celulares se infectan por duplicado para MOI y punto de tiempo. Las
 células infectadas se incuban a 37 °C, CO₂ al 5 % y las células se lisan mediante congelación/descongelación a 0, 8,
 16, 24 y 48 horas después de la infección. Los títulos víricos se evalúan mediante un ensayo en placa convencional.

Ejemplo 2. Modificación de aislados clínicos

- 55 En este ejemplo el aislado clínico seleccionado en el Ejemplo 1 (es decir, un virus de la invención) se modifica por
 delección de ICP47 del genoma vírico usando recombinación homóloga con un plásmido que contiene regiones que
 flanquean los nucleótidos 145300 a 145582 de VHS1 (siendo los nucleótidos 145300 a 145582 de VHS1 las
 60 secuencias a eliminar; archivo de Genbank de secuencia de cepa 17 de VHS1 NC_001806.2) entre los que se codifican
 GFP. Se seleccionan las placas de virus que expresan GFP y después se retira la GFP mediante recombinación
 homóloga con las regiones flanqueantes vacías y se seleccionan las placas que no expresan GFP. Esto da como
 resultado un virus con ICP47 eliminado en el que US11 se expresa como una proteína IE ya que ahora está bajo el
 control del promotor ICP47. Después se elimina ICP34.5 usando recombinación homóloga con un plásmido que
 65 contiene regiones que flanquean los nucleótidos 124953 a 125727 de VHS1 (siendo los nucleótidos 124953 a 125727
 de VHS1 las secuencias a eliminar; archivo de Genbank de secuencia de cepa 17 de VHS1 NC_001806.2) entre los
 que se codifica GFP. Las placas de virus que expresan GFP se seleccionan de nuevo y después se retira GFP por

recombinación homóloga con las mismas regiones flanqueantes pero entre las cuales se encuentra ahora un casete de expresión que comprende una versión de codones optimizados de la secuencia de GM-CSF de ratón y una versión de codones optimizados de la secuencia de GALV-R- impulsada por el promotor CMV IE y el promotor RSV respectivamente, en una orientación espalda con espalda y seleccionando de nuevo placas de virus que no expresan GFP. Esta construcción de virus se realiza usando métodos que son convencionales en la técnica.

La estructura del virus resultante se muestra en la Figura 1 (panel superior). Las secuencias de mGM-CSF y GALV-R- se muestran en SEQ ID NO 2 y 8 respectivamente. La estructura del virus resultante se confirma mediante digestión por restricción y transferencia Southern, la expresión de GM-CSF se confirma mediante ELISA y la expresión de GALV-R- se confirma mediante infección de células tumorales HT1080 humanas y la observación de placas sinciales.

Los virus también se construyen usando procedimientos similares que no tienen inserción en ICP34.5, o que solo han insertado el gen para GM-CSF o GALV-R- de ratón. Las estructuras de estos virus también se muestran en la Figura 1.

Para uso humano, se usa hGM-CSF, cuya secuencia para una versión optimizada de codones se muestra en SEQ ID NO 4.

Ejemplo 3. Expresión de dos moléculas inmunoestimulantes de un virus que expresa una proteína fusogénica

Se construye un virus similar al virus que expresa GALV-R- y mGM-CSF descrito anteriormente, pero que expresa adicionalmente versiones de CD40L. Aquí, en lugar de usar un plásmido que contiene regiones flanqueantes de ICP34.5 y un casete de expresión que comprende GM-CSF y GALV-R, impulsado por un promotor de CMV y uno RSV, un plásmido que contiene regiones flanqueantes de ICP34.5 y un casete de expresión que comprende GM-CSF, GALV y CD40L impulsados por un promotor de CMV, uno de RSV y uno de SV40 se usa para la recombinación con el virus que contiene GFP insertado en ICP34.5 y se seleccionan de nuevo placas que no expresan GFP.

Ejemplo 4. El efecto de la expresión combinada de una proteína fusogénica y una molécula inmunoestimulante de un virus oncolítico en modelos de tumores de ratón

La proteína GALV R- provoca la fusión de célula a célula en células humanas pero no en células de ratón porque el receptor PiT-1 requerido para que se produzca la fusión celular tiene una secuencia en ratones que no permite que se produzca la fusión celular. Como resultado, las células tumorales de ratón que expresan PiT-1 humana se preparan primero usando métodos convencionales en la técnica. El PiT-1 humano se clona en un vector lentivírico que también comprende un gen marcador seleccionable. El vector se transfecta en células tumorales de cáncer colorrectal de ratón CT26 diana y se seleccionan clones resistentes al marcador seleccionable para generar células CT26/PiT-1. La expresión de PiT-1 se confirma mediante transferencia Western en células no transfectadas y en células transfectadas con lentivirus que expresan PiT-1 y mediante transfección de un plásmido que expresa GALV-R- y confirmación de que se produce la fusión celular.

La utilidad del virus se demuestra administrando células CT26/PiT-1 en ambos flancos de ratones Balb/c y permitiendo que los tumores CT26/PiT-1 crezcan hasta aproximadamente 0,5 cm de diámetro.

Después se administran los siguientes tratamientos a grupos de ratones (cinco por grupo), en un flanco de cada ratón solo 3 veces por semana durante dos semanas:

- 50 µl de solución salina (1 grupo);
- 50 µl de 10^5 ufp/ml, 10^6 ufp o 10^7 ufp/ml del VHS sin gen insertado (3 grupos);
- 50 µl de 10^5 ufp/ml, 10^6 ufp/ml o 10^7 ufp/ml del VHS con solo GM-CSF de ratón insertado (3 grupos);
- 50 µl de 10^5 ufp/ml, 10^6 ufp/ml o 10^7 ufp/ml del virus con solo GALV-R insertado (3 grupos); o
- 50 µl de 10^5 ufp/ml, 10^6 ufp/ml o 10^7 ufp/ml del virus con ambos GM-CSF y GM-CSF de ratón insertados (3 grupos).

Después se observan los efectos sobre el crecimiento del tumor durante hasta un mes. Se observa un control y reducción de tumores superior en tumores injectados y no injectados con el virus que expresa GM-CSF y GALV-R- en comparación con los otros grupos, incluyendo a través de una curva de respuesta a la dosis mejorada.

Ejemplo 5. El efecto de la expresión combinada de una proteína fusogénica y una molécula inmunoestimulante de un virus oncolítico sobre el efecto terapéutico del bloqueo de puntos de control inmunológico en modelos de tumores de ratón

Se repite el experimento del Ejemplo 3 anterior pero a los ratones se les dosifica adicionalmente cada dos semanas por vía intraperitoneal con un anticuerpo dirigido a PD-1 de ratón (10 mg/kg; Bioxcell RMP-1-14 en los mismos días que la dosificación del virus) o un anticuerpo dirigido a CTLA-4 de ratón (10 mg/kg; Bioxcell 9H10 los mismos días que la dosificación del virus). Se añade un grupo adicional de ratones que no reciben tratamiento con anticuerpos. Más específicamente, los grupos de ratones reciben (1) solución salina, (2) VHS sin gen insertado, (3) VHS con ambos GM-CSF y GALV-R insertados como en el Ejemplo 3, (4) anticuerpo PD-1, (5) anticuerpo CTLA-4, (6) VHS sin gen

insertado más anticuerpo PD-1, (7) VHS sin gen insertado más anticuerpo CTLA-4, (8) VHS con anticuerpos GM-CSF y GALV-R- y PD-1 o (9) VHS con anticuerpos GM-CSF y GALV-R- y CTLA-4. Se observa un control y encogimiento superior del tumor en tumores inyectados y no inyectados con el virus que expresa GM-CSF y GALV-R- junto con el anticuerpo anti-PD-1 o el anticuerpo anti-CTLA-4 en comparación con los otros grupos, incluyendo a través de una curva de respuesta a la dosis mejorada.

Ejemplo 6. Colección de aislados clínicos

La especie de virus usada para exemplificar la invención es VHS, específicamente VHS1. Para exemplificar la invención, 10 se reclutaron 181 voluntarios que padecían herpes labial recurrente. Estos voluntarios recibieron kits de recolección de muestras (incluyendo tubos de recolección Sigma Virovult) y los usaron para recoger hisopos del herpes labial cuando aparecieron después de lo cual estas muestras se enviaron a Replimune, Oxford RU. De junio de 2015 a febrero de 2016, se recibieron hisopos de 72 voluntarios. Se usó una muestra de cada hisopo para infectar células BHK. De éstas, 36 muestras de virus vivos se recuperaron después de la siembra en placa y el crecimiento en células BHK. Estas muestras se detallan en la Tabla 1.

Tabla 1: Detalles de las muestras de hisopos probados y resultado

Número de muestra	Virus recuperado
RH001A	No
RH001B	
RH002A	Sí
RH003A	No
RH004A	Sí
RH004B	
RH005A	No
RH005B	
RH006A	No
RH006B	
RH007A	Sí
RH007B	
RH007C	
RH008A	No
RH008B	
RH008C	
RH009A	No
RH009B	
RH010A	No
RH011A	No
RH011B	
RH011C	
RH012A	No
RH013A	No
RH014A	Sí
RH014B	
RH015A	Sí
RH016A	No
RH016B	
RH017A	Sí
RH018A	Sí
RH018B	
RH018C	
RH019A	No
RH019B	
RH019C	
RH020A	Sí-solo RH020A
RH020B	
RH020C	
RH021A	Sí
RH021B	
RH022A	Sí
RH022B	
RH023A	Sí
RH024A	No

ES 2 943 150 T3

(continuación)

Número de muestra	Virus recuperado
RH025A	
RH025B	Sí-solo RH025B
RH026A	Sí
RH027A	
RH027B	
RH027C	No
RH028A	
RH028B	No
RH028C	
RH029A	No
RH030A	No
RH031A	
RH031B	
RH031 C	
RH031D	Sí - RH031A a RH031D
RH031E	
RH031F	
RH032A	No
RH033A	
RH033B	No
RH033C	
RH034A	
RH034B	No
RH034C	
RH035A	No
RH036A	Sí
RH037A	Sí
RH038A	Sí
RH039A	
RH039B	No
RH039C	
RH040A	
RH040B	Sí
RH040C	
RH041A	Sí
RH042A	Sí
RH043A	
RH043B	No
RH043C	
RH044A	No
RH045A	No
RH046A	Sí
RH047A	
RH047B	Sí - RH047A y RH047C
RH047C	
RH048A	No
RH049A	
RH049B	No
RH049C	
RH050A	No
RH051A	
RH051B	Sí
RH052A	
RH052B	Sí - solo RH052A
RH053A	No
RH054A	No
RH055A	
RH055B	No
RH056A	Sí
RH057A	No
RH058A	
RH058B	Sí

(continuación)

Número de muestra	Virus recuperado
RH059A	No
RH060A	No
RH061A	Sí
RH062A	No
RH063A	No
RH064A	Sí
RH065A	Sí
RH065B	
RH066A	No
RH067A	
RH067B	
RH068A	No - contaminado
RH069A	
RH069A	No
RH070A	Sí
RH071A	Sí
RH072A	No
RH073A	
RH073B	Sí
RH074A	
RH074B	No
RH075A	No
RH076A	No
RH078A	
RH078B	No
RH079B	
RH079B	Sí
RH080A	No
RH081A	Sí
RH082A	
RH082B	No
RH083A	
RH083B	Sí
RH084A	
RH084B	
RH084C	Sí
RH085A	No
RH086A	No
RH087A	
RH087B	Sí - solo RH078B

Las designaciones A, B, C, etc. indican múltiples hisopos del mismo voluntario.

Ejemplo 7. Identificación de aislamientos clínicos con efectos antitumorales mejorados

- 5 Se probó la capacidad de los aislados clínicos primarios de VHS1 para destruir un panel de líneas celulares derivadas de tumores humanos. Las líneas de células tumorales utilizadas para esta comparación fueron HT29 (colorrectal), MDA-MB-231 (mama), SK-MEL-28 (melanoma), Fadu (carcinoma de células escamosas), MCF7 (mama), A549 (pulmón), MIAPACA-2 (páncreas) y HT1080 (fibrosarcoma). Las líneas celulares se usaron para probar el nivel de CPE alcanzado en un intervalo de MOI y tiempos posteriores a la infección para cada uno de los aislados clínicos primarios.
- 10 Los experimentos se realizaron en paralelo usando 5 a 8 de las nuevas cepas de virus al mismo tiempo. Las cepas de virus se colocaron en placas por duplicado en un intervalo de MOI (0,001-1) y se evaluó el grado de CPE después de la tinción con violeta cristal a las 24 y 48 horas después de la infección. Se puntuaron las cepas víricas que fueron más eficaces matando las líneas de células tumorales y las dos o tres cepas más eficaces de cada cribado de 5-8 cepas se identificaron y se compararon en paralelo en un experimento adicional para identificar las cepas superiores para un desarrollo adicional.
- 15 20 Los exámenes iniciales demostraron una variabilidad sustancial en la capacidad de las diferentes cepas para destruir las diferentes líneas de células tumorales. De unas 29 cepas probadas inicialmente, Se identificaron 8 cepas de interés en las pantallas iniciales para una comparación adicional. Estas fueron las cepas RH004A, RH015A, RH018A,

RH021A, RH023A, RH31A, RH040A y RH047A.

Las 8 cepas para comparación adicional se probaron en paralelo en el panel de líneas de células tumorales, y se evaluó su capacidad relativa para destruir estas líneas de células tumorales después de la tinción con violeta cristal y la observación de CPE. La Figura 3 muestra un punto de tiempo representativo y una MOI para estos virus en cada uno de los virus en cada una de las líneas celulares que demuestran la capacidad diferencial de los virus para destruir las líneas celulares tumorales diana observadas.

Hubo una variación sustancial entre las cepas y se encontró que, aunque una cepa en particular puede ser particularmente eficaz para matar una línea celular, no necesariamente es particularmente eficaz en matar otras líneas celulares también, demostrando además el grado de variabilidad en la capacidad de las cepas clínicas de VHS para matar células tumorales de diferentes tipos.

La Figura 3 también indica cuál de las cepas de virus fue la mejor y la segunda mejor para matar cada una de las líneas celulares, permitiendo que las cepas de virus estén ordenadas por rango en cuanto a su capacidad relativa general para matar el panel de líneas celulares en su conjunto. Este análisis demostró que las cepas RH004A, RH015A, RH018A, RH031A y RH040A fueron relativamente más eficaces que las otras cepas y estas cinco cepas se eligieron para un posible desarrollo posterior como agentes oncolíticos. De estas cinco cepas principales, el orden de rango relativo basado en sus capacidades para matar a través del panel de líneas celulares fue RH018A > RH004A > RH031A > RH040A > RH015A.

Más específicamente, en estos experimentos, las líneas de células tumorales se usaron para sembrar placas de cultivo de tejidos de múltiples pocillos de modo que fueran aproximadamente un 80 % confluentes el día de la infección. Se trissinizaron pocillos representativos de cada línea de células tumorales y se determinó el número de células en el pocillo. Estos recuentos de células se usan para determinar el volumen de cada aislamiento clínico necesario para dar una MOI de 1, 0,1, 0,01 y 0,001. Se infectaron pocillos separados de una línea de células tumorales con el aislado clínico a estas MOI. Todas las infecciones se realizan por cuadruplicado. Los pocillos duplicados se incubaron durante 24 horas y los pocillos duplicados se incubaron durante 48 horas, ambos a 37 °C, 5 % de CO₂, antes de la fijación de las células con glutaraldehído y tinción con violeta cristal. El nivel de lisis celular se evaluó después mediante observación general, microscopía (recuento de células) y fotografía.

La cepa RH018A, la cepa clasificada en primer lugar de todas las cepas probadas se comparó con una cepa "promedio" del cribado (es decir, una cepa que no estaba entre las 8 primeras, pero tampoco estaba en el grupo de cepas que fueron menos eficaces y destruyeron el panel de líneas de células tumorales). Esta comparación mostró que la Cepa RH018A era aproximadamente 10 veces más eficaz que esta cepa promedio (Cepa RH065A) para matar las líneas de células tumorales (es decir, se necesitaba aproximadamente 10 veces menos de la Cepa RH018A para matar una proporción igual de células que la Cepa RH065A). Esto se muestra en la Figura 4.

Ejemplo 8. Modificación de aislados clínicos

En este Ejemplo los aislados clínicos seleccionados en el Ejemplo 7 se modificaron por delección de ICP34.5 del genoma vírico usando recombinación homóloga con un plásmido que contenía regiones que flanqueaban el gen que codifica ICP34.5 (nucleótidos 143680-145300 y 145.582-147.083; archivo Genbank de secuencia de cepa 17 de VHS1 NC_001806.2) entre los que se codifican GFP y la glucoproteína fusogénica GALV-R-. La estructura de este virus, (Virus 10) se muestra en la Figura 5.

También se construyeron virus adicionales basados en la Cepa RH018A en los que tanto ICP34.5 como ICP47 (usando regiones flanqueantes que contienen los nucleótidos 123464-124953 y 125727-126781; archivo Genbank de secuencia de cepa 17 de VHS1 NC_001806.2) se eliminaron (dando como resultado la colocación de US 11 bajo el control del promotor ICP47). Para construir estos virus, primero se seleccionaron placas de virus que expresan GFP, expresado GFP en lugar de ICP47. Después se retiró la GFP mediante recombinación homóloga con las regiones flanqueantes vacías y se seleccionaron las placas que no expresaban GFP. Esto dio como resultado un virus con ICP47 eliminado en el que US11 se expresa como una proteína IE ya que ahora está bajo el control del promotor ICP47. Después se eliminó ICP34.5 usando recombinación homóloga con un plásmido que contiene regiones que flanquean los nucleótidos 143680-145300 y 145.582-147.083 de VHS1; archivo de Genbank de secuencia de cepa 17 de VHS1 NC_001806.2) entre los que se codifica GFP. Se seleccionaron de nuevo las placas de virus que expresaban GFP y después se retiró la GFP mediante recombinación homóloga con las mismas regiones flanqueantes pero entre las cuales se encuentra ahora un casete de expresión que comprende los genes a insertar. Los virus que se construyeron se muestran en las Figuras 1 y 5. Estos incluyeron una versión optimizada de codones de la secuencia de GM-CSF de ratón y una versión optimizada de codones de la secuencia R de GALV impulsada por el promotor CMV IE y el promotor RSV respectivamente, en una orientación espalda con espalda y seleccionando de nuevo placas de virus que no expresan GFP. Esta construcción de virus se realizó usando métodos que son convencionales en la técnica.

Las secuencias de mGM-CSF y GALV-R- se muestran en SEQ ID NO 2 y 8 respectivamente. La estructura del virus resultante se confirmó mediante PCR, la expresión de GM-CSF se confirmó mediante ELISA y la expresión de GALV-

R- se confirmó mediante infección de células tumorales HT1080 humanas y la observación de placas sinciales.

Para uso humano, se usa hGM-CSF, cuya secuencia para una versión optimizada de codones se muestra en SEQ ID NO 4. La estructura de este virus se muestra en la Figura 5. La expresión de GM-CSF de ratón o humano a partir de los virus 16, 17 y 19 se muestra en la Figura 6.

Ejemplo 9. Un virus de la invención modificado para su uso oncolítico y que expresa una glucoproteína fusogénica muestra una mayor destrucción de células tumorales *in vitro* en comparación con un virus que no expresa una glucoproteína fusogénica

El Virus 10 (véase la Figura 5), basado en la cepa clínica RH018A en la que se elimina ICP34.5 y que expresa GALVR- y GFP, se comparó *in vitro* con un virus que expresa solo GFP (Virus 12). El Virus 10 mostró una mayor destrucción en un panel de líneas de células tumorales humanas en comparación con el Virus 12, como se muestra en la Figura 7.

Ejemplo 10. Un virus de la invención modificado para uso oncolítico muestra una mayor destrucción de células tumorales en comparación con un virus modificado similarmente que no es de la invención

El Virus 17 (véase la Figura 5), basado en la Cepa clínica RH018A en la que se eliminan ICP34.5 e ICP47 y que expresa GALVR- y GM-CSF, se comparó *in vitro* con un virus conocido en que también se eliminó ICP34.5 e ICP47 pero que no derivó de una cepa de la invención y que expresa solo GM-CSF. El Virus 17 mostró una mayor destrucción en un panel de líneas de células tumorales humanas en comparación con el virus anterior, como se muestra en la Figura 8.

Ejemplo 11. Un virus de la invención modificado para uso oncolítico trata eficazmente los tumores de ratón *in vivo*

El Virus 16 se probó en ratones que albergaban tumores de linfoma A20 en los flancos izquierdo y derecho. Primero se implantó un millón de células tumorales en ambos flancos de ratones Balb/c y se dejó que los tumores crecieran hasta 0,5-0,7 cm de diámetro. Despues se inyectaron los tumores del flanco derecho 3 veces (días alternos) con vehículo (10 ratones) o 5x10^{exp6} ufp del Virus 16 (10 ratones) y se observaron los efectos sobre el tamaño del tumor durante 30 días más. Esto demostró que tanto los tumores inyectados como los no inyectados se trajeron eficazmente con el Virus 16 (véase la Figura 9).

Ejemplo 12. El efecto de la expresión combinada de una proteína fusogénica y una molécula inmunoestimulante de un virus oncolítico de la invención en un modelo de tumor de rata

La proteína GALV R- provoca la fusión de célula a célula en células humanas pero no en células de ratón. Sin embargo, GALV R- provoca fusión en células de rata.

La utilidad del virus se demostró adicionalmente administrando células 9L en los flancos de ratas Fischer 344 y permitiendo que los tumores 9L crecieran hasta aproximadamente 0,5 cm de diámetro.

Los siguientes tratamientos se administraron después a grupos de ratas (diez por grupo), en un solo flanco de cada rata tres veces por semana durante tres semanas:

- 50 µl de vehículo;
- 50 µl de 10⁷ ufp/ml de Virus 19 (expresa mGM-CSF pero no GALV R-);
- 50 µl de 10⁷ ufp/ml de Virus 16 (expresa tanto GM-CSF de ratón como GALV-R-).

A continuación, se observaron los efectos sobre el crecimiento tumoral durante ≈30 días más. Esto demostró un control y una reducción del tumor superior con el virus que expresa GALV-R- en tumores tanto inyectados como no inyectados, demostrando efectos sistémicos mejorados. Esto se muestra en la Figura 15. La Figura 10 muestra que el virus que expresa GALV (Virus 15) también muestra una mayor destrucción de células 91 de rata *in vitro* en comparación con un virus que no expresa GALV (Virus 24).

Ejemplo 13. Un virus de la invención modificado para uso oncolítico es sinérgico con el bloqueo de puntos de control inmunológico en modelos de tumores de ratón

El Virus 16 se probó en ratones que albergaban tumores CT26 en los flancos izquierdo y derecho. Primero se implantó un millón de células tumorales en ambos flancos de ratones Balb/c y se dejó que los tumores crecieran hasta 0,5-0,6 cm de diámetro.

Despues se trajeron grupos de 10 ratones con:

- Vehículo (3 inyecciones en los tumores del flanco derecho cada dos días);

- 5x10^{exp6} ufp de Virus 16 inyectados en el tumor del flanco derecho cada dos días;
 - anti-PD1 de ratón solo (10 mg/kg i.p. cada tres días, clon RMP1-14 de BioXCell);
 - anti-CTLA-4 de ratón (3 mg/kg i.p. cada tres días, clon 9D9 de BioXCell);
 - anti-PD1 de ratón junto con el Virus 16;
 - 5 - anti-CTLA4 de ratón junto con el Virus 16;
 - 1-metil tripotófano (inhibidor de IDO (5 mg/ml en agua para beber));
 - anti-PD1 de ratón junto con 1-metil tripotófano;
 - anti-PD1 de ratón junto con 1-metil tripotófano y Virus 16;
- 10 Se observaron los efectos sobre el tamaño del tumor durante 30 días más. Se demostró una mayor reducción del tumor en animales tratados con combinaciones de virus y bloqueo de puntos de control que en animales tratados con los grupos de tratamiento únicos (véase la Figura 11). También se demostró una reducción mejorada del tumor con el Virus 16 junto con la inhibición tanto de anti-PD1 como de IDO en comparación con el Virus 16 junto con solo anti-PD1 (véase la Figura 11).
- 15 15 También se observó una actividad mejorada del Virus 16 en combinación con el bloqueo del punto de control inmunológico en los tumores A20 (Figura 12).
- Ejemplo 14. El efecto de la expresión de una proteína fusogénica de un virus oncolítico de la invención en modelos de xenoinjerto humano en ratones inmunodeficientes**
- 20 La proteína GALV R- provoca la fusión de célula a célula en células humanas pero no en células de ratón. Sin embargo, pueden usarse tumores de xenoinjerto humano desarrollados en ratones inmunodeficientes para evaluar los efectos de la expresión de GALV sobre la eficacia antitumoral.
- 25 25 La utilidad del virus por lo tanto se demostró adicionalmente mediante la administración de células de cáncer de pulmón humano A549 en los flancos de ratones desnudos y permitiendo que los tumores crecieran hasta aproximadamente 0,5 cm de diámetro.
- 30 30 Los siguientes tratamientos se administraron después a grupos de ratones (diez por grupo), en el flanco que contiene el tumor de cada ratón tres veces durante una semana:
- 50 µl de vehículo;
 - 50 µl de 10⁷ ufp/ml de Virus 16 (expresa tanto GM-CSF de ratón como GALV-R-);
 - 35 - 50 µl de 10⁶ ufp/ml de Virus 16;
 - 50 µl de 10⁵ ufp/ml de Virus 16;
 - 50 µl de 10⁷ ufp/ml de Virus 19 (expresa solo GM-CSF de ratón);
 - 50 µl de 10⁶ ufp/ml de Virus 19;
 - 50 µl de 10⁵ ufp/ml de Virus 19.
- 40 40 A continuación, se observaron los efectos sobre el crecimiento tumoral durante ≈30 días más. Este experimento demostró un control y una contracción superiores del tumor con el virus que expresa GALV-R- en ambos modelos tumorales (véase la Figura 14).
- 45 **Ejemplo 15. Expresión de dos moléculas inmunoestimulantes de un virus que expresa una proteína fusogénica**
- 50 Se construyeron virus similares a los virus que expresan GALV-R- y mGM-CSF descritos anteriormente (Virus 16), pero expresan adicionalmente versiones de ratón de CD40L (virus 32), ICOSL (virus 36), OX40L (virus 35), 4-1BBL (virus 33) y GITRL (virus 34). Aquí, en lugar de usar un plásmido que contiene regiones flanqueantes de ICP34.5 y un casete de expresión que comprende GM-CSF y GALV-R, impulsado por un promotor de CMV y uno RSV, un plásmido que contiene regiones flanqueantes de ICP34.5 y un casete de expresión que comprende GM-CSF, GALV y las proteínas adicionales impulsadas por un promotor de CMV, uno de RSV y uno de MMLV respectivamente se utilizaron para la recombinación con un virus que contiene GM-CSF, GALV y GFP insertados en ICP34.5. Se seleccionaron de nuevo las placas que no expresaban GFP. La inserción correcta se confirmó mediante PCR y la expresión mediante transferencia Western y/o ELISA para el gen insertado adicional. Los virus se muestran en la Figura 5. De manera similar, también se construyeron virus que expresan CTLA-4 anti-ratón y anti-humano además de GALV y mGM-CSF (Virus 27 y 31 en la Figura 5 y véase también la Figura 13). Los efectos de los virus que expresan anti-CTLA-4 de ratón (virus 27), mCD40L (virus 32), m4-1BBL (virus 33) o mOX40L (virus 35) además de mGM-CSF y GALVR- *in vivo* se muestra en la Figura 16 que mostró una actividad mejorada en tumores A20 en comparación con el virus 16 (expresa mGM-CSF y GALVR-). En estos experimentos, se indujeron tumores en ambos flancos de los ratones y se inyectó virus o vehículo solo en el tumor del flanco derecho. La dosis de virus utilizada fue de 5x10⁴ ufp (50 µl de 1x10⁶ ufp/ml en cada caso), administrado tres veces durante una semana. Este nivel de dosis de virus es subterapéutico para tumores no inyectados para el virus 16, lo que permite ver claramente los beneficios de la administración de moléculas adicionales codificadas por los virus 27, 32, 33 y 35.

Información de depósito

Las siguientes cepas de VHS1 se depositaron en la ECACC, Culture Collections, Public Health England, Porton Down, Salisbury, SP4 0JG, Reino Unido el 19 de diciembre de 2016 por Replimune Limited y se les asignaron los números de registro indicados:

- | | |
|----|---|
| 5 | RH004A - Número de registro 16121902
RH015A - Número de registro 16121903
RH018A - Número de registro 16121904
RH021A - Número de registro 16121905 |
| 10 | RH023A - Número de registro 16121906
RH031A - Número de registro 16121907
RH040B - Número de registro 16121908
RH047A - Número de registro 16121909. |

REIVINDICACIONES

1. Un virus oncolítico que es una cepa del virus del herpes simple (VHS) 1

- 5 RH018A que tiene el número de registro ECCAC 16121904;
 RH004A que tiene el número de registro ECCAC 16121902;
 RH031A que tiene el número de registro ECCAC 16121907;
 RH040B que tiene el número de registro ECCAC 16121908;
 RH015A que tiene el número de registro ECCAC 16121903;
 10 RH021A que tiene el número de registro ECCAC 16121905;
 RH023A que tiene el número de registro ECCAC 16121906; o
 RH047A que tiene el número de registro ECCAC 16121909.

2. El virus de la reivindicación 1, que es la cepa RH018A que tiene el número de registro ECCAC 16121904.

- 15 3. Un virus oncolítico que es una cepa modificada del virus del herpes simple (VHS) 1

- 20 RH018A que tiene el número de registro ECCAC 16121904;
 RH004A que tiene el número de registro ECCAC 16121902;
 RH031A que tiene el número de registro ECCAC 16121907;
 RH040B que tiene el número de registro ECCAC 16121908;
 RH015A que tiene el número de registro ECCAC 16121903;
 RH021A que tiene el número de registro ECCAC 16121905;
 25 RH023A que tiene el número de registro ECCAC 16121906; o
 RH047A que tiene el número de registro ECCAC 16121909,
 que comprende:

- (a) una mutación que evita la expresión de ICP34.5, ICP6 y/o timidina quinasa por el VHS;
 (b) una o más moléculas inmunoestimulantes o uno o más genes que codifican moléculas inmunoestimulantes;
 30 (c) uno o más genes que codifican proteínas fusogénicas.
 y/o

4. El virus de la reivindicación 3, que es una cepa modificada RH018A que tiene el número de registro ECCAC 16121904, que comprende:

- 35 (a) una mutación que evita la expresión de ICP34.5, ICP6 y/o timidina quinasa por el VHS;
 (b) una o más moléculas inmunoestimulantes o uno o más genes que codifican moléculas inmunoestimulantes; y/o
 (c) uno o más genes que codifican proteínas fusogénicas.

40 5. El virus de la reivindicación 3 o la reivindicación 4, en donde el virus:

- (a) no expresa ICP34.5 funcional;
 (b) no expresa ICP47 funcional; y/o
 (c) expresa el gen US11 como un gen temprano inmediato.

45 6. El virus de una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, que comprende:

- (a) una o más moléculas inmunoestimulantes o uno o más genes que codifican moléculas inmunoestimulantes; y/o
 (b) uno o más genes que codifican proteínas fusogénicas.

50 7. El virus de una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6, en donde:

- (a) la proteína fusogénica se selecciona del grupo que consiste en la proteína G del virus de la estomatitis vesicular (VSV), sincicina-1, sincicina-2, proteína F del virus de simio 5 (SV5), proteína H del virus del sarampión (MV), proteína MV F, proteína F del virus respiratorio sincicial (RSV) y una glucoproteína del virus de la leucemia del mono gibón (GALV), virus de la leucemia murina (MLV), virus del mono Mason-Pfizer (MPMV) o virus de la anemia infecciosa equina (EIAV) del que se ha eliminado el péptido R;

- y/o
 (b) la molécula inmunoestimulante es GM-CSF, IL-2, IL-12, IL-15, IL-18, IL-21, IL-24, un interferón de tipo I, interferón gamma, un interferón de tipo III, TNF alfa, un antagonista de TGF beta, un antagonista del punto de control immunológico o un agonista de una ruta potenciadora inmunitaria incluyendo ligando de CD40 (CD40L), ligando de ICOS, ligando de GITR, ligando 4-1-BB, ligando de OX40 o ligando de flt3.

8. El virus de una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 7, en donde:

- 65 (a) la proteína fusogénica es la glucoproteína del virus de la leucemia del mono gibón (GALV) y tiene el péptido

transmembrana R mutado o retirado (GALV-R-); y/o
(b) la molécula inmunoestimulante es GM-CSF, GITRL, ICOSL, 4-1-BBL, OX40L o CD40L, o las moléculas inmunoestimulantes son GM-CSF y GITRL, OX40L, 4-1-BBL, ICOSL o CD40L.

5 9. El virus de una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 8, en donde:

(a) el gen que codifica una proteína fusogénica y/o el gen que codifica una molécula inmunoestimulante que se insertan en el locus que codifica ICP34.5, ya sea por inserción, o eliminación parcial o total, cada uno bajo control regulatorio separado, opcionalmente en una orientación espalda con espalda en relación entre sí; y/o
10 (b) la secuencia del gen que codifica la proteína fusogénica y/o la secuencia del gen que codifica la molécula inmunoestimulante tiene un codón optimizado para aumentar los niveles de expresión en las células diana.

10. El virus de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 9, que expresa tres genes heterólogos, en donde:

15 (a) cada uno de los tres genes heterólogos está impulsado por un promotor diferente seleccionado del promotor de CMV, el promotor de RSV, el promotor de SV40 y un promotor de LTR retrovírico, tal como el LTR retrovírico de MMLV; y/o
20 (b) cada uno de los tres genes heterólogos está terminado por una secuencia de poliadenilación diferente seleccionada de las secuencias de poliadenilación de BGH, SV40, HGH y RBG.

11. El virus de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 9, que expresa cuatro genes heterólogos impulsados por cada uno del promotor de CMV, el promotor de RSV, el promotor de SV40 y un promotor de LTR retrovírico, tal como el promotor de LTR retrovírico de MMLV, respectivamente, y/o terminados por cada una de las 25 secuencias de poliadenilación de BGH, SV40, HGH y RBG, respectivamente.

12. Una composición farmacéutica que comprende un virus de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

30 13. El virus de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 para su uso en un método de tratamiento del cuerpo humano o animal mediante terapia.

14. El virus de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 para su uso en un método de tratamiento de cáncer.

35 15. El virus para su uso de acuerdo con la reivindicación 14, en donde el método comprende administrar un agente anticáncer adicional.

40 16. El virus para su uso de acuerdo con la reivindicación 15, en donde el agente anticáncer adicional se selecciona de un antagonista de una ruta co-inhibitoria inmunitaria, tales como un inhibidor de CTLA-4, un inhibidor de PD-1, un inhibidor de PD-L1, un inhibidor de LAG-3, un inhibidor de TIM-3, un inhibidor de VISTA, un inhibidor de CSF1R, un inhibidor de IDO, un inhibidor de CD47, un inhibidor de KIR, un inhibidor de SLAMF7 o un inhibidor de CEACAM1, un agonista de una ruta coestimuladora inmunitaria, tales como un agonista de GITR, un agonista de 4-1-BB, un agonista de OX40, un agonista de CD40 o un agonista de ICOS, radiación y/o quimioterapia, un agente que se dirige a una mutación genética específica que se produce en los tumores, un agente destinado a inducir una respuesta inmunitaria 45 a uno o más antígeno o antígenos tumorales o neoantígeno o neoantígenos, un producto celular derivado de células T o linfocitos NK, un agente destinado a estimular el STING, cGAS, TLR u otra respuesta inmunitaria innata y/o ruta inflamatoria, un segundo virus opcionalmente un virus oncolítico, un inhibidor de la ruta de la indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO) y combinaciones de los mismos.

50 17. El virus para su uso de acuerdo con la reivindicación 15 o 16, en donde:

(a) el agente anticáncer adicional es un anticuerpo;
(b) el método comprende administrar un inhibidor de la ruta de la indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO) y un antagonista adicional de una ruta coinhibitoria inmunitaria o un agonista de una ruta coestimuladora inmunitaria;
55 (c) el virus y el agente o agentes anticancerosos adicionales se administran por separado o al mismo tiempo; y/o
(d) el cáncer es un tumor sólido.

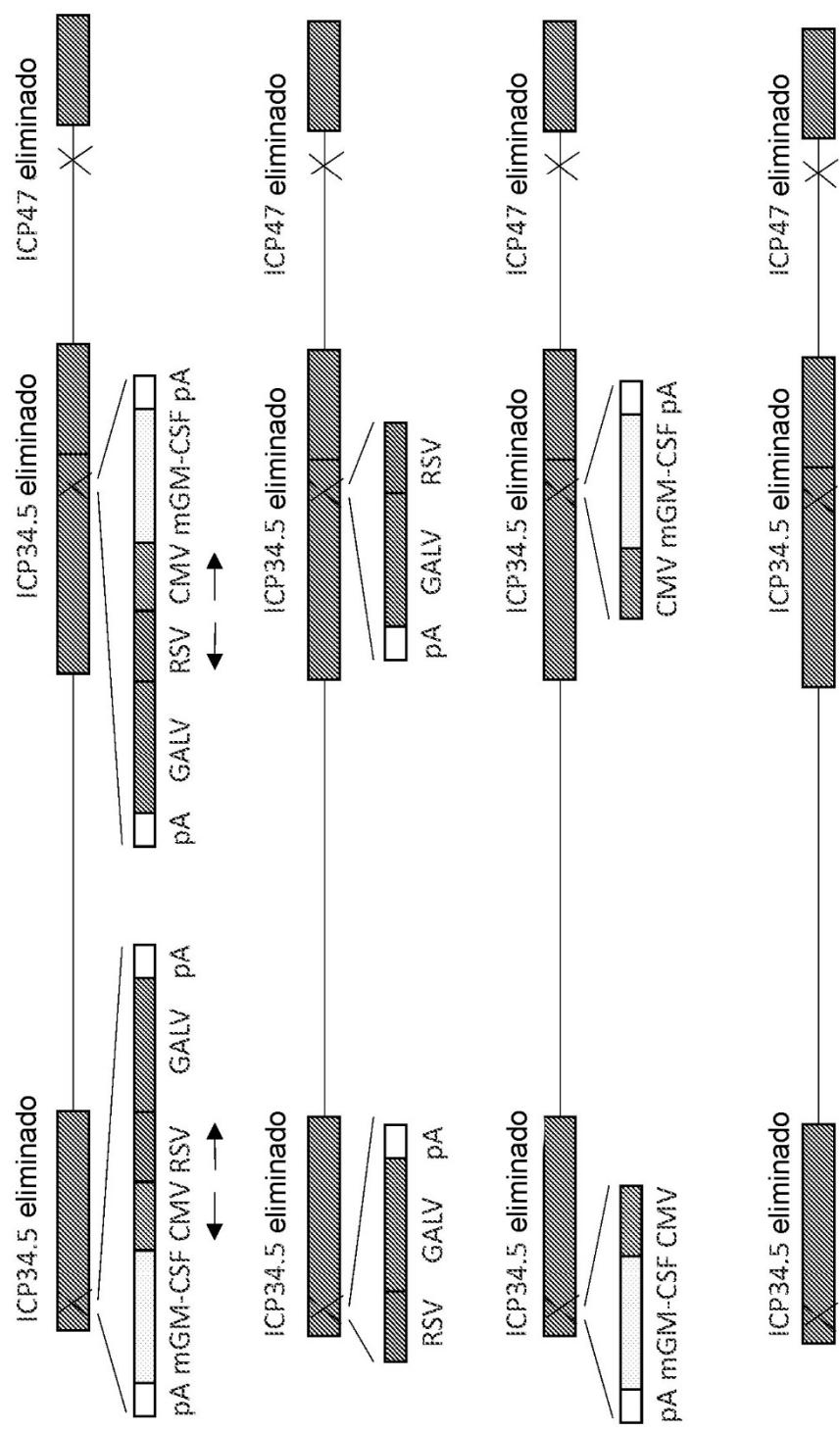
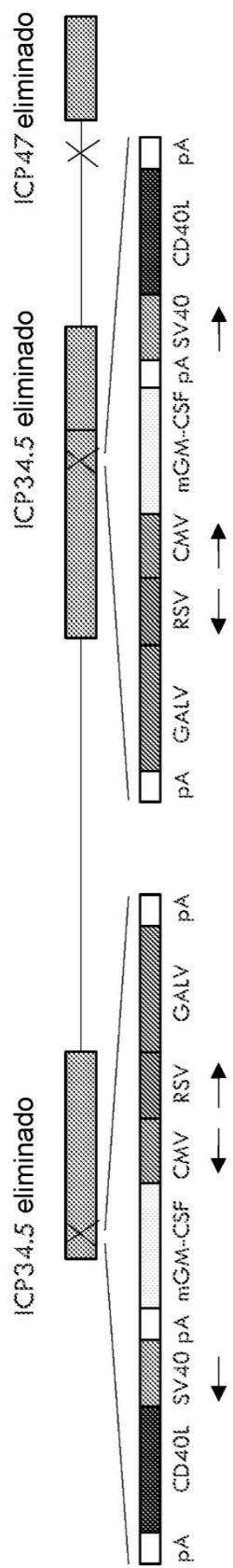
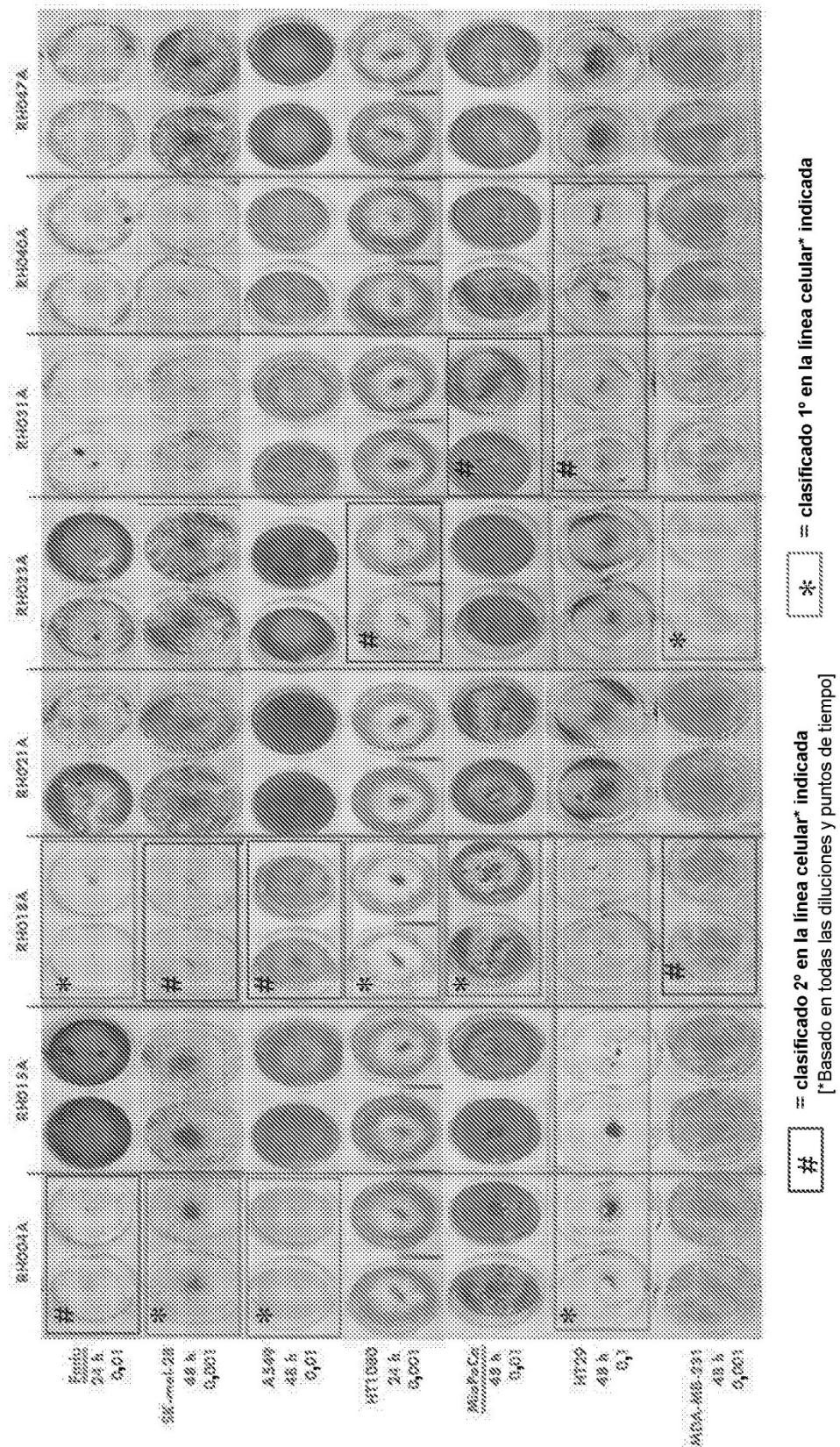
Figura 1

Figura 2



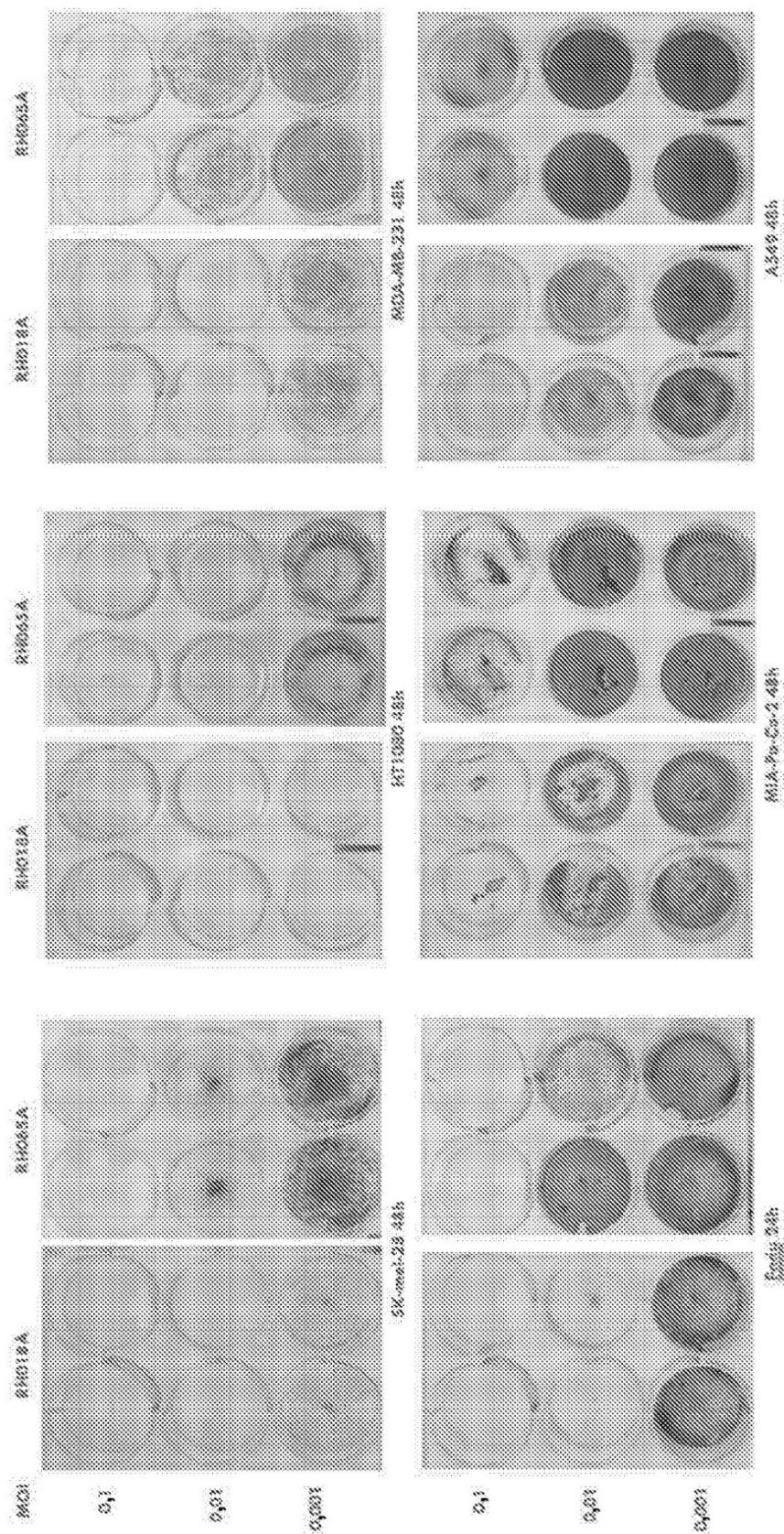
ES 2 943 150 T3

Figura 3



ES 2 943 150 T3

Figura 4



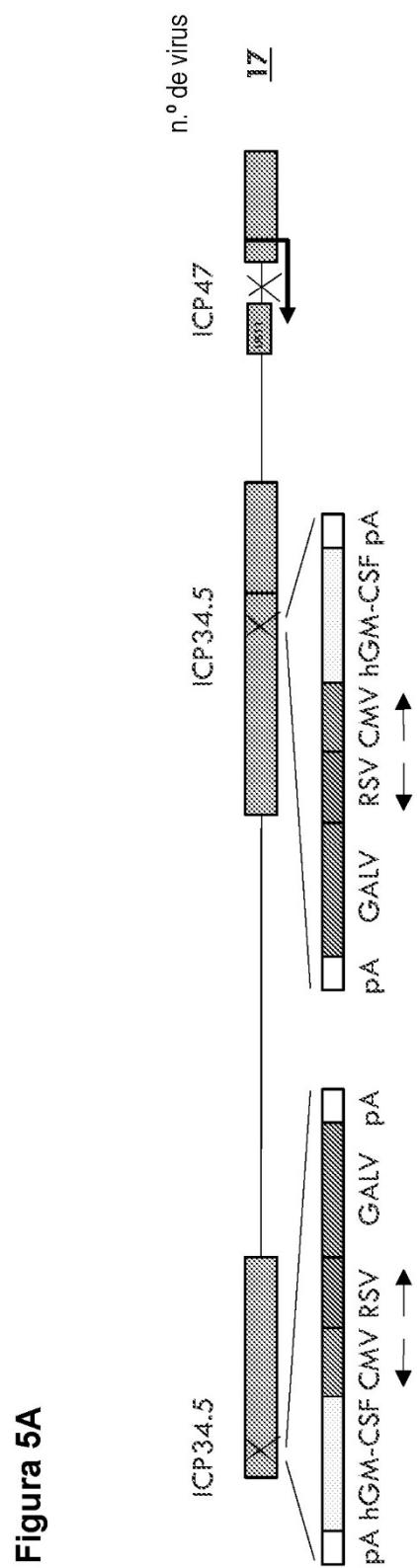
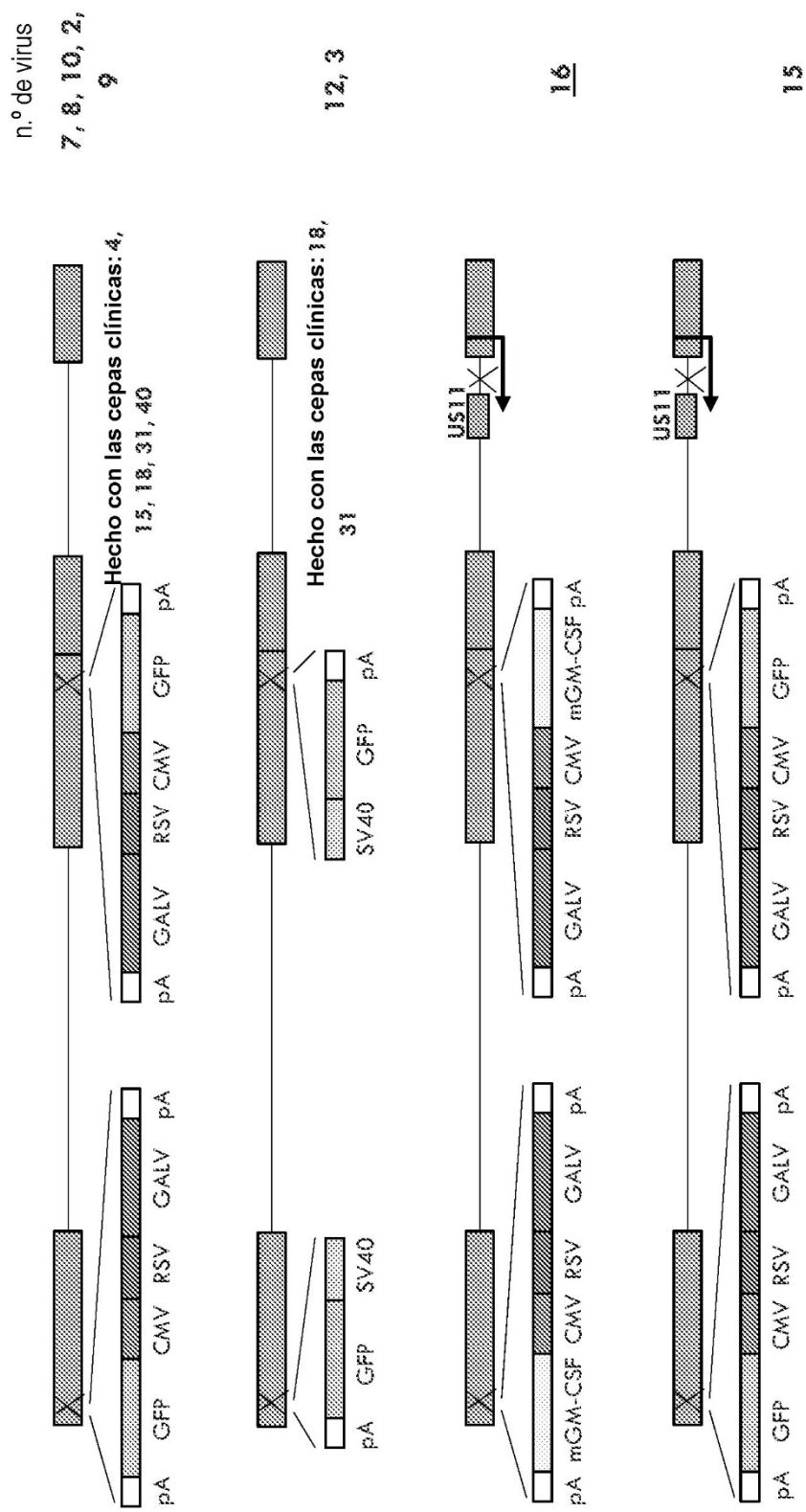


Figura 5A

Figura 5B

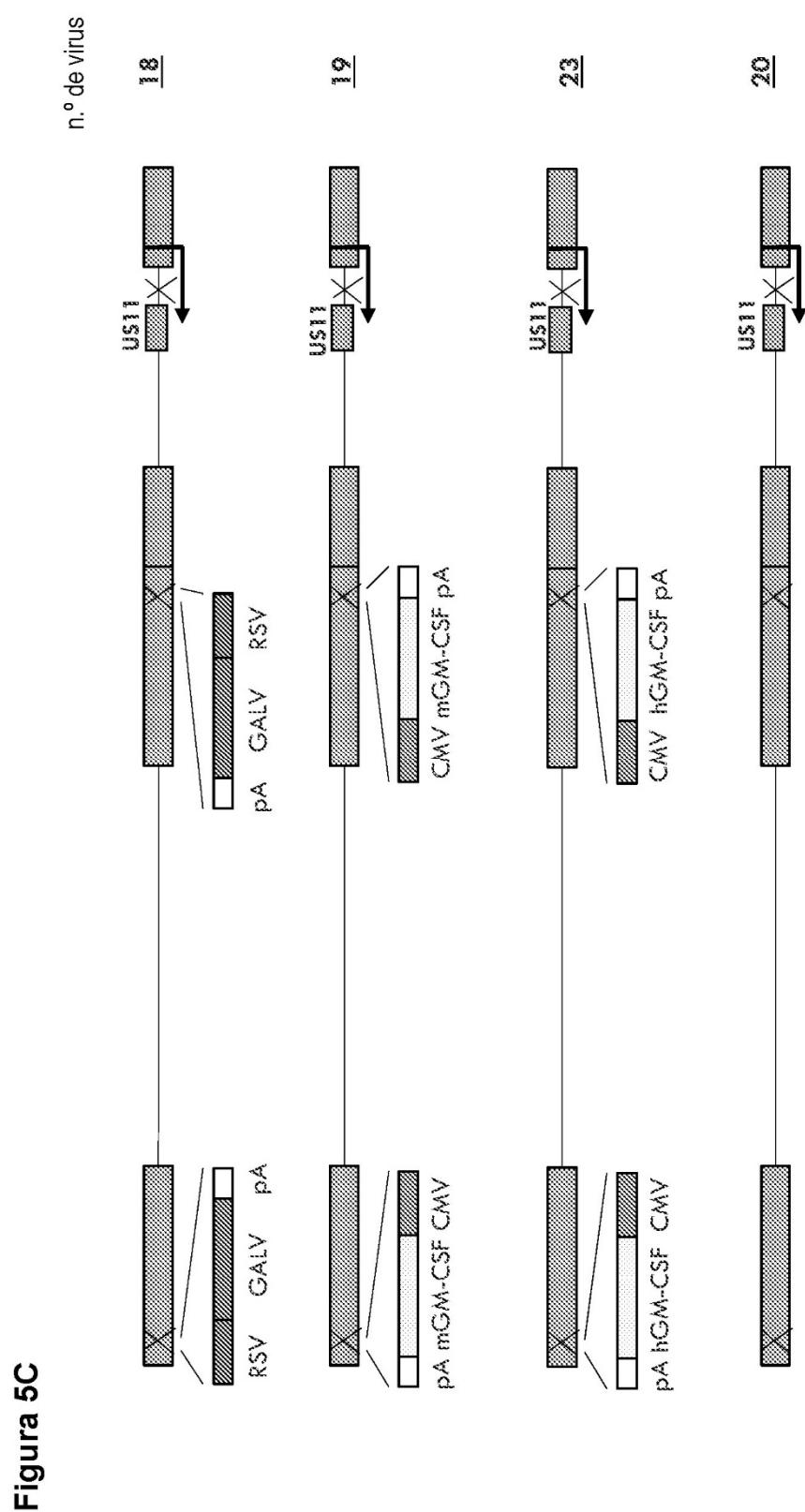


Figura 5C

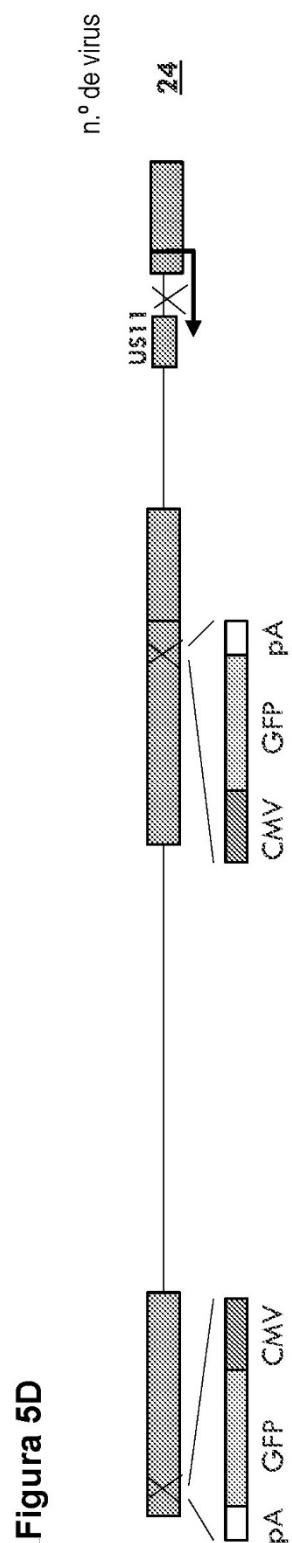
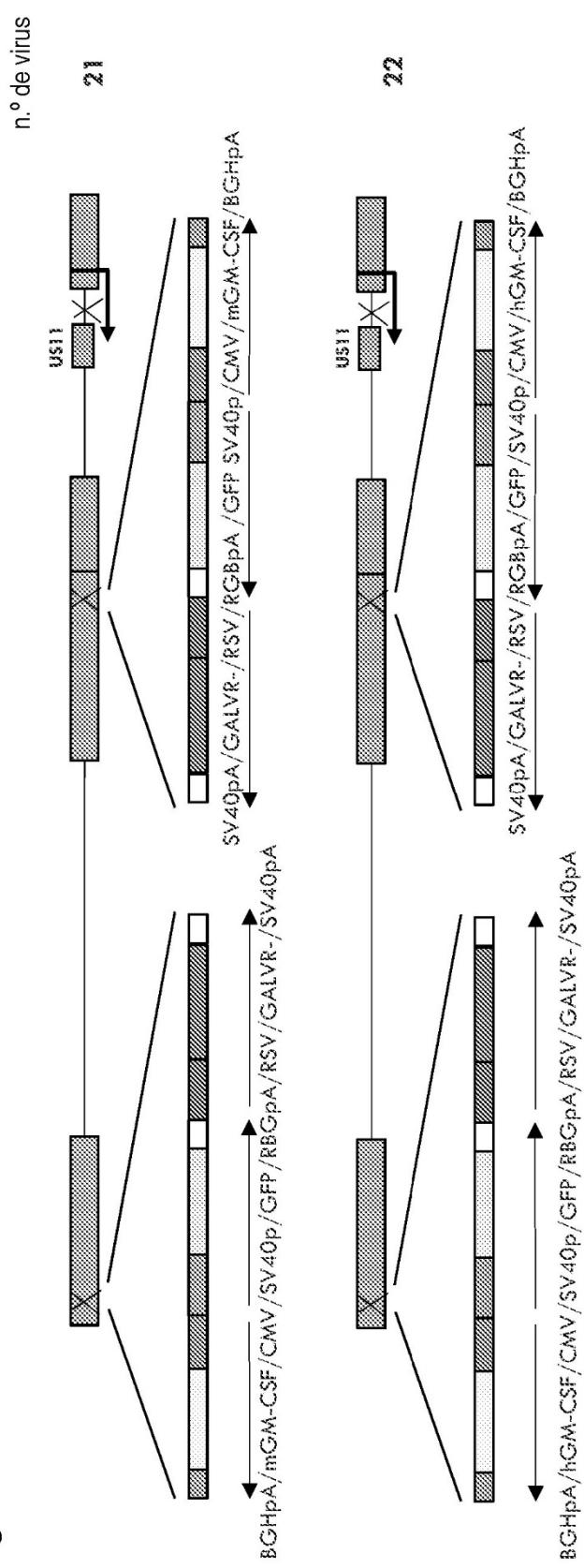
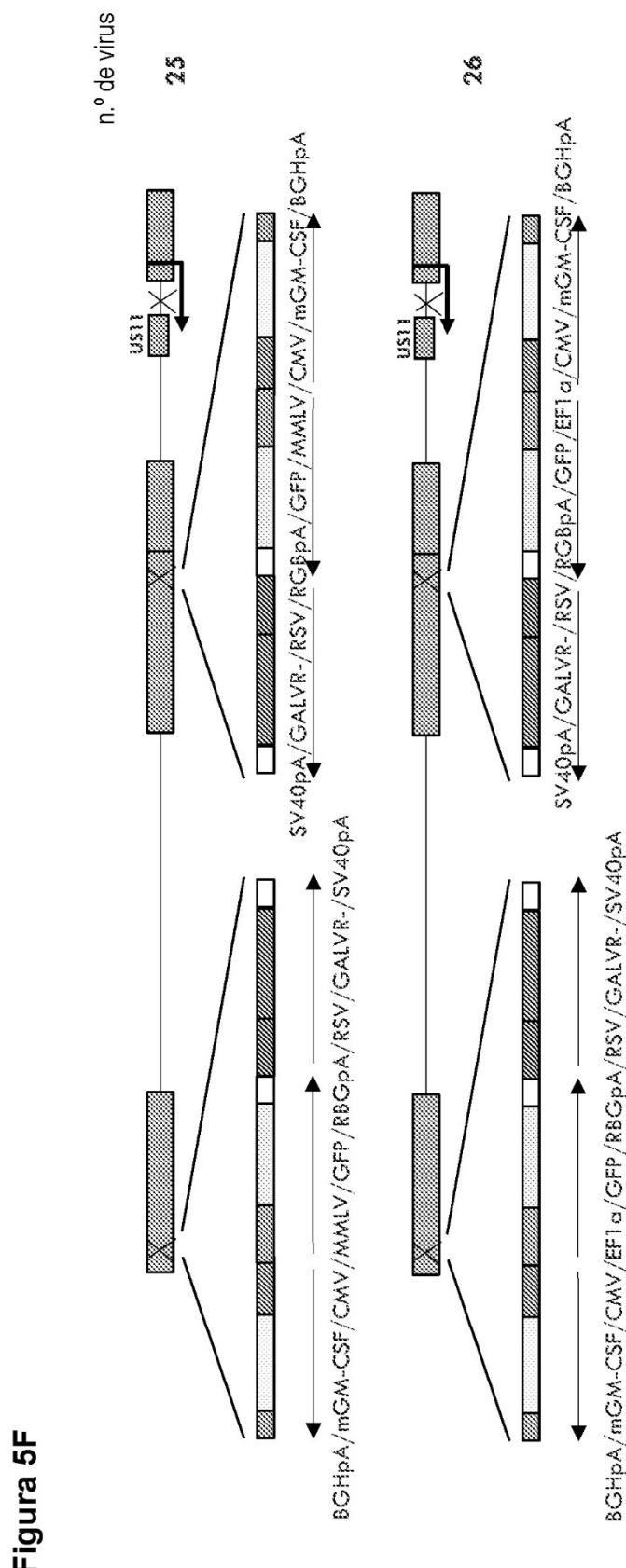
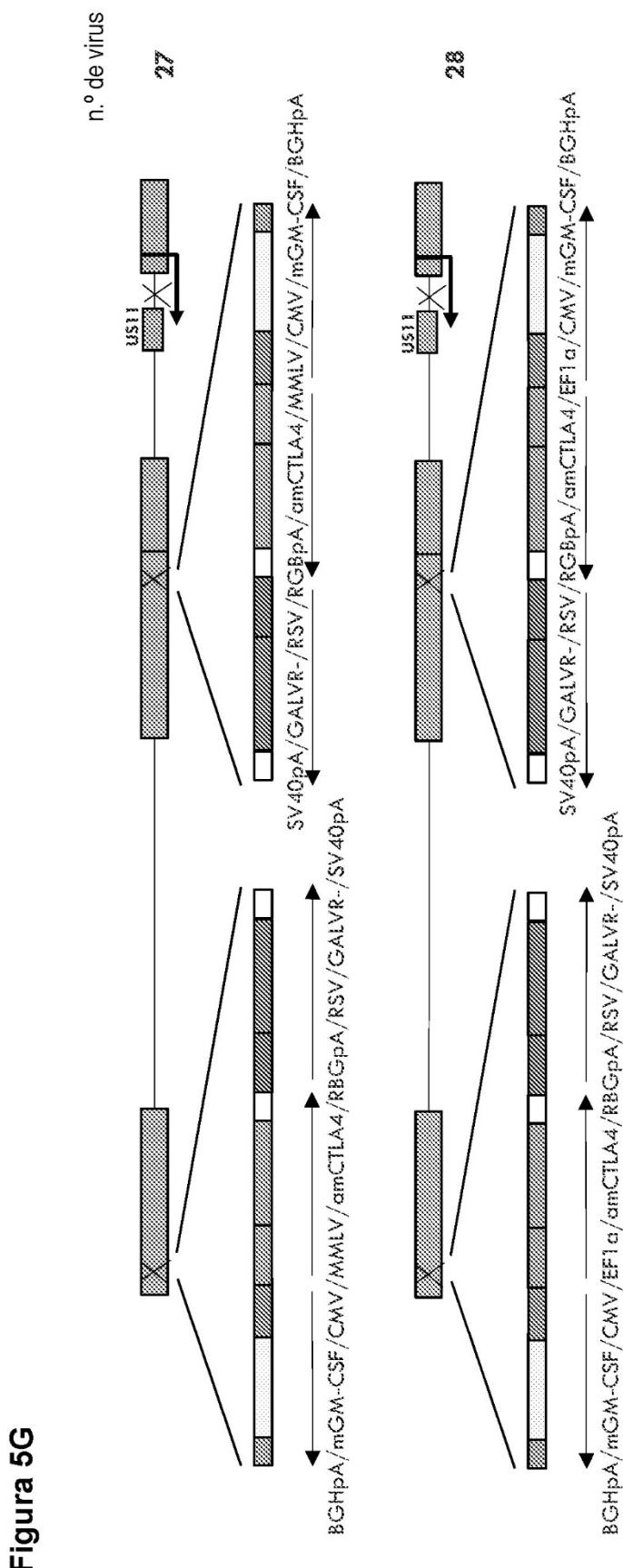
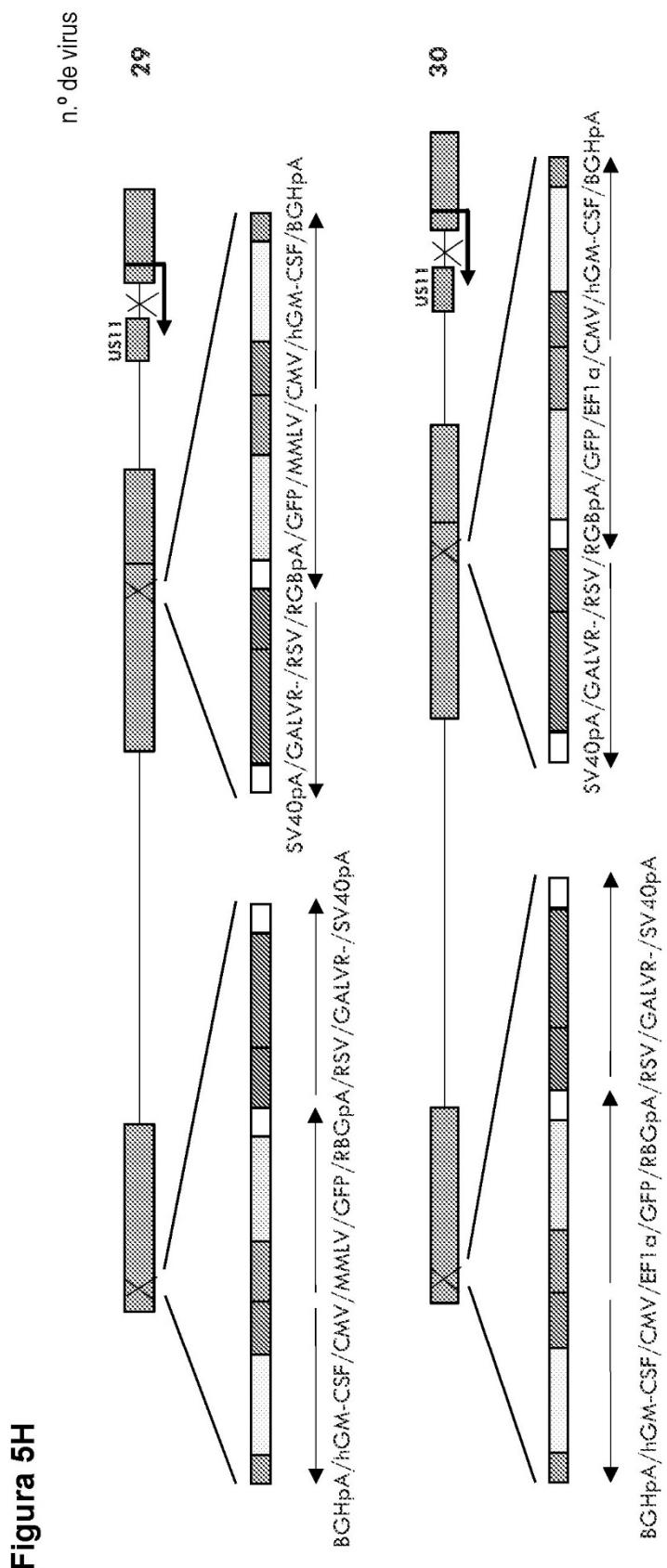


Figura 5D

Figura 5E

**Figura 5F**

**Figura 5G**

**Figura 5H**

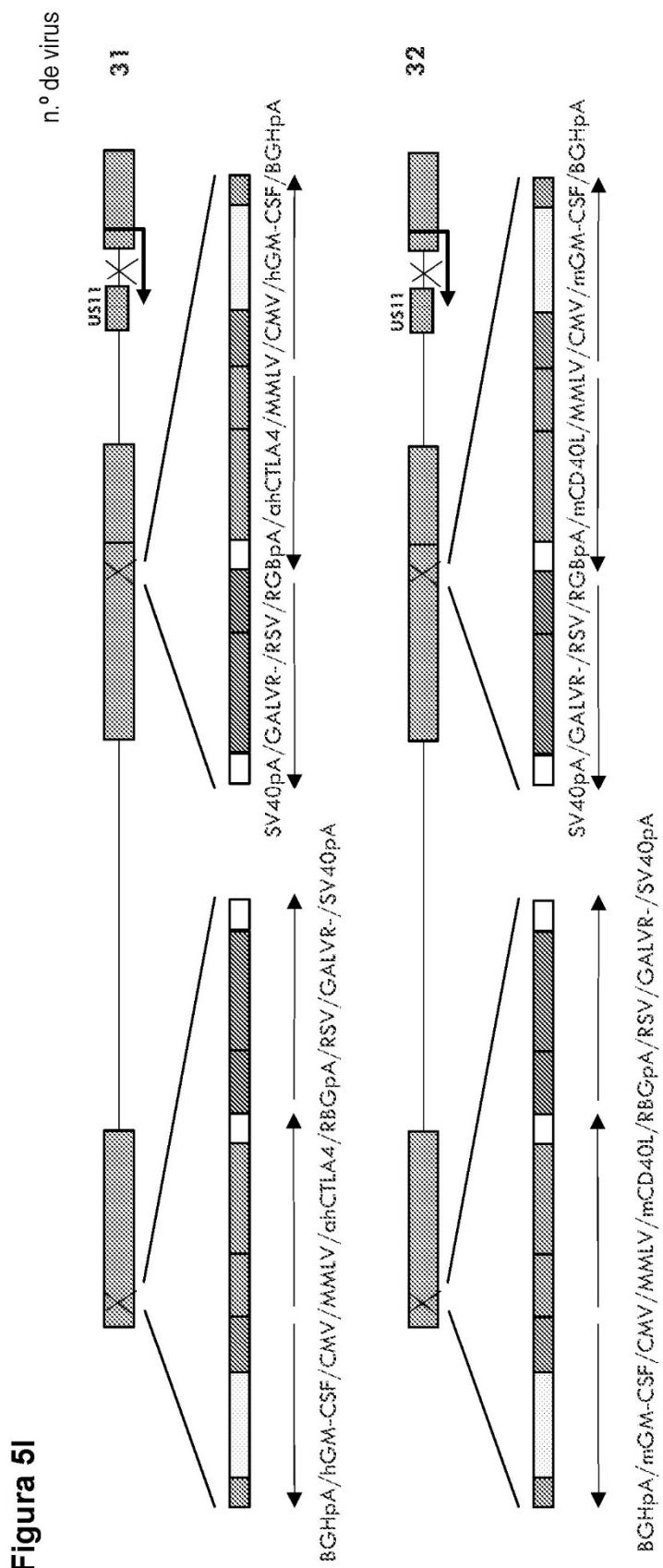


Figura 5

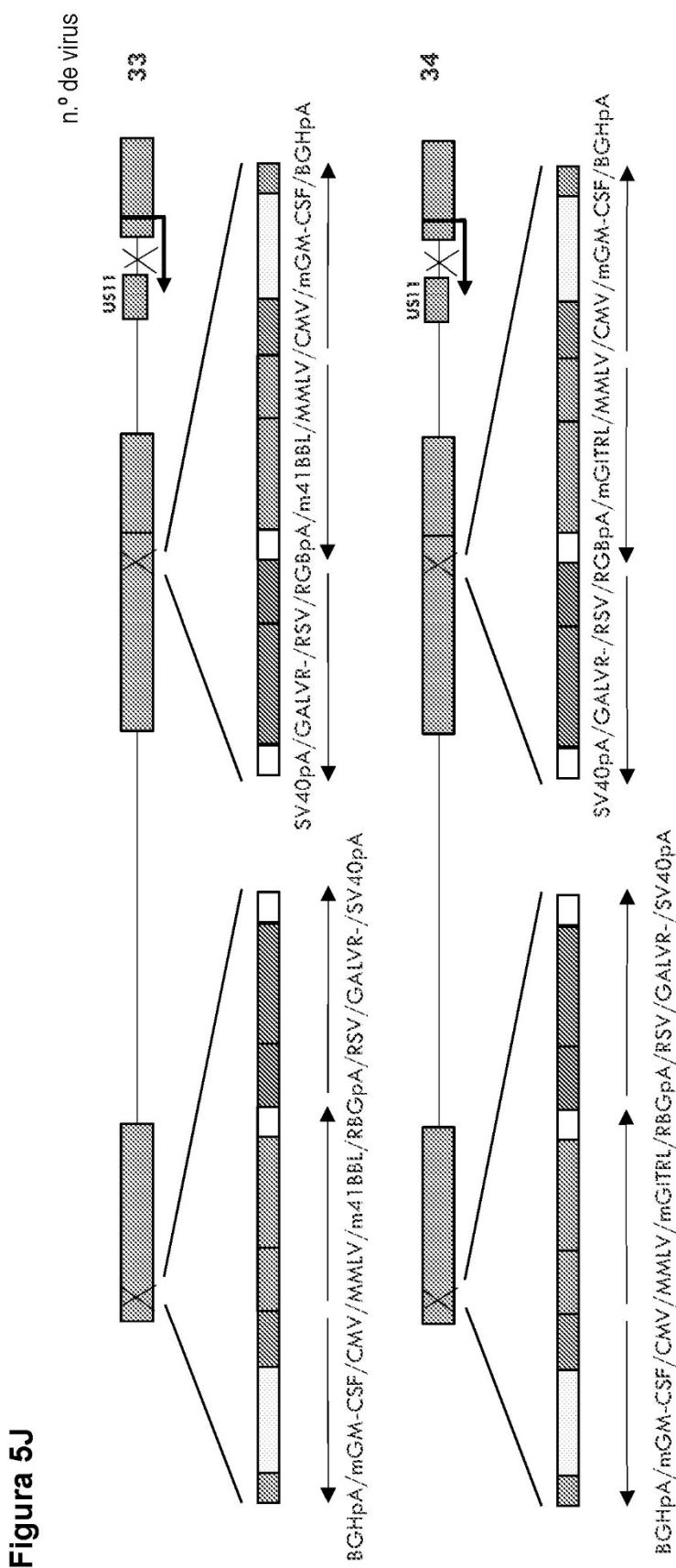
**Figura 5J**

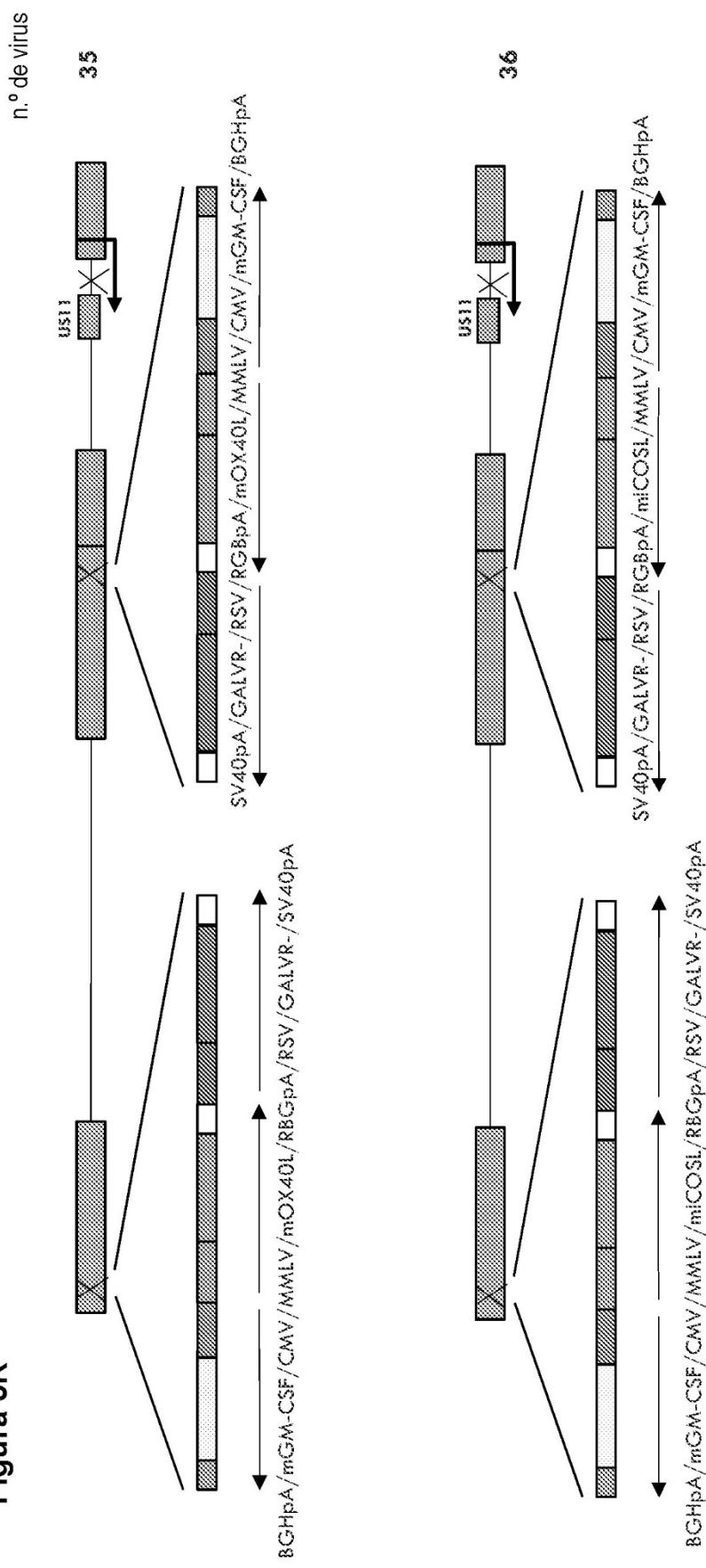
Figura 5K

Figura 6

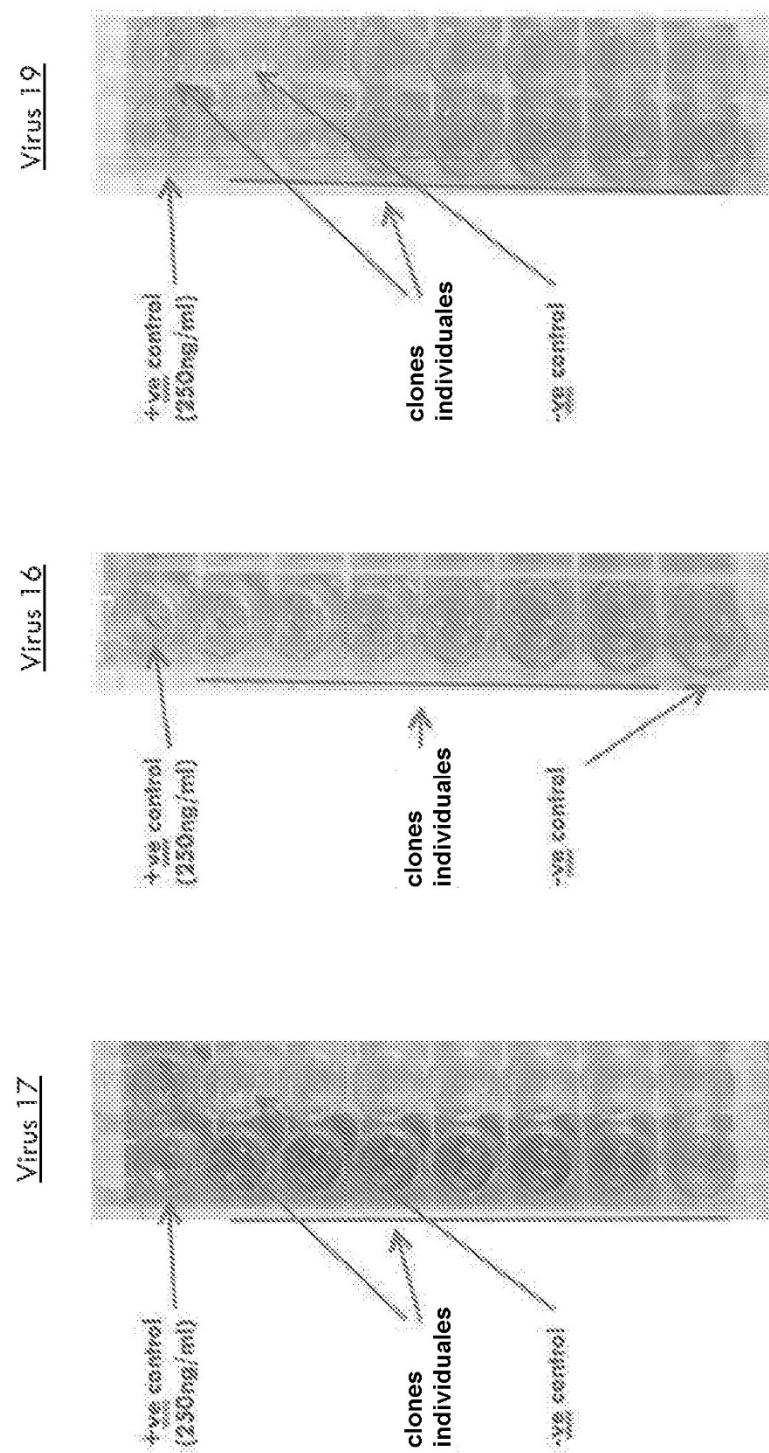


Figura 7A

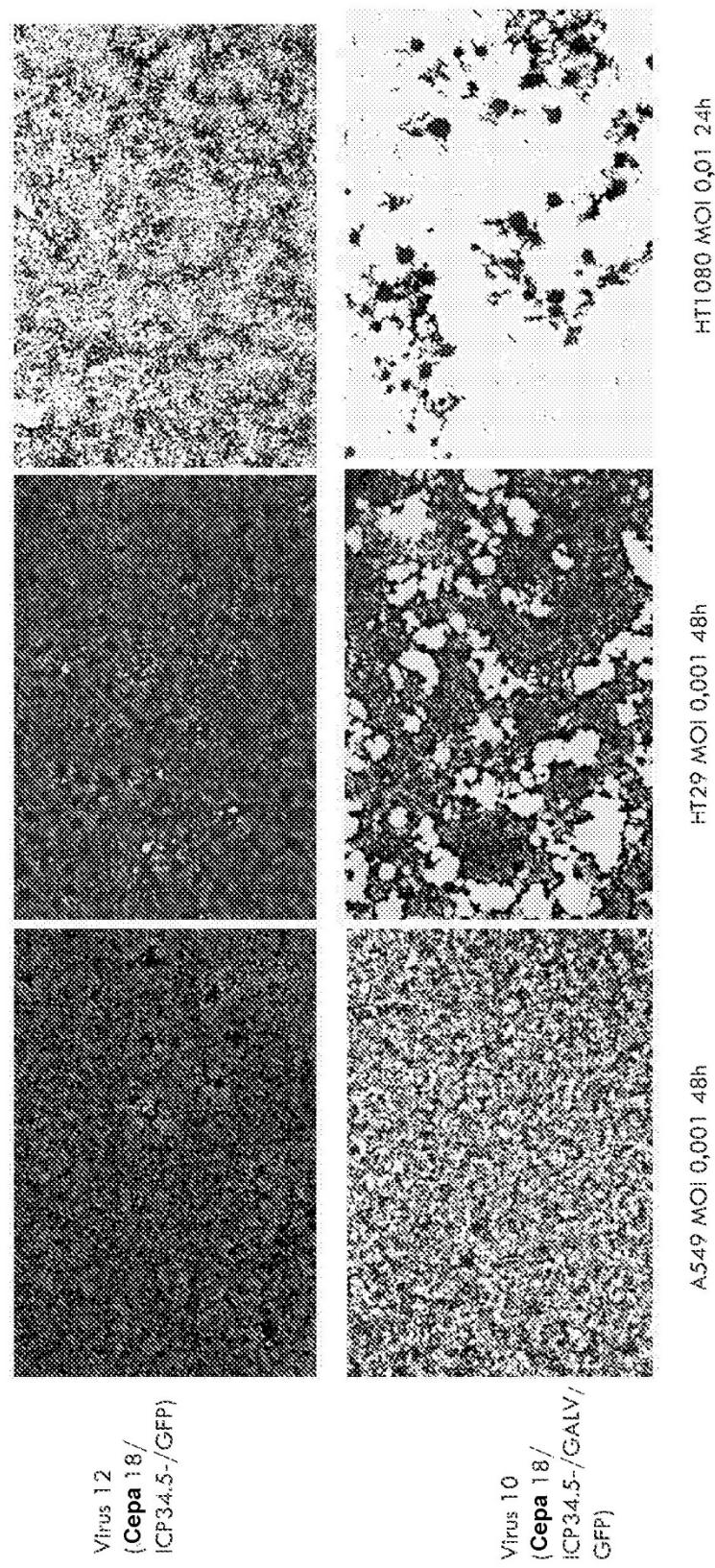
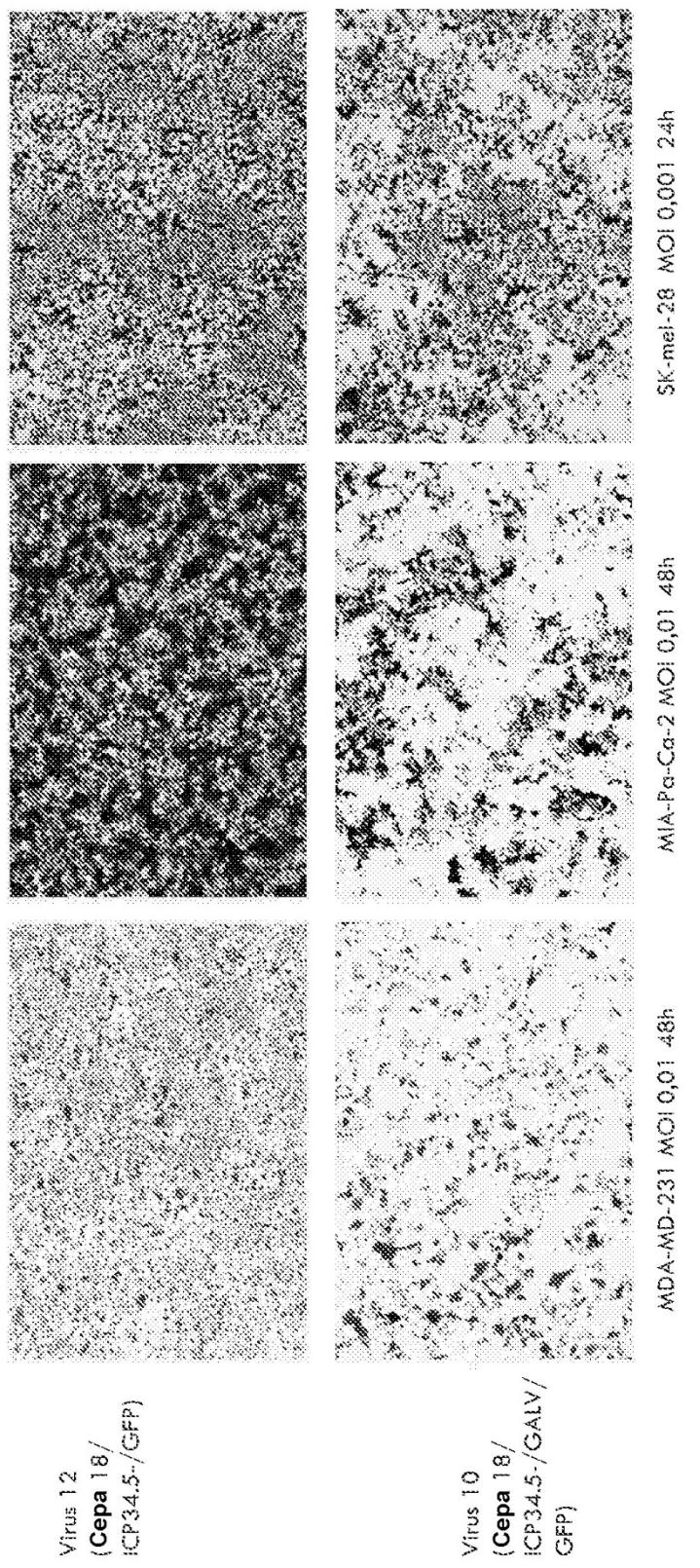


Figura 7B



Muerte celular evaluada por tinción de cristal violeta: baja magnificación

ES 2 943 150 T3

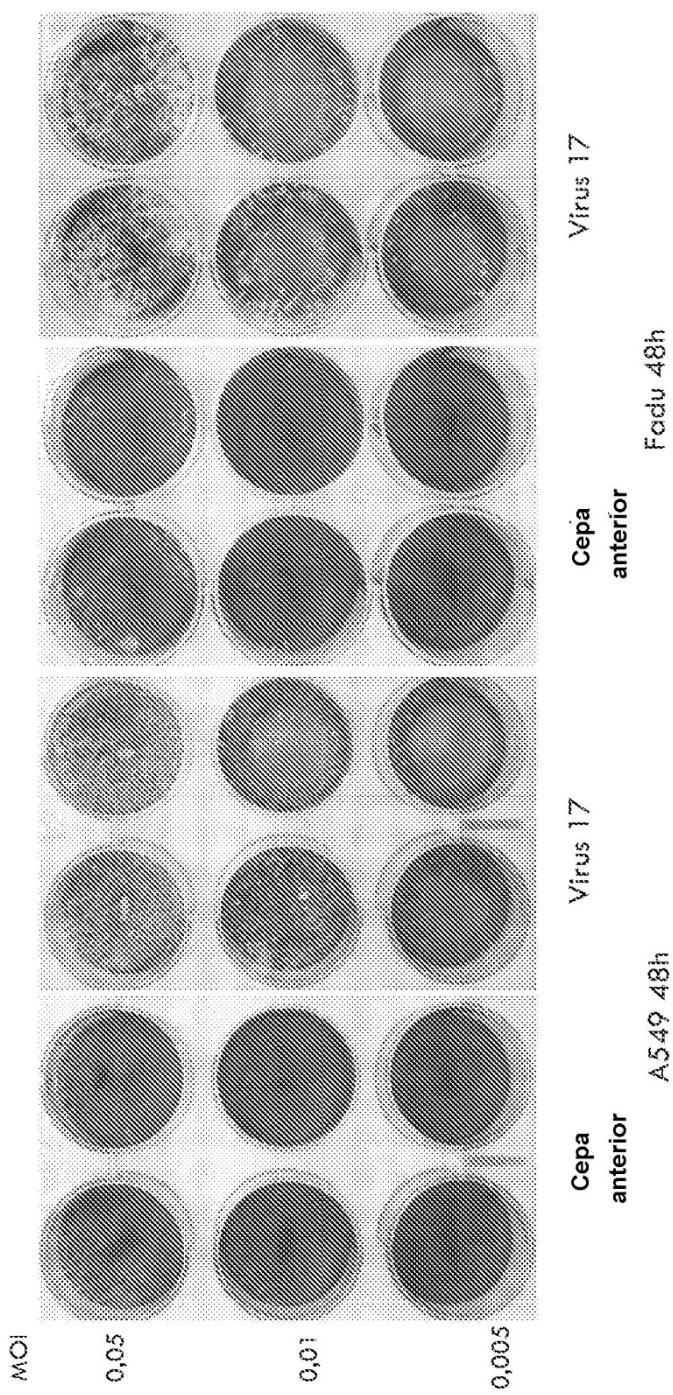
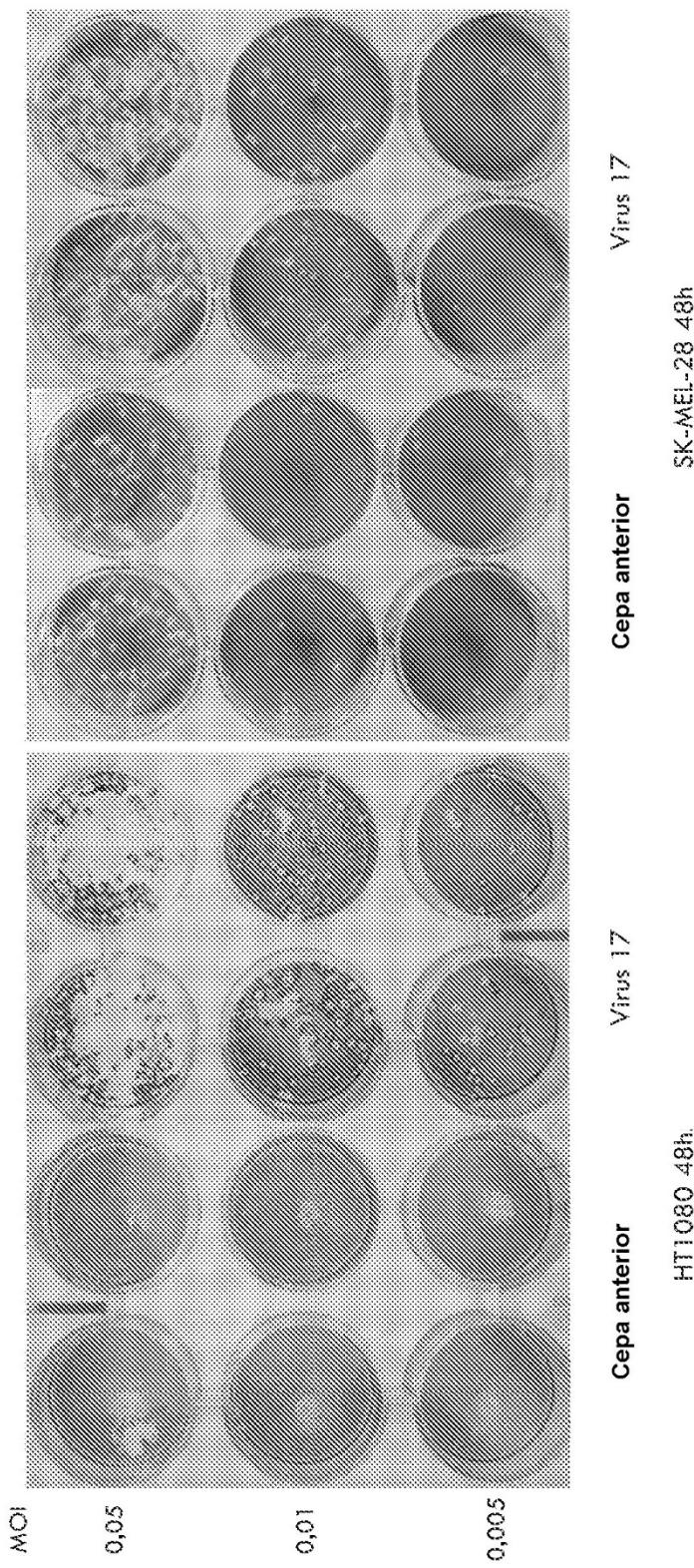


Figura 8A

Figura 8B



ES 2 943 150 T3

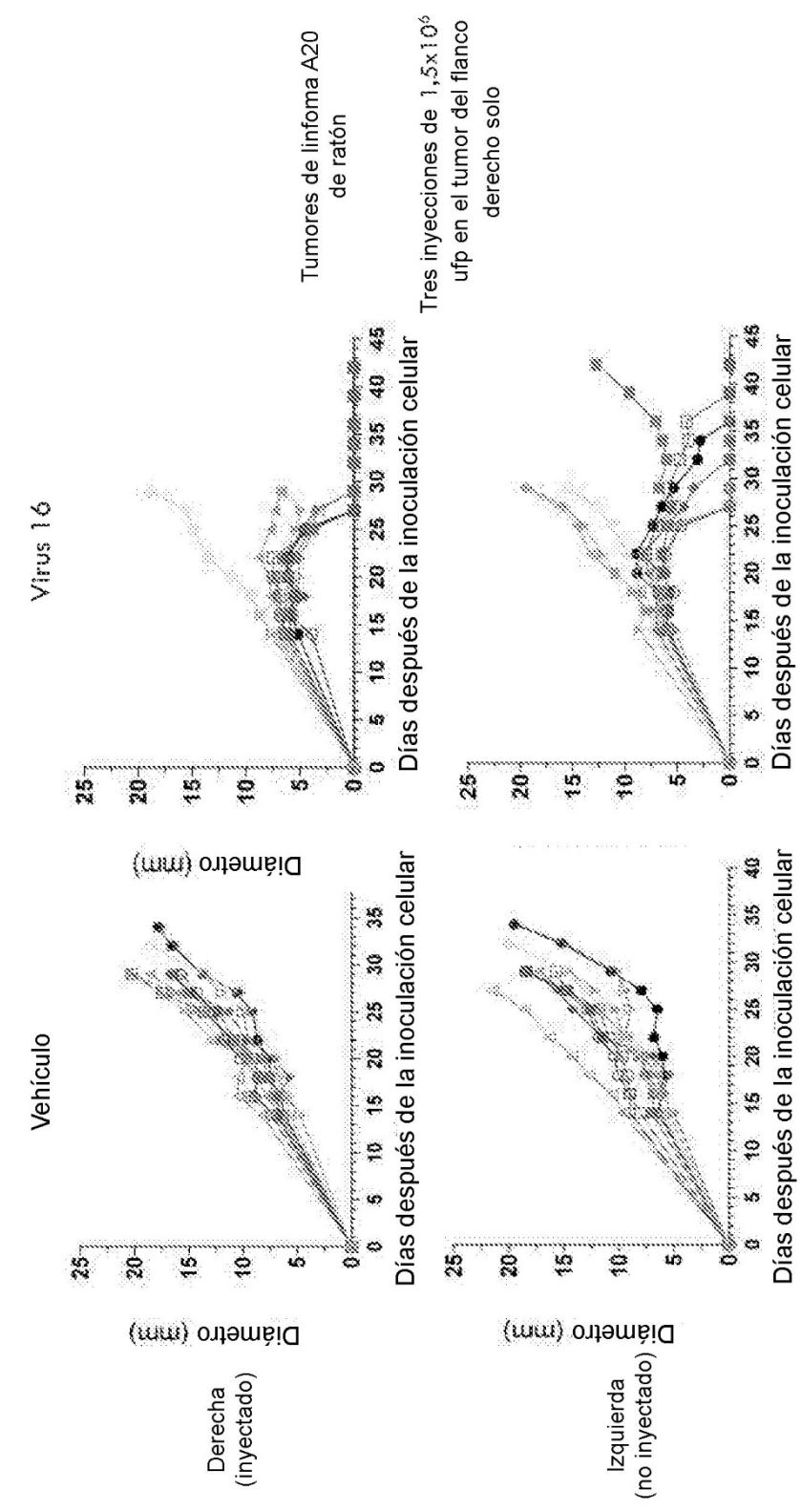


Figura 9

Figura 10

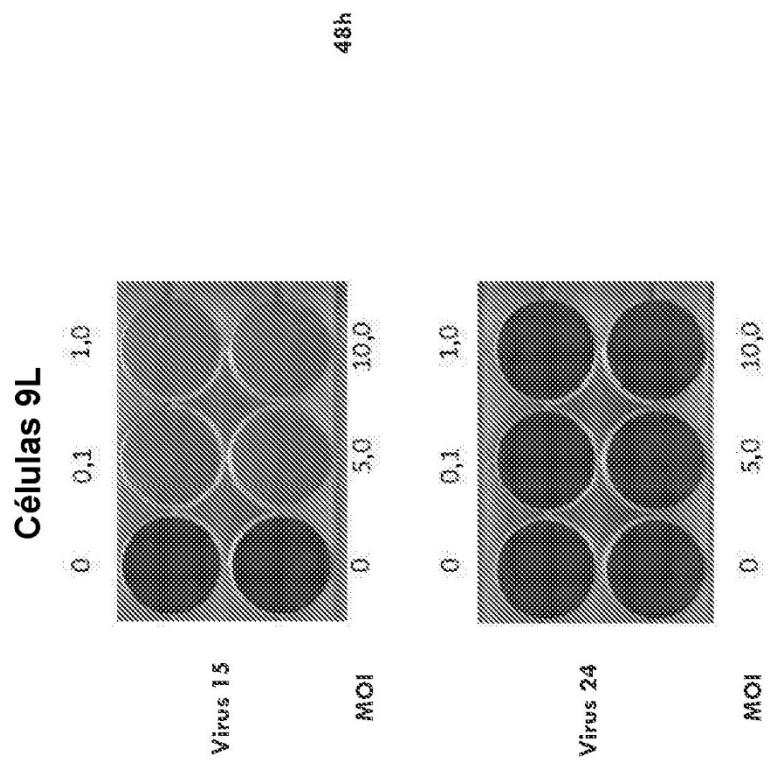


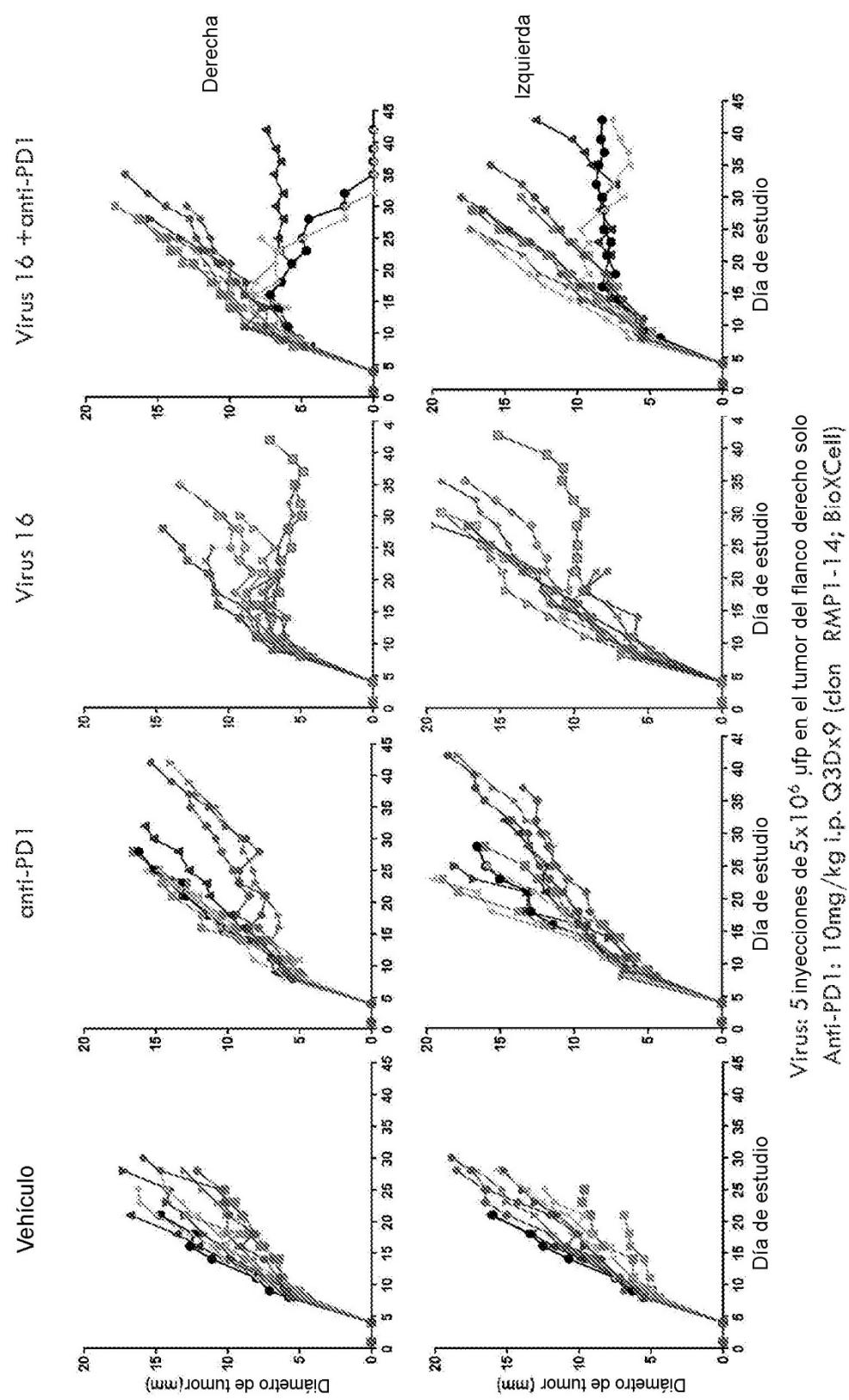
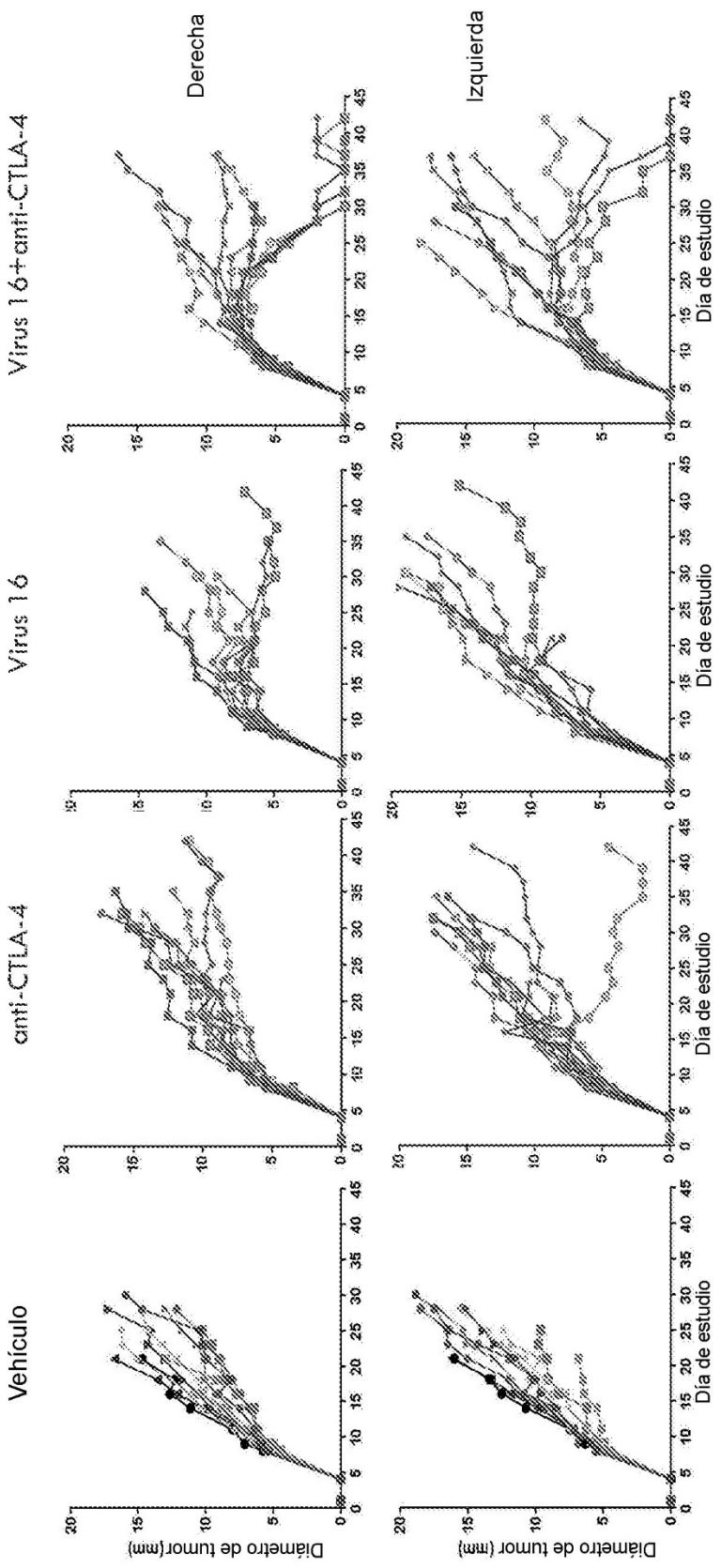
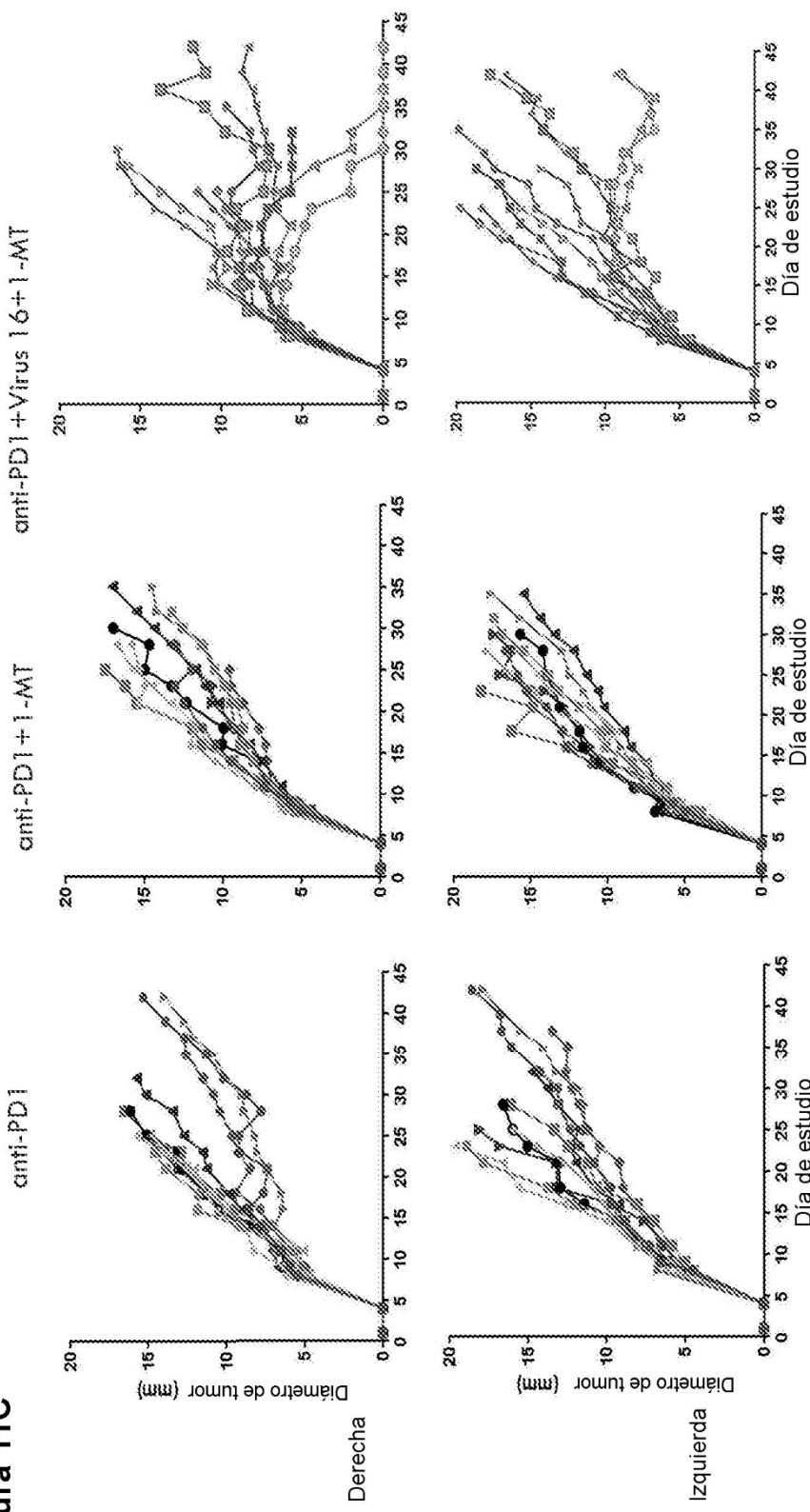
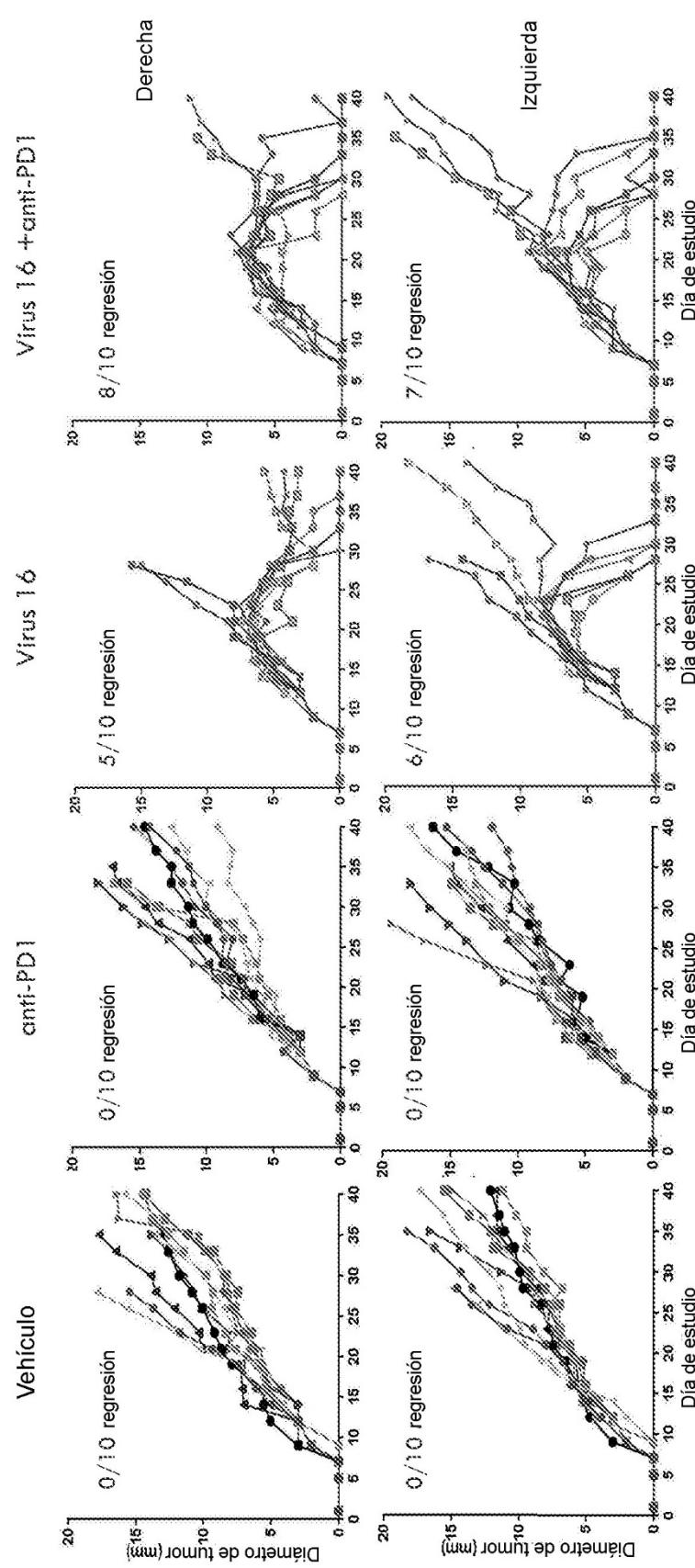
Figura 11A

Figura 11B

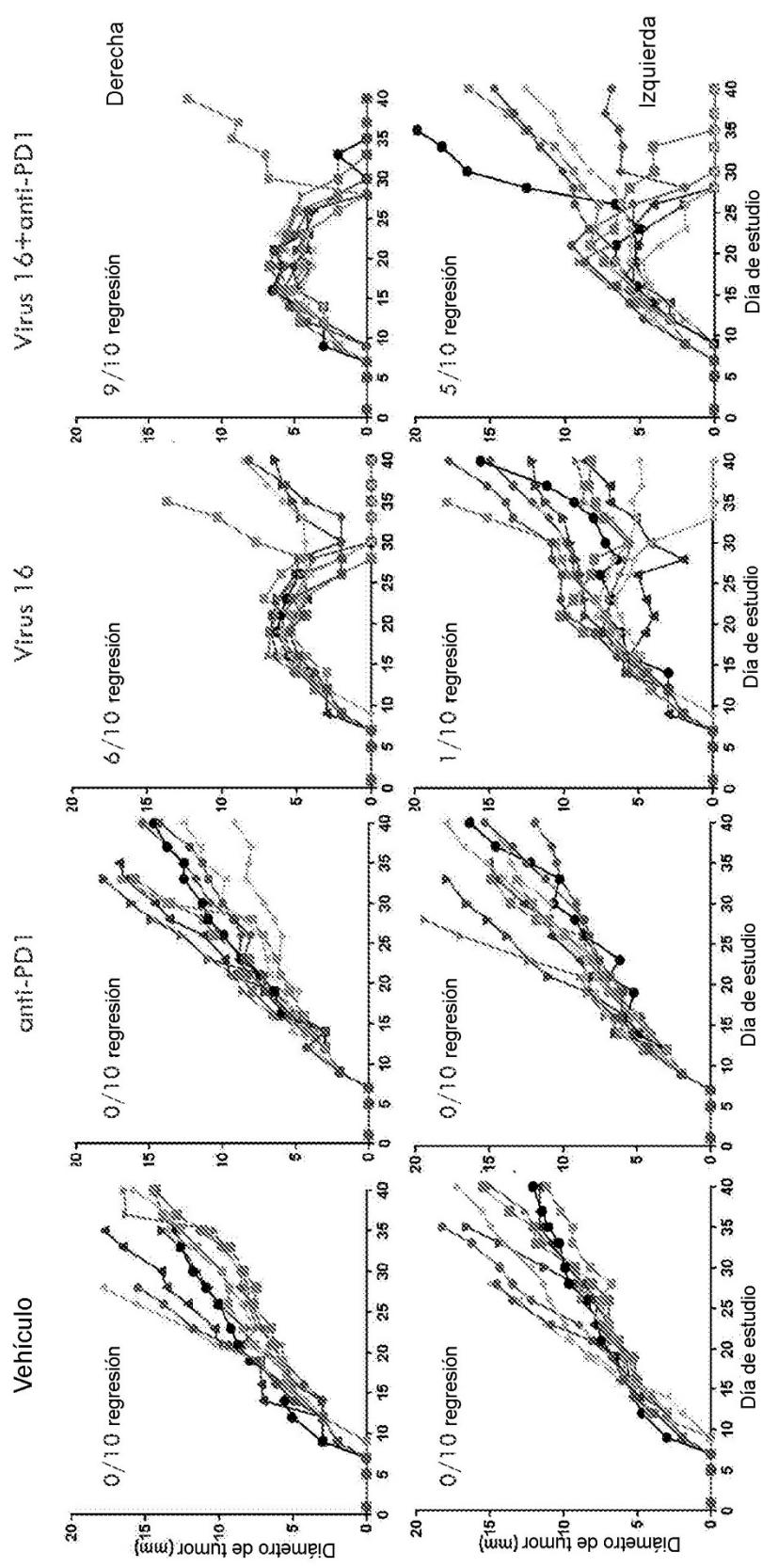
Virus: 5 inyecciones de 5×10^6 ufp en el tumor del flanco derecho solo
 Anti-CTLA-4: 3mg/kg i.p. Q3Dx9 (clon 9D9; BioXCell)

Figura 11C

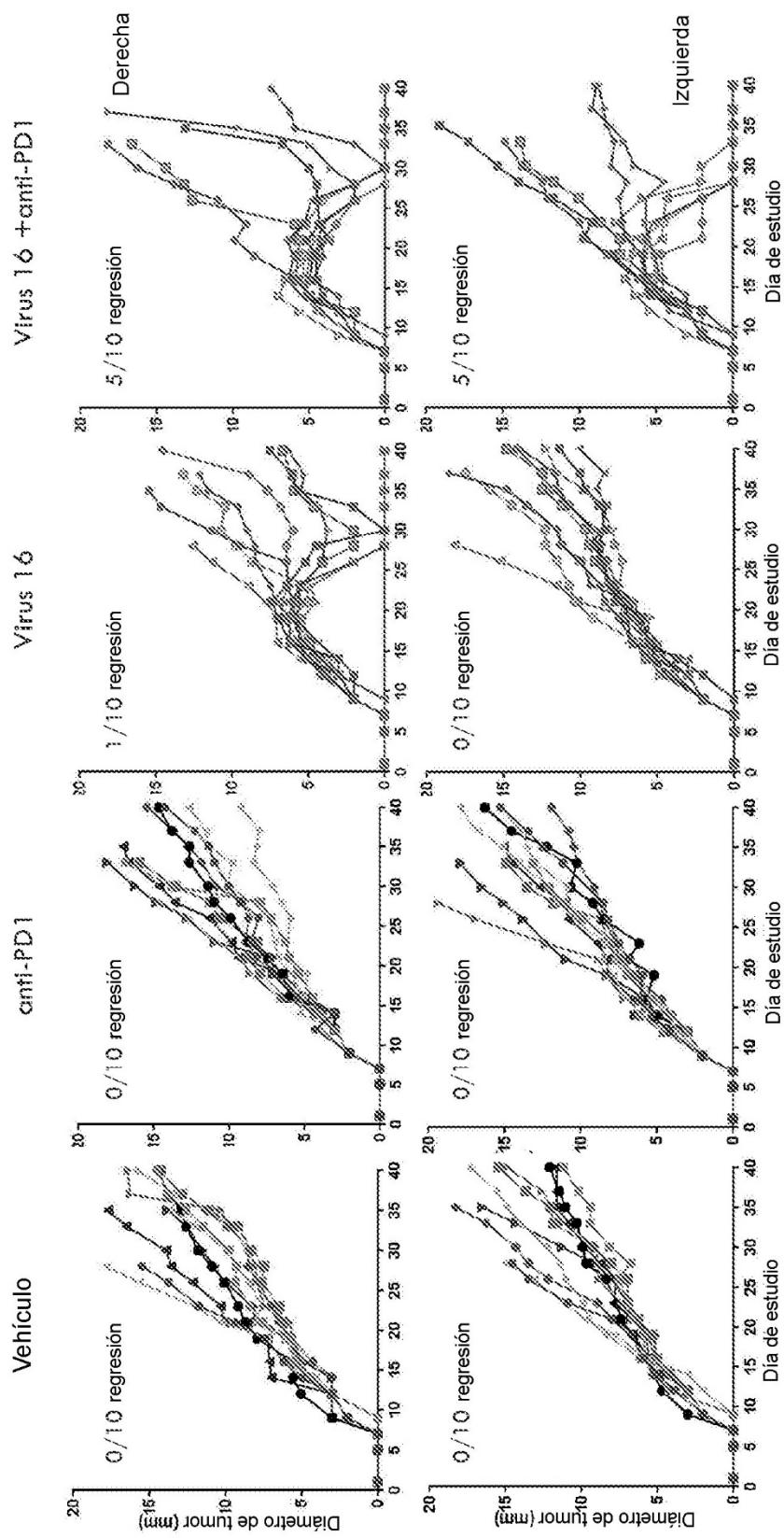
Virus: 5 inyecciones de 5×10^6 ufp en el tumor del flanco derecho solo
 Anti-PD1: 10mg/kg i.p. Q3Dx9 (clón RMP1-14; BioXCell)
 1-MT: 5mg/ml en agua para beber (1-MT solo no tiene efecto)

Figura 12A

Virus: 3 inyecciones de 5×10^6 ufp en el tumor del flanco derecho solo
Anti-PD1: 10mg/kg i.p. Q3Dx9 (clon RMP1-14; BioXCell)

Figura 12B

Virus: 3 inyecciones de 5×10^5 ufp en el tumor del flanco derecho solo
 Anti-PD1: 10mg/kg i.p. Q3Dx9 (clón RMP1-14; BioXCell)

Figura 12C

Virus: 3 inyecciones de 5×10^4 ufp en el tumor del flanco derecho solo
 Anti-PD1: 10mg/kg i.p. Q3Dx9 (clon RMAP 1-14; BioXCell)

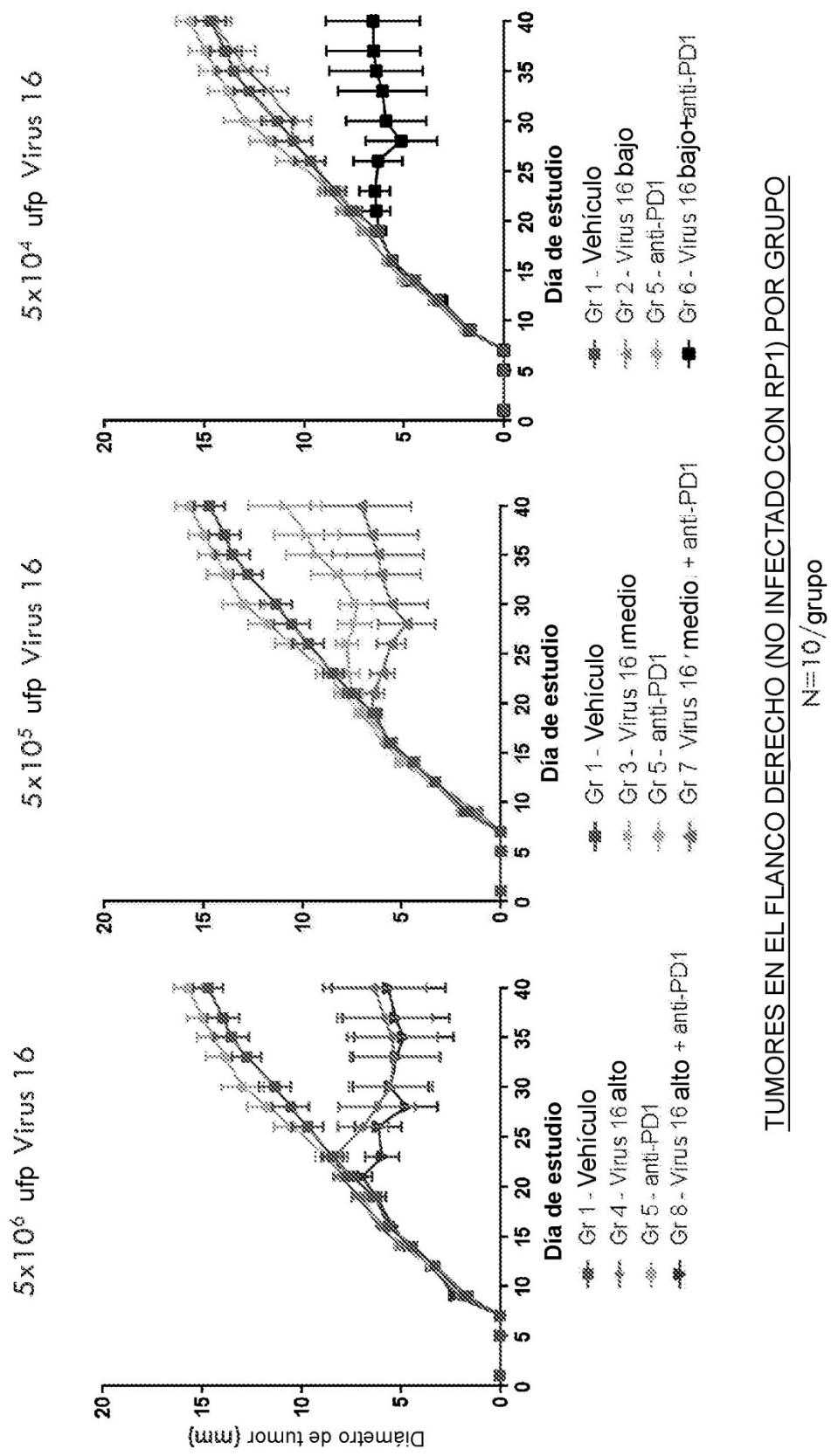
Figura 12D

Figura 13

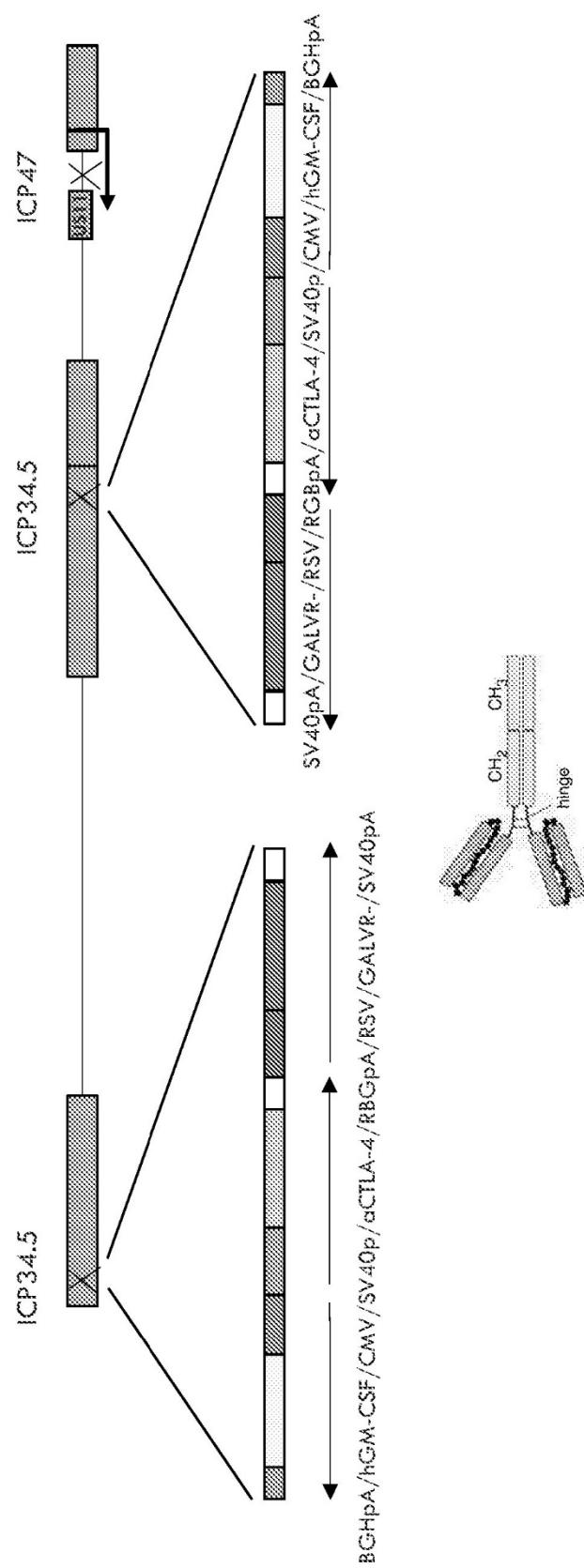
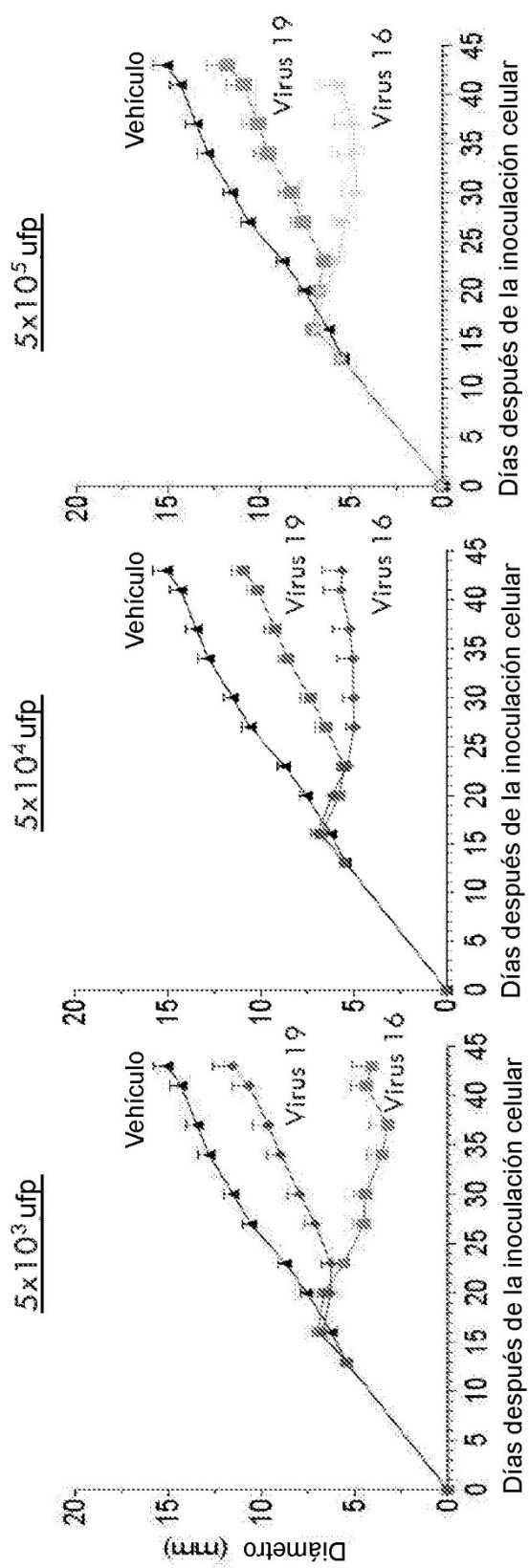


Figura 14

Tumores de cáncer de pulmón A549 humanos en ratones desnudos (sin efecto inmunitario)
3 inyecciones de Virus 16 o Virus 19 durante 1 semana de vehículo o la dosis indicada de virus (N=10/grupo)

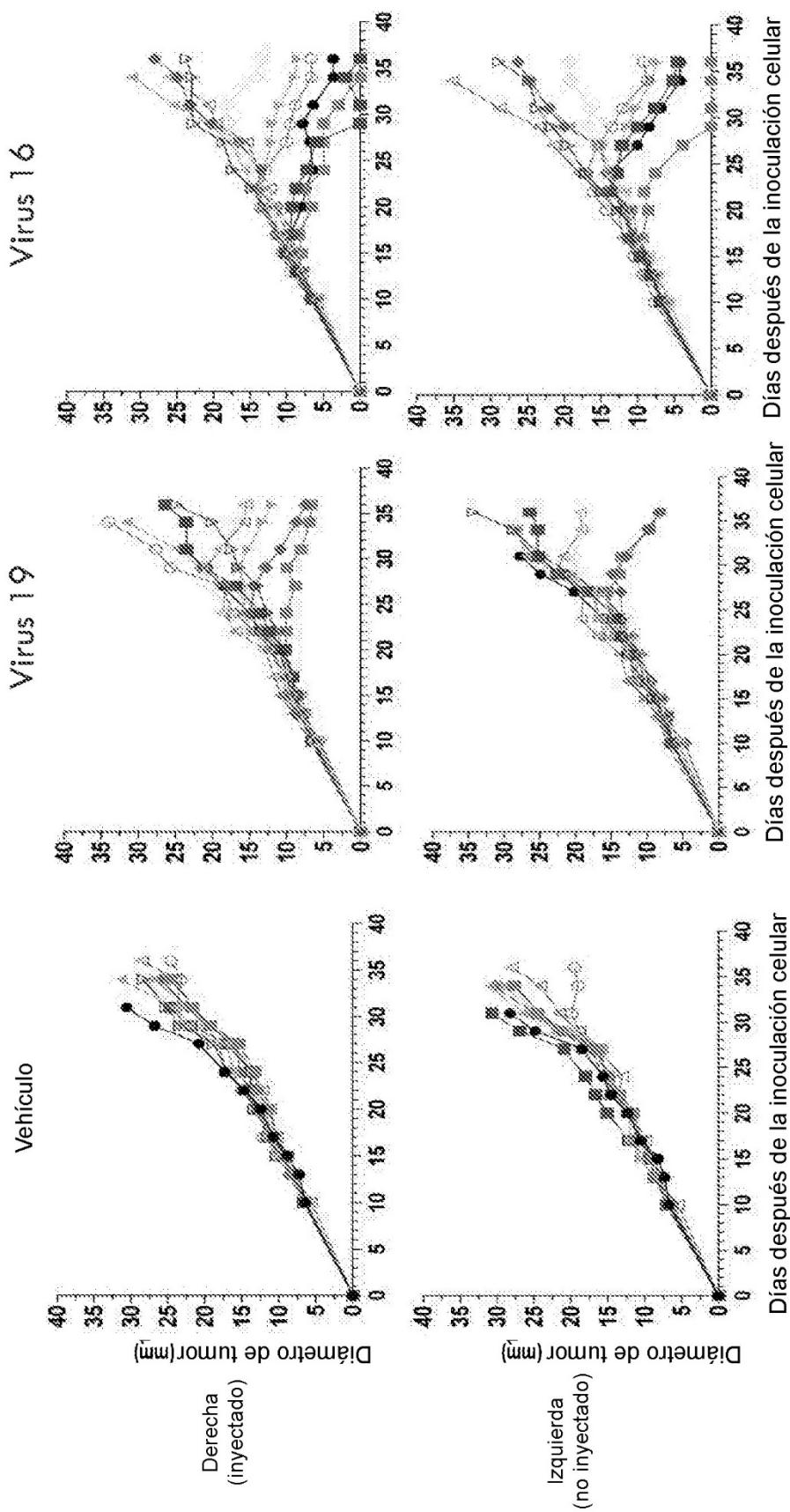
Figura 15

Figura 16