

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 954 676**

51 Int. Cl.:

**A61K 35/768** (2015.01)

**A61K 39/285** (2006.01)

**C12N 15/863** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.04.2015 E 19203305 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.06.2023 EP 3659614**

54 Título: **Virus de vaccinia oncolítico**

30 Prioridad:

**01.04.2014 GB 201405834**

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

**23.11.2023**

73 Titular/es:

**QUEEN MARY UNIVERSITY OF LONDON (100.0%)  
Mile End Road  
London E1 4NS, GB**

72 Inventor/es:

**WANG, YAOHE;  
LEMOINE, ROBERT NICHOLAS;  
YUAN, MING y  
AHMED, JAHANGIR**

74 Agente/Representante:

**GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo**

**Observaciones:**

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

**ES 2 954 676 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

Virus de vaccinia oncolítico

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere a la terapia contra el cáncer. En concreto, la invención se refiere a un virus de vaccinia oncolítico y a vectores virales para la terapia contra el cáncer.

**Antecedentes de la invención**

10 A pesar de los avances en cirugía mínimamente invasiva, radioterapia hiperfraccionada y nuevas combinaciones de agentes quimioterapéuticos, las tasas de supervivencia de los pacientes de muchos tipos de tumores sólidos no han cambiado. Los virus oncolíticos son productos terapéuticos atractivos para el tratamiento de cánceres resistentes a las terapias convencionales

Los virus oncolíticos son virus que pueden dirigirse específicamente a las células cancerosas y destruirlas. Además, los virus oncolíticos también pueden proporcionar las señales inmunoestimuladoras necesarias para aumentar la respuesta anticancerosa del propio hospedador.

15 El virus de vaccinia es un virus de ADN bicatenario con muchas características que lo convierten en un candidato atractivo para la terapia oncolítica. Muestra una rápida replicación, una eficaz propagación a los tumores y una fuerte capacidad lítica. Además, el virus de vaccinia se ha estudiado ampliamente y tiene una biología molecular bien definida, con una gran capacidad de clonación y una diversidad de promotores naturales y sintéticos disponibles en el mercado, lo que lo hace ideal como vector para transportar secuencias heterólogas de ácidos nucleicos. El virus de vaccinia tiene un perfil de seguridad bien establecido y se dispone de tratamientos para las infecciones no controladas. Además, el microambiente hipóxico que suele encontrarse en los tumores sólidos es perjudicial para la replicación y la eficacia de muchos tipos de virus oncolíticos, pero no para el virus de vaccinia.

20 Se han descrito varias cepas de virus de vaccinia oncolítico, por ejemplo, las cepas Western Reserve, Wyeth y Lister. Se han creado diversos mutantes de delección de cada una de estas cepas. McCart *et al.* (Cancer Res., 2001, 61, 8751-8757) describen una versión de la cepa Western Reserve (WR) con delecciones en el gen de la timidina cinasa ("thymidine kinase", TK) y en el gen del factor de crecimiento vírico ("viral growth factor", VGF). Estos mutantes de delección son capaces de cebar con eficacia el sistema inmunitario contra antígenos tumorales. Sin embargo, los estudios de biodistribución demostraron valoraciones virales significativas en el tejido ovárico normal y, en menor medida, en la médula ósea, lo que plantea la perspectiva de infertilidad y mielosupresión tras el tratamiento con el virus de vaccinia. Hung *et al.* (Gene Therapy, 2007, 14, 20-29) describen una cepa de vaccinia Lister deficiente en TK. Sin embargo, esta cepa también se localizó en el ovario normal, además de en los tumores ováricos.

La inserción de genes heterólogos, por ejemplo, genes codificadores de citocinas, en el virus puede impulsar aún más la respuesta inmunitaria. Sin embargo, la inserción de citocinas puede disminuir la eficacia de la replicación viral a través de la eliminación temprana del virus. De hecho, esto se ha observado *in vivo* con vaccinia armada con algunos genes inmunomoduladores, tales como IL-2, IL-15, TNF y ligando CD40.

35 Además, Hiley *et al.*, (Gene Therapy, 2010, 17, 281-287) describen el virus de vaccinia de la cepa Lister como posible vector terapéutico dirigido a tumores hipóxicos. Dimier *et al.* (Journal of Virology, 2011, 85, 10, 5016-5026) indican que la delección de las principales regiones genómicas no esenciales en la cepa Lister del virus de vaccinia mejora la atenuación sin alterar la eficacia de la vacuna en ratones. Bartlett *et al.* (Journal Of General Virology, 2002, 83, 8, 1965-1976) indican que la proteína N1L del virus de vaccinia es un homodímero intracelular que fomenta la virulencia. Billings *et al.* (Ann. N.Y. Acad. Sci., 2004, 1030, 297-302) indican que la falta de expresión del gen N1L provoca una disminución significativa de la replicación del virus de vaccinia en el cerebro de ratón. Postigo *et al.* (Journal of Virology, 2011, 86, 1, 203-213) indican que los homólogos de Bcl-2 codificados por el virus de vaccinia no actúan como inhibidores directos de Bax. El documento CN 103 110 939 describe el uso secuencial de adenovirus y virus de vaccinia como vacuna para su uso en el tratamiento del cáncer. Jahangir *et al.* (Molecular Therapy, 2014, 22, S1, S248-S249) describen un virus de vaccinia oncolítico selectivo de tumores que carece del gen N1L y que potencia la respuesta inmunitaria antitumoral cuando se utiliza como producto terapéutico contra el cáncer.

A pesar de los progresos realizados en el campo de los virus oncolíticos, todavía no se ha comercializado ningún producto terapéutico basado en el virus de vaccinia. Por tanto, existe una necesidad insatisfecha de vacunas oncolíticas más eficaces para el tratamiento del cáncer.

**Sumario de la invención**

50 En un primer aspecto, la presente invención proporciona una composición que comprende un virus de vaccinia deficiente en TK para su uso en el tratamiento de un cáncer y/o un tumor en un sujeto, en el que el sujeto también está recibiendo una terapia contra el cáncer, en el que el virus deficiente en TK comprende un gen N1L inactivado, en el que el gen N1L se inactiva mediante la inserción de una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido heterólogo, y en el que la secuencia de ácido nucleico comprende al menos tres promotores del virus de vaccinia, y

dichos promotores del virus de vaccinia están colocados en la misma orientación que es opuesta a la del ORF L024 intacto del virus de vaccinia.

El polipéptido heterólogo puede ser una citocina.

El polipéptido heterólogo puede seleccionarse del grupo que consiste en GM-CSF, IL-7, IL-10, IL-12, IL-15 e IL-21.

5 La terapia del cáncer puede ser quimioterapia, terapia biológica, radioterapia, inmunoterapia, terapia hormonal, terapia antivascolar, crioterapia, terapia con toxinas, terapia molecular contra el cáncer, terapia génica y/o cualquier combinación de las mismas.

10 La terapia génica puede ser una terapia génica supresora de tumores, una terapia de genes suicidas, estrategias de inmunización con vectores virales, una terapia antiangiogénica, una terapia génica proapoptótica o una terapia de sustitución génica.

El cáncer y/o el tumor puede ser un cáncer y/o un tumor no resecable antes del tratamiento.

### Descripción detallada de la Invención

15 Tal como se describe en el presente documento, se proporciona una secuencia de ácido nucleico que comprende al menos tres promotores del virus de vaccinia, en la que dichos al menos tres promotores están colocados en la misma orientación en la secuencia de ácido nucleico.

Un ADN lineal tiene dos orientaciones posibles: la dirección 5' a 3' y la dirección 3' a 5'. Por ejemplo, si un promotor está colocado en la dirección 5' a 3', y si un segundo promotor también está colocado en la dirección 5' a 3' dentro de la misma molécula/cadena polinucleotídica, entonces los dos promotores están colocados en la misma orientación.

20 La secuencia de ácido nucleico puede ser natural, sintética o recombinante. Puede ser, por ejemplo, un ADNc, un producto de PCR o una secuencia genómica. Puede estar aislada o formar parte de un plásmido, un vector o una célula hospedadora. Un plásmido es una molécula circular de ADN extracromosómico con capacidad para replicarse independientemente del ADN cromosómico.

25 Se puede utilizar un plásmido para introducir un casete de expresión en una célula hospedadora. Los plásmidos también pueden utilizarse para expresar un polipéptido en una célula hospedadora. Por ejemplo, una célula hospedadora bacteriana puede transfectarse con un plásmido capaz de codificar un polipéptido concreto, con el fin de expresar dicho polipéptido. El término también incluye los cromosomas artificiales de levadura y los cromosomas artificiales bacterianos que son capaces de albergar tramos más largos de ADN.

30 Un promotor es una región de ADN con una secuencia específica que inicia la transcripción de un gen o genes concretos. Los promotores utilizados para la expresión de genes heterólogos en el virus de vaccinia incluyen promotores que controlan la actividad transcripcional temprana y tardía, por ejemplo, mH5, H5, P7.5 y PE/L. Un gen heterólogo, tal como se utiliza en el presente documento, es un gen que no se encuentra normalmente en el virus. El promotor H5 modificado, mH5, tiene una actividad predominantemente temprana y muestra una mayor estabilidad que el H5 natural. Preferentemente, dichos al menos tres promotores son mH5.

35 Tal como se describe en el presente documento, el promotor comprende una secuencia de nucleótidos que es sustancialmente homóloga a la secuencia expuesta en la figura 1. Las secuencias de ácidos nucleicos con una identidad superior al 20 % (por ejemplo, un 25 %, un 30 %, un 40 %, un 50 %, un 60 %, un 70 %, un 80 %, un 90 %, un 95 % o un 99 %) se consideran secuencias homólogas. Tal como se utiliza en el presente documento, sustancialmente homóloga se refiere a secuencias que presentan al menos un 60 % o un 70 %, preferentemente significa al menos un 80 %, más preferentemente al menos un 90 %, y más preferentemente al menos un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o mayor identidad. Tal como se describe en el presente documento, la secuencia tiene al menos un 80 % o más (por ejemplo, un 85 %, un 90 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 %, un 99,5 %, etc.) de homología con la secuencia expuesta en la figura 1.

En el presente documento, los términos homología e identidad son intercambiables.

45 Las comparaciones de secuencias para determinar la homología pueden llevarse a cabo utilizando software de comparación de secuencias fácilmente disponible. Algunos ejemplos son, entre otros, BLAST (véase Ausubel *et al.*, 1999 Short Protocols in Molecular Biology, 4ª ed., capítulo 18) y FASTA (Altschul *et al.*, 1990 J. Mol. Biol., 403-410). Tanto BLAST como FASTA están disponibles para búsquedas fuera de línea y en línea (véase Ausubel *et al.*, 1999, Short Protocols in Molecular Biology, páginas 7-58 a 7-60).

50 Tal como se describe en el presente documento, la secuencia de ácido nucleico está presente en un vector. Un vector, tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a una construcción para introducir una secuencia de ácido nucleico en una célula o un virus para su expresión o replicación. Se refiere a una construcción recombinante, por ejemplo, un plásmido, un virus o cualquier otra construcción capaz de expresar o replicar la secuencia de ácido nucleico tras su introducción en una célula o virus.

La secuencia de ácido nucleico descrita en el presente documento puede formar parte de un casete de expresión. Un casete de expresión es una parte de un vector. Se compone de un promotor, un marco de lectura abierto y una región 3' no traducida.

5 Tal como se describe en el presente documento, el vector del virus de vaccinia comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 80 % o más (por ejemplo, un 85 %, un 90 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 %, un 99,5 %, etc.) de homología con la secuencia expuesta en la figura 2.

Tal como se describe en el presente documento, la secuencia de ácido nucleico codifica un polipéptido heterólogo.

10 Un polipéptido, tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a una pluralidad de residuos de aminoácidos unidos entre sí por enlaces peptídicos. Se utiliza indistintamente con proteína, péptido, oligopéptido e incluye las glucoproteínas y sus derivados. El término "polipéptido" también abarca los análogos y derivados de polipéptidos que conservan la misma función o actividad biológica que el polipéptido original.

15 Un polipéptido heterólogo, tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a cualquier polipéptido que el virus no expresa normalmente en la naturaleza. El polipéptido heterólogo puede ser biológicamente activo. Un polipéptido biológicamente activo, tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un polipéptido que tiene una función o actividad biológica.

Tal como se describe en el presente documento, el polipéptido biológicamente activo es terapéutico. Un polipéptido terapéutico es un polipéptido que ha sido o está siendo desarrollado para un uso terapéutico. Algunos ejemplos de polipéptidos terapéuticos son, entre otros, las citocinas, las quimiocinas y los factores de crecimiento.

20 La citocina puede ser un agente inmunomodulador, tal como una interleucina (por ejemplo, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-19, IL-20, IL-21, IL-22, IL-23, IL-24, IL-25, IL-26, IL-27, IL-28, IL-29, IL-30, IL-31, IL-32, IL-33, IL-34, IL-35 e IL-36), un interferón (INF- $\alpha$ , INF- $\beta$ , INF- $\gamma$  e INF- $\omega$ ), el factor de necrosis tumoral ("tumour necrosis factor", TNF) y/o el factor estimulante de colonias de granulocitos macrófagos ("granulocyte macrophage colony-stimulating factor", GM-CSF).

25 Tal como se describe en el presente documento, el polipéptido es una interleucina. Tal como se describe en el presente documento, el polipéptido es IL-12. La IL-12 puede derivarse de cualquier animal, por ejemplo, ser humano (hIL-12), ratón (mIL-12), caballo, vaca, cerdo, etc. Puede ser natural o recombinante. Preferentemente, la secuencia de nucleótidos que codifica la IL-12 es un gen IL-12 completo. Tal como se describe en el presente documento, la secuencia de nucleótidos codifica el 30 %, el 40 %, el 50 %, el 60 %, el 70 %, el 75 %, el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 95 %, el 97 %, el 98 % o el 9 % de un gen de longitud completa. Tal como se describe en el presente documento, el polipéptido es GM-CSF, o el polipéptido puede ser IL-21. Todas las características que se refieren a la IL-12 descritas anteriormente se aplicarán *mutatis mutandis* al GM-CSF y a la IL-21.

35 Las referencias a IL-12 en el presente documento incluyen IL-12A (por ejemplo, n.º de registro de GenBank AF404773.1 GI:15128214) y/o IL-12B (por ejemplo, n.º de registro de GenBank AY008847.1 GI:11192034). La proteína IL-12 madura incluye ambas subunidades. Las referencias a la IL-21 en el presente documento incluyen la isoforma 1 (por ejemplo, n.º de registro de GenBank NP\_068575.1 GI:11141875) y/o la isoforma 2 (n.º de registro de GenBank NP\_001193935.1 GI:333033767). Las referencias a GM-CSF en el presente documento incluyen el n.º de registro de GenBank AF373868.2 GI:14278709. Por lo general, se trata de secuencias humanas.

40 Un polipéptido heterólogo también podría ser un polipéptido indicador. Un polipéptido indicador, tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un polipéptido cuya expresión es indicativa de la presencia de la secuencia de ácido nucleico, casete de expresión o vector en una célula hospedadora o virus. Los ejemplos de polipéptidos indicadores incluyen, entre otros, polipéptidos fluorescentes, polipéptidos quimioluminiscentes, polipéptidos bioluminiscentes, polipéptidos fosforescentes y enzimas.

45 Tal como se describe en el presente documento, el polipéptido indicador es un polipéptido fluorescente. Los polipéptidos fluorescentes incluyen, entre otros, la proteína verde fluorescente, la proteína roja fluorescente, la proteína amarilla fluorescente, la proteína cian fluorescente y sus derivados.

Los sitios de restricción son secuencias de nucleótidos específicas que son reconocidas y escindidas por enzimas de restricción. Algunos ejemplos de enzimas de restricción son Sall, BglII, HindIII, SmaI, BamHI y MluI. Un sitio de restricción BamHI es un sitio de restricción reconocido por BamHI. Los sitios de restricción para otras enzimas reciben nombres similares.

50 Tal como se describe en el presente documento, la secuencia de ácido nucleico o vector comprende uno o más sitios de restricción. Tal como se describe en el presente documento, es una secuencia de ácido nucleico o vector que comprende sitios de restricción Sall, BglII, HindIII, SmaI, BamHI y MluI.

55 Tal como se describe en el presente documento, la secuencia de ácido nucleico o vector está comprendida dentro de un virus de vaccinia. Tal como se describe en el presente documento, la secuencia de ácido nucleico tiene la fórmula mostrada en la figura 3.

- El virus de vaccinia ha desarrollado una serie de estrategias para eludir el sistema inmunitario del hospedador. Por ejemplo, el virus segrega una serie de proteínas que inhiben las citocinas y quimiocinas que intervienen en la respuesta antivírica del hospedador. Una de estas proteínas es el producto del gen N1, N1L, que se cree que inhibe la apoptosis de las células infectadas, así como la activación de NF- $\kappa$ B. El NF- $\kappa$ B es un factor de transcripción que controla la producción de una serie de citocinas que intervienen en la eliminación del virus. Se ha demostrado que la delección del gen N1L provoca un aumento de las citocinas proinflamatorias antivirales controladas por NF- $\kappa$ B, tales como IL1 $\beta$ , TNF $\alpha$  e IFN $\alpha$ / $\beta$ . También se ha demostrado que N1L modula la respuesta de los linfocitos citolíticos naturales ("natural killer", NK). Los linfocitos NK suelen ser la primera línea de defensa del hospedador frente a la infección vírica. Se ha demostrado que la delección de N1L induce un aumento de la actividad local de los linfocitos NK. En consonancia con estos resultados, Bartlett *et al.* (J. General. Virology, 2002, 83:1965-1976) han demostrado que, en comparación con una cepa de VV de tipo salvaje, una cepa de vaccinia Western Reserve con delección de N1L es eliminada más rápidamente por la respuesta inmunitaria del hospedador. En el presente documento, una respuesta inmunitaria significa la reacción del sistema inmunitario contra una sustancia extraña.
- Tal como se describe en el presente documento, se proporciona un virus de vaccinia que comprende una secuencia de ácido nucleico o un vector en el que la secuencia de ácido nucleico se inserta en el gen N1L.
- La inserción de una secuencia de ácido nucleico en una secuencia diana puede facilitarse mediante procedimientos bien conocidos por el experto en la materia. Por ejemplo, los procedimientos descritos en Molecular Cloning, A Laboratory Manual, segunda edición, de J. Sambrook, E. F. Fritsch y T. Maniatis (2003), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Virology Methods Manual, editado por Brian W. J. Mahy y Hillar O. Kangro (1996), Academic Press and Expression of genes by Vaccinia virus vectors, Current Protocols in Molecular Biology, publicado por John Wiley and Son (1998), capítulo 16. Tal como se describe en el presente documento, la secuencia de ácido nucleico se inserta en el gen N1L por recombinación homóloga.
- Tal como se describe en el presente documento, se proporciona un virus de vaccinia deficiente en TK que comprende un gen N1L inactivado.
- Existen múltiples cepas de virus de vaccinia con distintos niveles de virulencia para seres humanos y animales. Varias cepas del virus fueron utilizadas en todo el mundo como parte del programa de erradicación de la viruela en la década de 1950. Por ejemplo, la cepa de la New York City Board of Health (NYCBOH) y su derivada, Wyeth, eran populares en Estados Unidos, mientras que las cepas de Copenhagen (CPN) y Lister predominaban en Europa. Tal como se describe en el presente documento, la cepa de vaccinia es Lister.
- Un virus de vaccinia deficiente en TK, tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un virus de vaccinia que presenta un fenotipo coherente con una falta de timidina cinasa (TK) endógena. Un virus de vaccinia deficiente en TK depende de la timidina cinasa producida por la célula hospedadora. La timidina cinasa se produce de forma constitutiva en las células tumorales, pero no en las células normales. Por lo tanto, un virus de vaccinia deficiente en TK puede sobrevivir selectivamente en células tumorales, en especial con la activación de las vías de EGFR/Ras/ERK. Una célula hospedadora es cualquier célula que el virus pueda infectar.
- Tal como se describe en el presente documento, el virus de vaccinia deficiente en TK comprende un gen N1L inactivado. La inactivación descrita en el presente documento se refiere al silenciamiento del gen a nivel transcripcional o postranscripcional, la delección del gen, una mutación en el gen, la interrupción del gen mediante la inserción de una secuencia de ácido nucleico o cualquier otro procedimiento que haga que el virus sea incapaz de crear un producto génico totalmente funcional. La inactivación de un gen puede ser parcial o completa. Tal como se describe en el presente documento, la inactivación de N1L se realiza mediante la inserción de una secuencia de ácido nucleico. La inserción puede verse facilitada por la recombinación homóloga.
- La secuencia de ácido nucleico insertada puede estar comprendida en un vector o un casete de expresión.
- Tal como se describe en el presente documento, la secuencia de ácido nucleico codifica un polipéptido heterólogo. El polipéptido heterólogo podría ser biológicamente activo. Tal como se describe en el presente documento, en la invención, el polipéptido biológicamente activo es terapéutico.
- Tal como se describe en el presente documento, la secuencia de ácido nucleico codifica un agente inductor de ARNi, un agente de ARNi, ARNip, ARNhc, miARN, ARN antisentido, ribozimas, ADN catalítico y similares. Tal como se describe en el presente documento, la secuencia de ácido nucleico codifica un sensibilizador a la radiación y/o a la quimioterapia.
- Tal como se describe en el presente documento, se proporciona una composición que comprende un virus de vaccinia deficiente en TK. Tal como se describe en el presente documento, la composición comprende además un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.
- La composición puede adaptarse para su administración por cualquier vía apropiada, por ejemplo, por vía oral (incluida la bucal o sublingual), tópica (incluida la bucal, sublingual o transdérmica) o parenteral (incluida la subcutánea, intramuscular, intravenosa, intraarterial, intratecal, intrapleural, intraoftalmológica, intracardiaca, intraperitoneal o intradérmica).

Las composiciones farmacéuticas adaptada para la administración parenteral incluyen soluciones inyectables estériles acuosas y no acuosas, que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos y solutos que hacen que la formulación sea sustancialmente isotónica con la sangre del receptor previsto, y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión y agentes espesantes.

- 5 Los excipientes que pueden utilizarse para las soluciones inyectables incluyen agua, alcoholes, polioles, glicerina y aceites vegetales, por ejemplo. Las composiciones pueden presentarse en envases de dosis unitaria o multidosis, por ejemplo, ampollas y viales herméticamente cerrados, y pueden conservarse en condición deshidratada por congelación (liofilizada) que únicamente requiere la adición del vehículo líquido estéril, por ejemplo, agua para inyección inmediatamente antes de ser utilizadas. Pueden prepararse soluciones y suspensiones para inyección improvisadas a partir de polvos, gránulos y comprimidos estériles.

Las composiciones farmacéuticas pueden contener conservantes, solubilizantes, estabilizantes, humectantes, emulsionantes, edulcorantes, colorantes, odorantes, sales (las sustancias de la presente invención pueden proporcionarse en forma de sal farmacéuticamente aceptable), tampones, agentes de recubrimiento o antioxidantes. También pueden contener agentes terapéuticamente activos además de la sustancia de la presente invención.

- 15 Tal como se describe en el presente documento, se proporciona un procedimiento para tratar el cáncer que comprende administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un virus de vaccinia deficiente en TK que comprende un vector o secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido heterólogo, en el que dicho virus comprende además un gen N1L inactivado.

- 20 Tal como se utiliza en el presente documento, un sujeto se refiere a un animal, incluido un ser humano. Un animal puede incluir ratones, ratas, aves de corral, tales como pollos, rumiantes, tales como vacas, cabras, ciervos y ovejas, y otros animales, tales como cerdos, gatos, perros y primates, tales como seres humanos, chimpancés, gorilas y monos.

- 25 Una cantidad terapéuticamente eficaz es la dosis suficiente para inducir la oncolisis. Las dosis de suministro y administración pueden basarse en los protocolos actuales existentes, determinarse empíricamente, utilizando modelos de enfermedades animales u, opcionalmente, en ensayos clínicos en seres humanos. Las dosis del estudio inicial pueden basarse en los estudios con animales expuestos en el presente documento, para un ratón, por ejemplo. Las dosis pueden variar y depender de si el tratamiento es profiláctico o terapéutico, el tipo, el momento de aparición, la progresión, la gravedad, la frecuencia, la duración o la probabilidad de la enfermedad a la que se dirige el tratamiento, el criterio de valoración clínico deseado, los tratamientos previos o simultáneos, el estado general de salud, la edad, el sexo, la raza o la competencia inmunológica del sujeto y otros factores que apreciará el experto en la materia. La cantidad de dosis, el número, la frecuencia o la duración pueden aumentarse o reducirse proporcionalmente, según lo indiquen los efectos secundarios adversos, las complicaciones u otros factores de riesgo del tratamiento o la terapia y el estado del sujeto. El experto apreciará los factores que pueden influir en la dosis y la posología necesarias para proporcionar una cantidad suficiente para proporcionar un beneficio terapéutico o profiláctico.

- 35 Tal como se describe en el presente documento, el procedimiento comprende además administrar al sujeto una terapia adicional contra el cáncer. La terapia contra el cáncer, tal como se utiliza en el presente documento, se refiere al tratamiento del cáncer por cualquier medio médico o físico. La terapia adicional contra el cáncer puede ser quimioterapia, terapia biológica, radioterapia, inmunoterapia, terapia hormonal, terapia antivascular, crioterapia, terapia con toxinas y/o cirugía, incluidas las combinaciones de las mismas.

- 40 Los procedimientos y los usos de la invención divulgados en el presente documento pueden practicarse inmediatamente o días, meses o años después de que se haya identificado que un sujeto padece la enfermedad objeto de tratamiento.

- 45 Los procedimientos incluyen la administración del virus en diferentes pautas. Puede administrarse una dosis única del virus a un sujeto o a un tumor durante un periodo de 1, 2, 5, 10, 15, 20 o 24 horas. El virus puede administrarse durante 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o más días o semanas. El intervalo entre inyecciones puede ser de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 días o semanas. Generalmente, se administran múltiples dosis a la misma región diana general, tal como en la proximidad de un tumor o, en el caso de la administración intravenosa, un punto de entrada concreto en el torrente sanguíneo o el sistema linfático de un sujeto. El vector del virus de vaccinia puede administrarse 2, 3, 4, 5 o más veces. El vector del virus de vaccinia podría administrarse antes de la resección de los tumores en diferentes pautas y dosis.

- 50 Los procedimientos incluyen la administración del virus a diferentes concentraciones virales. En ciertos aspectos, al sujeto se le administran al menos  $5 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $2 \times 10^8$ ,  $5 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^9$ ,  $2 \times 10^9$ ,  $5 \times 10^9$ ,  $1 \times 10^{10}$ ,  $5 \times 10^{10}$ ,  $1 \times 10^{11}$ ,  $5 \times 10^{11}$ ,  $1 \times 10^{12}$  o más partículas virales o unidades formadoras de placa ("plaque forming units", pfu), incluidos los diversos valores e intervalos entre ellos. La dosis viral puede administrarse en 0,1 ml, 1 ml, 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml, 6 ml, 7 ml, 8 ml, 9 ml, 10 ml o más, incluidos los valores e intervalos intermedios. La dosis puede repartirse a lo largo del tiempo o mediante una inyección separada.

- 55 Tal como se describe en el presente documento, el sujeto es un ser humano con cáncer y/o un tumor. El cáncer puede ser un cáncer gastrointestinal, un cáncer del aparato respiratorio, un cáncer del aparato genitourinario, un cáncer

- hematopoyético, un sarcoma, un adenocarcinoma, un carcinoma de células escamosas o un tumor/hiperplasia no maligno. El tumor puede ser no resecable antes del tratamiento y resecable después del tratamiento. El tumor puede ser recurrente, primario, metastásico y/o resistente a múltiples fármacos. En ciertos aspectos, el tumor se sitúa sobre el páncreas o dentro del mismo. En otros aspectos, el tumor puede ser un tumor neuroendocrino, un tumor endocrino, un tumor del sistema nervioso central periférico, un tumor de cáncer cerebral, un tumor de cáncer de cabeza y cuello, un tumor de cáncer de esófago, un tumor de cáncer de piel, un tumor de cáncer de pulmón, un tumor de hígado, un tumor tímico, un tumor de cáncer de estómago, un tumor de cáncer de colon, un tumor de cáncer de ovario, un tumor de cáncer de útero, un tumor de cáncer de vejiga, un tumor de cáncer de testículo, un tumor de cáncer de vejiga, un tumor de cáncer de recto, un melanoma o un tumor de cáncer de mama.
- Las composiciones y los procedimientos divulgados pueden utilizarse en diferentes tipos de terapia génica, por ejemplo, terapia génica supresora de tumores, terapia de genes suicidas, estrategias de inmunización con vectores virales, terapia antiangiogénica, terapia génica proapoptótica y terapia de sustitución génica ("Oncolytic Viruses for Cancer Therapy: Overcoming the Obstacles" (Wong *et al.*, Viruses, 2010, 2, 78-106)).
- Las composiciones y los procedimientos divulgados pueden usarse en combinación con medios o procedimientos terapéuticos adicionales en el tratamiento del cáncer, por ejemplo, cirugía, quimioterapia, radioterapia, terapia molecular del cáncer o una terapia génica adicional, que puede usarse para administrar genes diferentes de los ácidos nucleicos de la invención descritos en el presente documento.
- Las características preferentes del segundo aspecto y de aspectos posteriores de la invención son como para cada el primer aspecto *mutatis mutandis*.
- Líneas celulares: Todas las líneas celulares tumorales utilizadas fueron almacenadas en el laboratorio de los inventores, bien procedentes de ATCC o de Cancer Research UK Cell line Service Unit o fueron amablemente facilitadas por colaboradores. Todas las líneas celulares de cáncer humano se genotipificaron mediante el ensayo STR. Las líneas celulares tumorales murinas utilizadas en este estudio incluyen: la línea celular de cáncer colorrectal CT26 que se derivó de la raza BALB/c, mientras que CMT93 (colorrectal), LLC (cáncer de pulmón de Lewis) y B16-F10 (melanoma metastásico) se originaron a partir de la raza C57BL/6. SCC7 es un carcinoma escamoso derivado del cáncer de cabeza y cuello, procedente de ratones C3H/HeN y donado amablemente por el Dr. Osam Mazda (Departamento de Microbiología, Universidad Prefectural de Medicina de Kioto, Japón), MOSEC es una línea celular de carcinoma ovárico murino. Panc02 es una línea celular de carcinoma pancreático murino inducido químicamente; DT6606 (carcinoma pancreático) procede de un ratón transgénico de raza C57BL/6 con mutación en el K-Ras condicional al páncreas. Fue un amable regalo del profesor David Tuveson (CRUK, Cambridge Research Institute, Cambridge, Reino Unido). Además, el grupo de los inventores había transfectado previamente de forma estable la línea celular DT6606 con un plásmido que contenía el gen de la ovoalbúmina de pollo (DT6606-ova). Por último, CV1 es una línea celular de riñón "normal" de mono verde africano obtenida del ATCC, VA, EE. UU. y se utilizó como línea celular madre para facilitar la producción masiva de virus, así como en todos los ensayos de valoración viral. Las líneas celulares de cáncer humano utilizadas en esta invención incluyen: las líneas celulares de carcinoma pancreático humano SUI-2, MIAPaCa2, PANC1, PT-45 y Capan-2; las líneas celulares de carcinoma colorrectal humano HT29, HCT116 y SW620, la línea celular de adenocarcinoma gástrico MKN45 y la línea celular de carcinoma ovárico humano A2780.
- Virus: El VVL15 se construyó mediante la inserción de los genes indicador lacZ y de luciferasa de luciérnaga en la región TK de la cepa Lister del virus de vaccinia bajo el control de los promotores sintéticos temprano/tardío y p7.5, respectivamente, utilizando una técnica de recombinación intracelular *in vitro* descrita previamente en Timiryasova T.M. *et al.*, Biotechniques, 2001, 31:534, 6, 8-40. VVL15 es deficiente en TK.
- Los virus WRLuc, de delección de TK, y WRDD, de delección doble (TK y VGF), fueron proporcionados amablemente por el Dr. Steve Thorne (Universidad de Pittsburgh, EE. UU.) y el Dr. A. McCart (Universidad de Toronto, Canadá), respectivamente.
- Producción viral masiva: La expansión viral primaria anterior se congeló y descongeló rápidamente dos veces y se diluyó en el volumen necesario de MC FCS al 5 % para infectar entre 36 y 40 matraces T175 con células CV1 (con una confluencia del 80-90 %). Cuarenta y ocho horas después, se recolectaron las células CV1 infectadas y, mediante rondas repetidas de centrifugación a una velocidad de 2000 rpm durante 5 minutos (a 4 °C), se recogieron en un único sedimento. El sedimento se lavó en PBS, se resuspendió en 12 ml de tampón Tris-HCl 10 mM (pH 9) y se almacenó a -80 °C para su posterior purificación.
- Purificación de los virus: La suspensión concentrada del lisado viral anterior se congeló y descongeló dos veces y se transfirió a un homogeneizador Dounce (Thermofisher) y se homogeneizó mediante 60 golpes. A continuación, se sometió a ultrasonidos durante 30 segundos. Tras centrifugar a 2000 rpm a 4 °C durante 5 minutos, se recogió el sobrenadante (que contenía las partículas viriónicas liberadas) y se diluyó hasta un volumen total de 30 ml con tampón Tris-HCl 10 mM. La solución se dividió en cuatro partes alícuotas; cada una se colocó suavemente en capas sobre 17 ml de una solución de glucosa al 36 % en un tubo de ultracentrífuga Beckman de 36 ml y se centrifugó a 13 500 rpm durante 80 minutos a 4 °C. Los sedimentos resultantes se volvieron a suspender hasta un total de 16 ml en Tris-HCl 10 mM, se dividieron de nuevo en cuatro y se colocaron cuidadosamente en capas sobre otros cuatro gradientes de

- glucosa, esta vez graduados desde el 25 % p/m cerca de la superficie hasta el 40 % en la base de cada tubo. Se realizó una segunda ronda de ultracentrifugación. Esto fue necesario para eliminar más partículas de restos celulares, que podrían ser tóxicas tras administrarse por vía intravenosa a los ratones. Los sedimentos finales se volvieron a suspender en 1 a 4 ml de tampón de resuspensión viral (PBS; glicerol al 10 %; NaCl 138 mM; pH 7,4). Una muestra de virus purificado se valoró mediante un ensayo de TCID<sub>50</sub> como se describe a continuación.
- 5
- Replicación de los virus: Las células se sembraron a razón de 2 a 4 × 10<sup>5</sup> células por pocillo, en función de las tasas de crecimiento, en tres pocillos de placas de 6 pocillos en medio con un FCS al 10 % y se infectaron con 1 PFU/célula de virus de vaccinia de 16 a 18 horas después. Las muestras se recogieron por triplicado en intervalos de 24 horas hasta 72 horas. La replicación vírica se detectó mediante la TCID<sub>50</sub> (dosis infecciosa para el 50 % de un cultivo tisular), tal como se describe en Wang *et al.* (J. Clin. Invest., 2009, 119:1604-1615).
- 10
- Análisis estadístico: Salvo que se indique lo contrario, se utilizó Graphpad Prism 5 para el análisis estadístico comparativo. Las comparaciones entre dos condiciones se realizaron mediante la prueba *t* de Student para datos independientes. Para más de una condición o para una variable adicional, tal como el tiempo, se realizó un ANOVA unidireccional o bidireccional, respectivamente. Las pruebas post hoc (Knewman-Keuls para ANOVA unidireccional y Bonferroni para ANOVA bidireccional) compararon pares específicos de condiciones dentro del experimento. Los datos de supervivencia se representaron en un gráfico de Kaplan-Meier con un análisis de rangos logarítmicos para determinar si las diferencias entre los grupos eran estadísticamente significativas.
- 15
- La invención se describirá a continuación haciendo referencia a los siguientes ejemplos, que se presentan únicamente como referencia y no deben interpretarse como limitantes de la invención.
- 20
- Se remite a una serie de dibujos, en los que:
- La figura 1 muestra la secuencia del promotor de vaccinia mH5 modificado.
  - La figura 2 muestra la secuencia del casete de expresión que comprende tres promotores mH5.
  - La figura 3 muestra la fórmula del vector que comprende una secuencia de ácido nucleico según la invención.
  - La figura 4 muestra una representación esquemática de los vectores VVL15N1L y del plásmido N1L pShuttle utilizados para crear nuevos vectores VVL15N1L. Los vectores se denominan como se indica. La barra horizontal larga representa el genoma de ADN bicatenario del VV. L024, N1L (L025), L026 y TK se refieren a unidades de transcripción.
  - La figura 5 muestra la confirmación de la delección de N1L en los vectores VVL15N1L.
  - La figura 6 muestra la distribución biológica de los vectores VVL15 y VVL15N1L en el tejido tumoral (figura 6a) y en ubicaciones externas (figuras 6b y 6c).
  - La figura 7 muestra la replicación de VVL15N1L en diferentes líneas celulares. Los gráficos de la izquierda representan curvas de replicación de WL15 (línea continua) en comparación con VVL15-N1L (línea discontinua); mientras que los de la derecha corresponden a VVL15-RFP (línea sólida) frente a VVL15-N1L (línea discontinua).
  - La figura 8 muestra la potencia citotóxica de VVL15N1L (sombreado) en comparación con VVL15-RFP (negro) diferentes líneas celulares.
  - La figura 9 muestra la potencia citotóxica de VVL15N1L y VVL15N1L armado con mL-12 o mGM-CSF.
  - La figura 10 muestra la producción de IFN- $\gamma$  en esplenocitos cocultivados con células SCC7 de crecimiento detenido (figura 10a) y VVL15 inactivado con calor (figura 10b) y tratados con VVL15, VVL15N1L o PBS.
  - La figura 11 muestra la producción de IFN- $\gamma$  en esplenocitos cocultivados con células DT6606-ova (figura 11a), antígeno de ovoalbúmina (figura 11b) y péptido B8R (figura 11c) y tratados con VVL15, VVL15N1L o PBS.
  - La figura 12 muestra la producción de IFN- $\gamma$  en esplenocitos cocultivados con células LLC de crecimiento detenido (figura 12a) y péptido B8R (figura 12b) tras el tratamiento con VVL15, VVL15N1L o PBS.
  - La figura 13 muestra la eficacia de WL15N1L en el modelo de ratón de cáncer de páncreas: tasa de crecimiento tumoral en DT6606 (figura 13a) y CMT-93 (figura 13c) tras el tratamiento con WL15, VVL15N1L o PBS y tasa de supervivencia en los modelos de tumor de flanco DT6606 (figura 13b) y CMT-93 (figura 13d) tras el tratamiento con VVL15, VVL15N1L o PBS.
  - La figura 14 muestra la eficacia de VVL15N1L en el modelo ortotópico de ratón de cáncer de pulmón. La figura 14a muestra los perfiles de peso individual de los ratones tratados con PBS, la figura 14b muestra el peso medio de los ratones de cada grupo en función del tiempo, y las figuras 14c y 14d muestran las
- 50

correspondientes curvas de supervivencia de Kaplan-Meier y los gráficos de mediana de supervivencia, respectivamente.

5 La figura 15 muestra los volúmenes tumorales en el modelo de tumor LLC tras la administración IT de VVL15RFP, VVL15N1L o PBS (figura 15a) y las metástasis en cada grupo de tratamiento en el momento del sacrificio (figura 15b).

La figura 16 muestra el crecimiento tumoral en modelos de flanco DT6606 tras el tratamiento con VVL15N1L, VVL15N1L-mIL-12, VVL15N1L-mGM-CSF o PBS (figura 16a) y las correspondientes curvas de supervivencia de Kaplan Meir (figura 16b).

La figura 17 muestra la evaluación del VV armado con IL-21 *in vitro*.

10 La figura 18 muestra la eficacia antitumoral de VV- $\Delta$ Tk $\Delta$ N1L-mIL-21, VV- $\Delta$ Tk $\Delta$ N1L-hIL-21 y el virus de control VV- $\Delta$ Tk $\Delta$ N1L.

La figura 19 muestra secuencias de IL-12A, IL-12B, IL-21 isoforma 1, IL-21 isoforma 2 y GM-CSF humanas.

### Ejemplos

#### Ejemplo 1: Construcción del vector lanzadera pUC19-N1L

15 Los inventores construyeron un vector lanzadera pUC19-N1L ilustrado en la figura 3 que comprende un casete de expresión específico flanqueado por un fragmento que contiene L024, así como 31 pb de L025 (brazo izquierdo), y un fragmento que contiene 22 pb de L025, así como L026 (brazo derecho). El casete de expresión tiene las siguientes características: (1) están presentes tres promotores mH5 del virus de vaccinia, y debajo de cada promotor hay un sitio de enzima de restricción de clonación para la fácil inserción de cualquier gen de interés; (2) un gen indicador RFP está impulsado por un promotor mH5 para la selección positiva del virus de recombinación; (3) el promotor mH5 sólo impulsa la expresión del gen insertado de izquierda a derecha. La estrategia de recombinación homóloga utilizada en esta invención fue diseñada para reemplazar casi la totalidad de la secuencia codificante del locus L025 (N1L). El análisis de la secuencia en las zonas de unión de L024/25 y L025/26 confirmó que los ORF cadena arriba (22 pb) y cadena abajo (31 pb) de L025 permanecían intactos.

25 El ADNc de m-GM-CSF, h-GM-CSF, m-IL12 y h-IL12 se clonó mediante técnicas convencionales en el vector para su expresión bajo el control del promotor mH5 utilizando la enzima de restricción adecuada para sintetizar los vectores superlanzadera pUC19.

#### Ejemplo 2: Construcción de VVL15N1L.

30 La figura 4 muestra la cepa Lister del virus de vaccinia y diversas construcciones de virus de vaccinia creadas por los inventores. Cada uno de los vectores superlanzaderas pUC19 se transfectó (utilizando un protocolo basado en Effectene de Qiagen) en células CV1 que habían sido preinfectadas (2 h antes) con VVL15 (0,1 PFU por célula). Cuarenta y ocho horas después, la presencia de fluorescencia roja en el microscopio de fluorescencia confirmaba la expresión del casete correspondiente, bien a partir del plásmido citoplasmático, bien a partir de los relativamente pocos virus en los que la recombinación homóloga había tenido éxito. Estos últimos se seleccionaron de la siguiente manera. Las células y el sobrenadante se recogieron raspando las células de la placa y congelándolas y descongelándolas dos veces. Se utilizó 1  $\mu$ l de este lisado para infectar los 6 pocillos de una placa de seis pocillos que contenía células CV1 cultivadas hasta una confluencia del 80-90 %. Esta baja carga viral garantizaría la aparición de placas bien separadas.

Después de otras 48 horas, cada pocillo se examinó cuidadosamente al microscopio de fluorescencia en busca de las placas inducidas por el virus que presentaban fluorescencia roja. Una vez identificadas las colonias positivas, se marcó su ubicación en la superficie inferior de la placa con un rotulador permanente de punta fina. La colonia se recogió cuidadosamente con una punta de 20  $\mu$ l rellena con 5  $\mu$ l de MC FCS al 5 % después de aspirar el medio del pocillo. A continuación, la punta se sumergió en un criotubo que contenía 250  $\mu$ l de MC FCS al 5 %. Tras otros ciclos de congelación y descongelación, se añadieron 5-20  $\mu$ l de esta solución de virus a cada pocillo de una nueva placa de 6 pocillos que contenía células CV1 como antes. Este proceso se repitió hasta que todas las placas presentaron fluorescencia roja, es decir, que todas las colonias víricas se debían al virus recombinante. En general, se necesitaron entre 4 y 8 rondas de purificación en placa para obtener un lote puro de virus recombinante. En este punto, se raspó y recogió el lisado viral y se extrajo el ADN viral mediante un sistema basado en columnas (es decir, el Blood Mini Kit de Qiagen). También se analizó una muestra de sobrenadante para detectar la presencia de la citocina correspondiente mediante ELISA. La pureza del virus se confirmó mediante la amplificación por PCR del gen N1L a partir del ADN viral extraído. Su presencia indicaría contaminación con el virus originario, VVL15.

Una vez que las investigaciones preliminares habían confirmado la probable creación de un virus recombinante puro que expresaba el transgén pertinente, se añadieron 50  $\mu$ l de lisado viral a un matraz T175 que contenía células CV1, de nuevo cultivadas hasta una confluencia del 80-90 % en aproximadamente 30 ml de MC FCS al 5 %. Las células y los medios se recogieron por raspado 48 h después y se conservaron como "expansión vírica primaria".

Ejemplo 3: Confirmación de la delección de N1L en VVL recombinantes:

El gen N1L fue delecionado en todos los nuevos recombinantes de VVL (figura 5a). Se utilizaron cebadores sentido y antisentido del gen N1L para amplificar mediante PCR el ADN viral que se había extraído de células CV1 infectadas. Sólo los virus VVL15 contenían este gen. Se preveía que el segmento del gen N1L que contiene el par de cebadores mediría aproximadamente 750 pb. El gen A52R estaba presente en todos los recombinantes de VVL. Se utilizaron cebadores sentido y antisentido del gen A52R para amplificar por PCR este locus a partir de ADN extraído de células CV1 infectadas. Se preveía que el segmento del gen A52R que contiene el par de cebadores mediría aproximadamente 880 pb (figura 5b).

Ejemplo 4: Validación de la expresión de transgenes a partir de VVL recombinantes con delección del gen N1L:

Se analizó una muestra de sobrenadante de la ronda final de purificación en placa de cada virus recombinante armado con transgenes utilizando el kit ELISA específico de citocinas correspondiente, según el protocolo del fabricante (ebioscience, Biolegend). Para evaluar si cada transgén de citocina era expresado por el virus recombinante correspondiente tras la infección de células tumorales, se realizó el mismo montaje experimental que el descrito anteriormente en el ensayo de replicación viral. A las 24, 48 y 72 horas de la infección vírica, se recogió sobrenadante de cada conjunto duplicado de pocillos y se determinó la concentración de citocina mediante ELISA siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras de control eran sobrenadantes recogidos de pocillos infectados con VVL15-N1L.

Ejemplo 5: Evaluación de la distribución biológica viral de los vectores VVL15N1L

Se inyectaron por vía subcutánea  $2 \times 10^6$  células CT26 en 100  $\mu$ l de DMEM sin suero en los flancos derechos rasurados de ratones BALB/c hembra de 7 semanas de edad. Una vez que los tumores alcanzaron aproximadamente 100 mm<sup>3</sup>, los ratones fueron distribuidos aleatoriamente en dos grupos. Se inyectó una dosis IV de  $1 \times 10^8$  PFU de VVL15 o VVL15-N1L a través de la vena de la cola. En los días 1, 3, 7 y 10 posteriores a las inyecciones de virus, se sacrificaron 3 ratones de cada grupo mediante inhalación de CO<sub>2</sub>. La sangre se extrajo mediante punción cardíaca hacia tubos Eppendorf de 1,5 ml preheparinizados. Éstos, junto con el tumor, el cerebro, los pulmones, el hígado, el bazo, los riñones y los ovarios recolectados, se congelaron inmediatamente en una placa de Petri flotando en isopentano preenfriado (a -80 °C). Posteriormente se descongelaron, se pesaron y se homogeneizaron (o se mezclaron en vórtice en el caso de la sangre) en DMEM sin suero. Las muestras se diluyeron con un volumen de 5  $\mu$ l por mg (o 5  $\mu$ l por  $\mu$ l de sangre). Tras un nuevo ciclo de congelación y descongelación, los homogeneizados tisulares se valoraron posteriormente para las PFU víricas vivas mediante el ensayo de TCID50.

Se realizó un experimento de distribución biológica para establecer si el virus administrado por vía intravenosa se diseminaba al tumor y para determinar cualquier replicación fuera de la diana (es decir, para determinar el grado de selectividad tumoral y, por lo tanto, la seguridad). Para esta sección se utilizó el modelo de flanco subcutáneo CT26, tal como se describe en la sección de Procedimientos. Tras la inyección en la vena caudal, ambos virus pudieron recuperarse del tejido tumoral hasta al menos 10 días después de la inyección. La valoración máxima se alcanza entre 3 y 7 días. Inesperadamente, la recuperación viral de VVL15N1L no se redujo en los tejidos tumorales en comparación con VVL15 (figura 6a).

Con respecto a la replicación fuera de la diana, con la excepción del tejido pulmonar, no se recuperó el virus de ningún otro órgano ni de sangre dentro de las 24 horas posteriores a la inyección. Después de 24 h, la recuperación viral de VVL15-N1L fue significativamente menor que la de VVL15 en el tejido hepático y esplénico y totalmente ausente en el tejido renal. Ninguno de los virus se recuperó a niveles detectables en el cerebro, el corazón, los ovarios o la circulación en ningún momento de este experimento (figura 6b). En cambio, el virus persistió en los pulmones hasta al menos 3 días. Incluso en este órgano, la recuperación de VVL15-N1L fue significativamente menor en comparación con VVL15. Por lo tanto, el nuevo esqueleto de VVL15N1L parecía tener una selectividad aún mayor para el tejido tumoral que WL15.

Ejemplo 6: Replicación de VVL15N1L en diferentes líneas celulares

Existen múltiples mecanismos por los que una célula tumoral puede ser eliminada por el virus de vaccinia. Entre ellos se encuentran las defensas innatas del hospedador que desencadenan la apoptosis, la muerte por estallido celular mediada por virus y los mecanismos de defensa inmunológica del hospedador. Si un virus es excesivamente citotóxico para una célula, puede que no genere suficiente progenie para autopropagarse a través de un tumor. Además, cabe esperar que su capacidad de replicación se correlacione positivamente con la expresión de su transgén terapéutico, ya que habrá más copias del virus presentes.

Todas las líneas celulares fueron permisivas a la infección con VVL15 y VVL15N1L. La línea celular tumoral más permisiva fue SCC7, que dio lugar a valoraciones virales de más de 1000 PFU/por célula tan sólo tres días después de haber sido infectada inicialmente con 1 PFU/por célula. Este resultado contrasta con el del ensayo de citotoxicidad celular (MTS), en el que SCC7 fue la línea celular más resistente. La línea celular menos permisiva a la replicación fue CMT93. Las valoraciones virales se estabilizaron al tercer día en las líneas celulares CMT93 y DT6606. Es probable que esto refleje el rendimiento superior de la replicación viral en comparación con la replicación de células no

infectadas (con viriones que se quedan sin células que infectar), junto con la posible degradación viral por las proteasas liberadas de las células lisadas. Sólo se observó una atenuación estadísticamente significativa de la replicación de VVL15N1L en CMT-93 (figura 7).

Ejemplo 7: Potencia citotóxica de VVL15N1L

5 VVL15-N1L fue comparado con VVL15-RFP por su citotoxicidad en una gama de líneas celulares de cáncer murino *in vitro*. Las células se sembraron a  $1 \times 10^3$  o  $1 \times 10^4$  células por pocillo, en función de las tasas de crecimiento, en placas de 96 pocillos, y se infectaron con virus de 16 a 18 horas después. La supervivencia celular el día 6 tras la infección vírica se determinó mediante el ensayo MTS, y el valor de CE50 (dosis vírica que mata el 50 % de las células tumorales) se calculó como se describe en Wang *et al.* (J. Clin. Invest., 2009, 119:1604-1615). Todos los ensayos se  
10 realizaron al menos tres veces. Basándose en los valores de CE50 (es decir, las PFU necesarias para matar el 50 % de las células), no hubo diferencias significativas en la citotoxicidad entre los dos virus en las células CT26 y DT6606. Por el contrario, VVL15-N1L fue significativamente más potente en comparación con WL15 a la hora de destruir células CMT93, LLC y SCC7 (figura 8).

15 También se comparó la potencia citotóxica del VVL15N1L armado. Los valores de CE50 fueron significativamente superiores a los de VVL15-N1L (es decir, fueron menos potentes que VVL15-N1L a la hora de destruir la línea celular en cuestión) en todas las líneas celulares excepto LLC y CMT93. El recombinante VVL15-N1L-mL12 pareció ser más potente que el VVL15-N1L-mGMCSF en todas las líneas celulares, una característica que alcanzó significación estadística en las células SCC7 y DT6606 (figura 9).

Ejemplo 8: VVL15N1L induce un mayor nivel de respuesta inmunitaria del hospedador contra el antígeno tumoral

20 Se utilizaron tres modelos tumorales *in vivo* singénicos: Células SCC7 en ratones de la raza C3H/HeN; células DT6606-ova en ratones de la raza C57BL/6 y células LLC en ratones de la raza C57BL/6.

Se establecieron modelos subcutáneos de tumores de flanco y se trataron con una dosis única de virus o PBS como se indica en la tabla 2. Para garantizar la generación oportuna de células T específicas del virus y del tumor, se recogieron los bazos a los 14 días de la infección. Se realizaron ensayos de liberación de IFN- $\gamma$  en las suspensiones  
25 de esplenocitos generadas posteriormente.

(1) Preparación de una suspensión unicelular de esplenocitos a partir de bazos recolectados

Se establecieron tumores de flanco subcutáneos singénicos para la línea celular tumoral pertinente como se describe a continuación (véase también la tabla 2). Una vez que los tumores alcanzaron un volumen de aproximadamente 100  
30 mm<sup>3</sup>, los ratones fueron distribuidos aleatoriamente en tres grupos. Se inyectaron por vía intratumoral (IT)  $1 \times 10^8$  PFU del virus VVL15 o VVL15-N1L en 50  $\mu$ l de PBS utilizando una jeringa de insulina de 1 ml conectada a una aguja de calibre 29. La aguja se hizo pasar varias veces en distintas direcciones por el tumor durante el despliegue del virus para lograr una amplia diseminación. Al tercer grupo se le inyectó un volumen equivalente de tampón vehículo, es decir, 50  $\mu$ l de PBS. Catorce días después de la infección, los animales fueron sometidos a eutanasia mediante  
35 inhalación de CO<sub>2</sub>. Los bazos se recogieron en condiciones estériles, se trituraron a través de coladores celulares de 70  $\mu$ m (Becton Dickinson Falcon) utilizando el extremo plano del émbolo de una jeringa de 2 ml y se enjuagaron con medio de cultivo de linfocitos T (MCT) (RPMI-1640, FCS al 10 %, estreptomycin/penicilina al 1 %, piruvato de sodio al 1 %) en matraces de Erlenmeyer de 50 ml. Los esplenocitos granulados se volvieron a suspender en 5 ml de tampón de lisis de glóbulos rojos (Sigma-Aldrich) tras una centrifugación a 1200 rpm y se mantuvieron en hielo durante 5  
40 minutos. Tras un ciclo de lavado y centrifugación, se volvieron a suspender con MTC hasta una concentración final de  $5 \times 10^6$  células/ml.

(2) Preparación de células estimuladoras de tumores enteros de crecimiento detenido:

Se preparó una suspensión unicelular de  $5 \times 10^6$ /ml de células estimuladoras (es decir, la línea celular tumoral diana o de control pertinente-SCC7, LLC o DT6606-ova) en medio de cultivo celular (MC) en un matraz de Erlenmeyer de  
45 50 ml. A esta suspensión se le añadió una solución de 1 mg/ml de mitomicina C (MMC) (Roche) para alcanzar una concentración final de 100  $\mu$ g/ml y se incubó en un incubador humidificado a 37 °C en aire con un 5 % de CO<sub>2</sub> durante 1 hora. Posteriormente, las células se lavaron dos veces con 40 ml de PBS, se volvieron a suspender en 40 ml de MC y se incubaron hasta que estuvieron listas para sembrar (en 30 a 60 minutos). Las células estimuladoras, ahora con el crecimiento detenido, se volvieron a suspender en MTC para alcanzar una concentración final de  $5 \times 10^5$  células/ml.

(3) El ensayo de liberación de IFN- $\gamma$  como marcador indirecto de la activación de linfocitos T tumorales/específicos de antígeno:

Este ensayo se basa en la liberación de IFN $\gamma$  cuando los linfocitos T de memoria son activadas por su complejo de epítipo-MHC afín. El agrupamiento de esplenocitos debe contener todos los tipos celulares (por ejemplo, APC, linfocitos Th) necesarios para la estimulación de los linfocitos T CD8+. Se cocultivaron 100  $\mu$ l de cada una de las suspensiones de esplenocitos de (1) con 100  $\mu$ l de la suspensión de células estimuladoras del tumor diana anterior en  
55 pocillos triplicados de una placa de 96 pocillos de fondo redondo (es decir,  $5 \times 10^5$  esplenocitos con  $5 \times 10^4$  células tumorales de crecimiento detenido). Los pocillos de control sólo con esplenocitos contenían  $5 \times 10^5$  esplenocitos en

200 µl de MCT. Cuando proceda, los esplenocitos también se cocultivaron con 100 µl de péptido de ovoalbúmina (H-2Kb/ SIINFEKL, Proimmune) en MCT (para alcanzar una concentración final de 5 µg/ml) o 100 µl de MCT que contenía  $5 \times 10^4$  células tumorales de control de crecimiento detenido compatibles con MHC (B16-F10 cuando se utilizó un modelo tumoral derivado de ratón C56BL/6).

- 5 Además, para probar que el virus había sido administrado y, lo que es más importante, que el animal era capaz de organizar una respuesta inmunitaria *per se*, los esplenocitos también se cocultivaron como se ha indicado anteriormente con VVL15 inactivado con calor (100 PFU por célula, calentado hasta 56 °C durante 2 h) o un péptido VV B8R (H-2Kb/ TSYKFESV, Proimmune), un epítipo viral de vaccinia fuertemente antigénico (para alcanzar una concentración final de 5 µg/ml). Este experimento serviría también de control positivo para el propio ensayo.
- 10 Las placas se incubaron a 37 °C en aire y 5 % de CO<sub>2</sub> durante tres días, tras lo cual se centrifugaron a 1200 rpm durante 5 minutos. Se determinó la concentración de IFN-γ en los sobrenadantes extraídos de cada uno de los pocillos utilizando un kit ELISA de IFN-γ específico para murinos (Biolegend). La concentración final de IFN-γ, promediada en pocillos duplicados, se determinó tras deducir los valores correspondientes obtenidos de los pocillos que contenían esplenocitos solos.
- 15 El modelo SCC es un modelo murino agresivo de cáncer escamoso de cabeza y cuello que, al igual que su homólogo en los cánceres humanos de cabeza y cuello, es poco inmunogénico. Tal como se demuestra en la figura 10a-b, los esplenocitos del grupo tratado con VVL15-N1L produjeron niveles significativamente más altos de IFN-γ que el grupo VVL15 en respuesta al cocultivo con células SCC7 de crecimiento detenido. Se observó un nivel bajo pero significativo de producción de IFN-γ a partir de esplenocitos tratados con PBS. Esto probablemente reflejaba la respuesta inmunitaria natural del hospedador contra el tumor. Como era de esperar, no hubo producción de IFN-γ por los esplenocitos en respuesta al cocultivo con VVL15 inactivado con calor en el grupo PBS. Sorprendentemente, no hubo diferencias significativas entre los otros dos grupos en los niveles de IFN-γ tras el cocultivo con virus inactivado (figura 10b). Cabe señalar que los niveles absolutos de IFN-γ tras el cocultivo con VVL15 inactivado fueron inferiores en magnitud en comparación con los obtenidos tras el cocultivo con células tumorales de crecimiento detenido. Es probable que esto se deba a variaciones en los epítopos tumorales o víricos inmunogénicos presentados. En experimentos posteriores, para garantizar la normalización del epítipo, se utilizó un epítipo inmunogénico VV B8R en lugar de WL15 inactivado.
- 20
- 25

También se investigó la inmunidad del hospedador inducida por el VV en un modelo de cáncer de páncreas. Como no se había definido el perfil del antígeno asociado al tumor ("tumour associated antigen", TAA) de la línea celular DT6606, se creó la línea celular DT6606-ova, que expresaba de forma estable el antígeno extraño ovoalbúmina, para demostrar la generación supuesta de una respuesta inmunitaria específica de antígeno (en este caso, una respuesta antiovoalbúmina). Esta línea celular se utilizó para crear un modelo singénico subcutáneo de flanco, tal y como se describe en la tabla 2. A los 14 días de la inyección IT del virus, el grupo tratado con VVL-N1L mostró una respuesta de IFN-γ significativamente mayor de los esplenocitos recogidos en comparación con los grupos de tratamiento con VVL15 o PBS en cocultivo con células DT6606-ova de crecimiento detenido (figura 11a). Hubo un nivel relativamente alto de producción de IFN-γ en el grupo de PBS, de hecho no diferente del grupo de tratamiento con VVL15. La ovoalbúmina es un antígeno extraño, propenso a estimular una fuerte respuesta antiovoalbúmina, por lo que este resultado no es sorprendente. El grupo de tratamiento con N1L también produjo el nivel más alto de IFN-γ cuando los esplenocitos se cocultivaron con el antígeno ovoalbúmina (aunque no se alcanzó significación estadística) (figura 11b).

30

35

40 Una vez más, la respuesta de IFN-γ de los esplenocitos entre los grupos virales no fue estadísticamente diferente tras el cocultivo con el epítipo B8R, aunque la magnitud de la respuesta fue casi 10 veces mayor en comparación con los ensayos de cocultivo de antígeno tumoral/tumor.

Es probable que los marcadores de selección extraños, como la RFP, sean inmunogénicos y podría decirse que han causado los resultados *in vivo* obtenidos hasta ahora. Para controlar esta posibilidad, se utilizó VVL15-RFP como virus de control (en lugar de WL15) en un modelo de flanco de LLC singénico subcutáneo (véase la tabla 2). Por lo demás, el montaje experimental fue idéntico al de los experimentos de SSCVII y DT6606.

45

Los resultados anteriores fueron replicados en este modelo, y la mayor producción de IFN-γ correspondió a los esplenocitos del grupo de tratamiento VVL15-N1L cocultivados con células LLC de crecimiento detenido (figura 12a). Esto fue estadísticamente significativo en comparación con los grupos VVL15-RFP y PBS. No hubo diferencias significativas entre los grupos de tratamiento viral tras el cocultivo de esplenocitos con péptido B8R (figura 12b). En el grupo VVL15-N1L, el cocultivo de esplenocitos con células B16-F10 de crecimiento detenido (como población celular estimuladora de control específica del haplotipo MHC) condujo a un nivel de IFN-γ inferior pero estadísticamente no significativo en comparación con el cocultivo con células LLC de crecimiento detenido ( $p = 0,0594$ ). Es probable que estas y otras líneas celulares de tumores sólidos compartan una serie de epítopos tumorales. Los CTL generados contra éstos podrían haber sido responsables de los niveles de IFN-γ obtenidos en el grupo B16-F10.

50

55

Ejemplo 9: Eficacia de VVL15N1L en el modelo de cáncer de páncreas

Se implantaron por vía subcutánea  $5 \times 10^6$  células CMT93 o  $3 \times 10^6$  células DT6606 en los flancos derechos rasurados de ratones macho C57BL/6 como se ha descrito anteriormente. Una vez que los volúmenes tumorales habían

alcanzado aproximadamente  $100 \text{ mm}^3$ , se distribuyeron aleatoriamente en tres grupos y se inyectó una dosis de  $1 \times 10^8$  PFU de virus en  $50 \mu\text{l}$  de PBS o  $50 \mu\text{l}$  de control de tampón vehículo PBS según las pautas de tratamiento descritos en la tabla 3 (pauta 1 y 2). Los volúmenes tumorales se controlaron mediante medición con calibrador dos veces por semana y los ratones se pesaron semanalmente. El crecimiento tumoral se siguió dos veces por semana y los animales fueron sometidos a eutanasia según las directrices del Ministerio del Interior cuando los volúmenes tumorales se aproximaron a  $1000 \text{ mm}^3$ . Hubo una reducción estadísticamente significativa en la tasa de crecimiento tumoral y una supervivencia prolongada a favor del agente VVL15-N1L en el tratamiento del modelo de tumor de flanco DT6606 (figura 13a-b), mientras que en el modelo CMT93 no hubo diferencias entre las tasas de crecimiento tumoral tras la administración IT de cualquiera de los agentes virales, aunque ambos tuvieron un crecimiento significativamente más lento que el grupo PBS (figura 13c-d).

Ejemplo 10: Supervivencia en cáncer de pulmón ortotópico tras la administración de VVL15N1L

Para evaluar si los virus eran eficaces cuando se administraban por vía intravenosa, se utilizó un modelo ortotópico de cáncer de pulmón. Se inyectaron  $5 \times 10^6$  células LLC en  $100 \mu\text{l}$  de PBS en las venas de la cola de ratones C57BL/6 hembra de 7 semanas de edad.

Se utilizaron tomografías computarizadas sin contraste de los pulmones para evaluar los volúmenes pulmonares de ratones individuales durante un período de tres semanas y se utilizó cualquier reducción para extrapolar la carga tumoral. En un momento determinado por la presencia inicial de tumor en la TC, se administraron tres dosis IV de virus/PBS según se indica en la tabla 3 (pauta 5). Los ratones se pesaban dos veces por semana y se sacrificaban si mostraban signos de sufrimiento o si la pérdida de peso superaba el 20 % de su peso máximo.

Todos los ratones desarrollaron tumores y murieron entre los 14 y 21 días, momento en el que la toracotomía confirmó la presencia de tumores pulmonares extensos. Los tumores aparecían inicialmente en la TC entre 4 y 7 días después de la inyección de células LLC, por lo que se eligió el día 5 después de la inyección como momento de inicio de la terapia.

Se administraron a 21 ratones inyecciones en la vena de la cola de  $0,5 \times 10^6$  células LLC en  $100 \mu\text{l}$  de DMEM sin suero. Se distribuyeron aleatoriamente en tres grupos y el tratamiento (véase la tabla 3, pauta 5) comenzó a partir del quinto día. Todos los ratones del grupo tratado con PBS presentaban síntomas a los 10 días de la inyección de células LLC, manifestados por la pérdida de peso, y todos habían muerto a los 21 días (figura 14). La mediana de supervivencia se prolongó 5 días con los tratamientos virales VVL15 y 6,5 días con VVL15-N1L, respectivamente, en comparación con el grupo PBS, aunque no hubo diferencias estadísticamente significativas en la supervivencia entre los grupos virales.

Ejemplo 11: Diseminación metastásica en un modelo de cáncer de pulmón tras la administración de VVL15N1L

LLC es un modelo de tumor muy agresivo con propensión a metastatizar en el pulmón tras inyecciones subcutáneas en el flanco. De hecho, se ha observado que la extirpación quirúrgica de un tumor LLC de crecimiento subcutáneo aumenta la tasa de metástasis pulmonares, quizá por la eliminación de un inhibidor de la angiogénesis secretado por el tumor primario.

Para investigar si la inyección IT de VV recombinantes puede reducir esta tasa metastásica, se inyectaron  $1 \times 10^6$  células LLC por vía subcutánea en los flancos de ratones C57BL/6 hembra de 7 semanas de edad. Cuando los volúmenes tumorales fueron de aproximadamente  $100 \text{ mm}^3$ , se distribuyeron aleatoriamente en tres grupos. Las inyecciones de virus/ PBS se administraron por vía IT según la pauta de tratamiento de la tabla 3 (pauta 3). Los tumores se controlaron mediante medición con calibrador hasta que un grupo alcanzó el criterio de valoración en el que se requería el sacrificio (aproximadamente de 17 a 20 días después de la implantación). Todos los animales fueron sometidos a eutanasia al mismo tiempo, se les extrajeron los pulmones y se anotó cualquier depósito tumoral macroscópico. Se separaron los lóbulos pulmonares, se fijaron en formol al 4 %, se incluyeron en parafina, se tiñeron con hematoxilina y eosina y se seccionaron a través de la dimensión transversal mayor. Para cada lóbulo, también se realizaron cortes por encima y por debajo de la sección transversal más grande. Las tres secciones fueron examinadas en busca de depósitos tumorales por un patólogo que no conocía la pauta de tratamiento.

No hubo diferencias significativas entre los grupos con respecto a los volúmenes tumorales en el momento del sacrificio (figura 15a). Sin embargo, el porcentaje de ratones con metástasis pulmonares al final del experimento fue del 14 %, 43 % y 57 % para los grupos N1L, VVL15 y PBS, respectivamente (figura 15b). Estas cifras eran estadísticamente diferentes entre sí. Sin embargo, es difícil extraer conclusiones con un número tan reducido de ratones por grupo ( $n = 7$ ) y sería necesario repetir el experimento con muestras de mayor tamaño. Sin embargo, este resultado sugiere la posibilidad de que incluso si VVL15N1L no tiene ningún impacto en el crecimiento de un tumor primario agresivo, la terapia viral puede minimizar la diseminación. Por tanto, podría resultar una buena terapia adyuvante.

Ejemplo 12: Eficacia del VV15N1L armado con IL-12 y GM-CSF

Para aumentar la eficacia antitumoral de VVL15N1L, se insertaron GM-CSF e IL-12 en la región N1L del vector VVL15N1L. La potencia de cada uno de estos recombinantes se ensayó *in vivo* contra un modelo de flanco subcutáneo DT6606 singénico (véase la tabla 3, pauta 1). Cuando los volúmenes tumorales alcanzaron un promedio de  $100 \text{ mm}^3$ ,

se inyectaron por vía IT dosis diarias (5 en total) de  $1 \times 10^8$  PFU de virus (VVL15-N1L, VVL15-N1L-mGMCSF o VVL15-N1L-mIL12) o el volumen equivalente de control de tampón vehículo (50  $\mu$ l de PBS) ( $n = 7$  por grupo). Se realizó un seguimiento del crecimiento tumoral mediante mediciones con calibrador dos veces por semana (figura 16a). Las correspondientes curvas de supervivencia de Kaplan Meir (Fig. 16b) se basaron en la necesidad de sacrificar animales de forma humanitaria cuando los volúmenes tumorales superaban 1000 mm<sup>3</sup>. Las figuras 16a-b demuestran que el virus armado con el transgén GMCSF por sí solo no fue significativamente mejor que el VVL15-N1L, sin embargo el virus armado con IL12 mostró una potencia significativa, dando lugar a curaciones en 6/7 ratones y una supervivencia del 100 % al final del experimento. Estos virus armados se ensayarán en otros modelos para establecer la universalidad de este resultado.

## 10 Ejemplos 13 y 14 Construcciones de IL-21

Materiales y procedimientos:

Modelo murino de cáncer de páncreas: Se establecieron tumores singénicos subcutáneos DT6606 en ratones C57BL/6 macho. Cuando los tumores alcanzaron un diámetro de 5 a 6 mm, se administró PBS, VV- $\Delta$ Tk $\Delta$ N1L-mIL-21, VV- $\Delta$ Tk $\Delta$ N1L-hIL-21 o el virus de control VV- $\Delta$ Tk $\Delta$ N1L por vía intratumoral ( $5 \times 10^7$  pfu/inyección) los días 1, 3, 7, 9 y 11. El crecimiento tumoral se midió dos veces por semana y se controló la supervivencia de los animales. Los datos de supervivencia se compararon mediante Prism® (GraphPad Software, CA, EE. UU.) y se utilizó una prueba de rangos logarítmicos (Mantel Cox) para determinar la significación de las diferencias de supervivencia. La significación se determinó mediante una prueba de la *t* de Student para datos independientes ( $*p < 0,05$ ;  $**p > 0,01$ ;  $***p < 0,001$ ).

Modelos de cáncer en hámster sirio: Hámsteres sirios portadores de tumores HPD-1NR: Se sembraron  $1 \times 10^6$  células HPD-1 NR mediante inyección subcutánea en el flanco derecho de hámsteres sirios portadores de tumores HPD-1NR. Cuando los tumores alcanzaron 313 mm<sup>3</sup>, se administró PBS, VV- $\Delta$ Tk $\Delta$ N1L-mIL-21, VV- $\Delta$ Tk $\Delta$ N1L-hIL-21 o el virus de control VV- $\Delta$ Tk $\Delta$ N1L por vía intratumoral ( $5 \times 10^7$  pfu/inyección) los días 1, 3, 7, 9 y 11. Se midieron los tumores dos veces por semana y se controló la supervivencia de los animales. Los datos de supervivencia se compararon mediante Prism® (GraphPad Software, CA, EE. UU.) y se utilizó una prueba de rangos logarítmicos (Mantel Cox) para determinar la significación de las diferencias de supervivencia. La significación se determinó mediante una prueba de la *t* de Student para datos independientes ( $*p < 0,05$ ;  $**p > 0,01$ ;  $***p < 0,001$ ). Modelo de cáncer de páncreas diseminado en la cavidad peritoneal de hámster sirio: Se sembraron  $1 \times 10^7$  células SHPC6 en la cavidad peritoneal inferior derecha de hámsteres sirios. Cuatro días después, 10 hámsteres por grupo recibieron cada uno por inyección intraperitoneal (IP) 500  $\mu$ l de PBS,  $2 \times 10^7$  PFU de los diferentes VV los días 4, 6 y 8. Se controlaron las tasas de supervivencia de los hámsteres. Los datos de supervivencia se compararon mediante Prism® (GraphPad Software, CA, EE. UU.) y se utilizó una prueba de rangos logarítmicos (Mantel Cox) para determinar la significación de las diferencias de supervivencia ( $*p < 0,05$ ;  $**p > 0,01$ ;  $***p < 0,001$ ).

Ejemplo 13: Generación de VV armados con IL-21 y evaluación de la potencia antitumoral *in vitro*

Se insertaron secuencias de ADNc de IL-21 humana y de ratón en el vector lanzadera puc19N1L (tal como se muestra en la figura 3). Se llevaron a cabo recombinaciones homólogas convencionales en el esqueleto con supresión de TK del virus de vaccinia de la cepa Lister (VVL15) mediante la cotransfección del plásmido resultante pShuttleN1L-mIL-21, o pShuttleN1L-hIL-21 en células CV-1 (riñón de mono verde africano) preinfectadas con VVL15 a 0,05 PFU/célula. Los lisados de células CV-1 transfectadas se sometieron a un ensayo de placas. Se realizaron cinco rondas de purificación en placa para propagar un único virus clonal y se reconfirmó la modificación mediante PCR para la delección del gen N1L. Los virus resultantes se denominan VV- $\Delta$ Tk $\Delta$ N1L-mIL-21 y VV- $\Delta$ Tk $\Delta$ N1L-hIL-21. Para comprobar la potencia de estos virus, se utilizó un ensayo de muerte celular (ensayo MTS) para detectar la citotoxicidad de los tres virus de vaccinia en una línea celular de cáncer de páncreas murino (DT6606), derivada de un modelo de cáncer de páncreas transgénico Ras-p53 mutante.

La figura 17 muestra la evaluación del VV armado con IL-21 *in vitro*. Las figuras 17A y B muestran la citotoxicidad de diferentes virus de vaccinia oncolíticos en una línea celular murina de cáncer de páncreas. Se infectaron cultivos de la línea celular de cáncer de páncreas murino DT6606 derivada de ratones con cáncer de páncreas transgénico Ras-p53 con diferentes virus y se detectó la muerte celular mediante el ensayo MTS seis días después de la infección viral. La curva de muerte celular inducida por el virus se muestra en la figura 17A; se calcularon los valores de CE50 (dosis viral para matar el 50 % de las células cancerosas) (figura 17B). Un valor de CE50 más alto significa que el virus tiene menos potencia. Las figuras 17C y D muestran la detección de la expresión de IL-21 y la replicación viral de diferentes mutantes de la nueva generación de virus de vaccinia en células de cáncer de páncreas *in vitro*. Se infectaron cultivos de la línea celular de cáncer de páncreas murino DT6606 derivada de ratones con cáncer de páncreas transgénico Ras-p53 con diferentes virus, y se detectó la expresión de IL-21 mediante ensayo ELISA 24 horas después de la infección viral (figura 17C). La replicación viral se detectó mediante el ensayo de TCID50 se muestra en la figura 17D. Los experimentos se realizaron por triplicado.

Tal como se muestra en las figuras 17A y B, la nueva generación de virus de vaccinia oncolítico (VV- $\Delta$ Tk $\Delta$ N1L) sigue siendo muy eficaz para matar las células cancerosas; armar el virus con la citocina IL-21 no atenuó el virus, sino que aumentó la citotoxicidad contra las células cancerosas por un mecanismo (aún) desconocido ( $p < 0,01$ ).

5 Para comprobar si el gen terapéutico IL-21 puede expresarse en las células cancerosas infectadas por el virus y a qué nivel, se utilizó un ELISA para detectar la expresión de la proteína IL-21 de las células cancerosas pancreáticas infectadas por el virus VV- $\Delta$ Tk $\Delta$ N1L-mIL-21, VV- $\Delta$ Tk $\Delta$ N1L-hIL-21 y el virus de control VV- $\Delta$ Tk $\Delta$ N1L (DT6606). Tal como se muestra en la figura 17C, la IL-21 se expresó a un nivel muy alto en las células tras la infección con VV- $\Delta$ Tk $\Delta$ N1L-mIL-21 y VV- $\Delta$ Tk $\Delta$ N1L-hIL-21, pero la infección con el virus de control VV- $\Delta$ Tk $\Delta$ N1L no produjo proteínas IL-21. La replicación del virus armado con IL-21 no se atenuó en comparación con el virus de esqueleto (figura 17D).

#### Ejemplo 14: Eficacia antitumoral del VV15N1L armado con IL-21

Para comprobar si la IL21 puede potenciar la eficacia antitumoral del VV- $\Delta$ Tk $\Delta$ N1L, se ensayó la potencia de cada uno de estos virus (IL21 de ratón o IL21 humana) *in vivo* contra un modelo de flanco subcutáneo DT6606 singénico.

10 La figura 18 muestra la eficacia antitumoral de VV- $\Delta$ Tk $\Delta$ N1L-mIL-21, VV- $\Delta$ Tk $\Delta$ N1L-hIL-21 y el virus de control VV- $\Delta$ Tk $\Delta$ N1L. Modelo murino de cáncer de páncreas: Se presentan la curva de crecimiento tumoral (figura 18A) y la supervivencia (figura 18B) de los ratones tratados con diferentes agentes (n = 7/grupo). Hámsteres sirios portadores de tumores HPD-1NR: Se presentan la curva de crecimiento tumoral (figura 18C) y la supervivencia (figura 18D) de los ratones tratados con diferentes agentes (n = 7/grupo). En cada caso se muestra el tamaño medio del tumor  $\pm$  EEM hasta la muerte del primer hámster de cada grupo y se compara mediante ANOVA unidireccional con prueba post-hoc de Bonferroni. La figura 18E muestra la eficacia antitumoral de las cepas virales en el modelo de cáncer de páncreas diseminado en la cavidad peritoneal de hámster sirio inmunocompetente.

20 El virus armado con IL21 mostró una potencia significativa, redujo el crecimiento tumoral (figura 18A) y prolongó notablemente la supervivencia (figura 18B) de los ratones portadores de cáncer de páncreas. Dado que las citocinas humanas pueden actuar mejor en el hámster sirio que en el ratón, se empleó un modelo de cáncer de páncreas subcutáneo en hámster sirio para evaluar la eficacia antitumoral del virus armado con IL21. Sorprendentemente, el virus armado con IL21 mostró una potencia significativa, que condujo a curaciones en 6 de 7 animales y una supervivencia del 86 % al final del experimento (figura 18C y D). Basándose en la eficacia antitumoral en el modelo subcutáneo, los VV armados con IL12 o IL21 muestran una eficacia prometedora en comparación con el virus de control.

30 La principal barrera para mejorar la supervivencia de los pacientes con cáncer de páncreas es la falta de un agente terapéutico eficaz para el cáncer de páncreas avanzado. Con este fin, se utilizó un modelo bien caracterizado de hámster sirio con cáncer de páncreas diseminado peritonealmente para evaluar la viabilidad, la eficacia y la seguridad de los VV $\Delta$ Tk $\Delta$ N1L armados con IL12 e IL21. Los VV $\Delta$ Tk $\Delta$ N1L armados con IL-12 mostraron una toxicidad grave inducida tras la administración sistémica (figura 18E). Sorprendentemente, VV $\Delta$ Tk $\Delta$ N1L-IL21 tiene el mayor índice terapéutico para el tratamiento del cáncer de páncreas diseminado peritonealmente, y el 70 % de hámster sirio se curaron.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Una composición que comprende un virus de vaccinia deficiente en TK para su uso en el tratamiento de un cáncer y/o un tumor en un sujeto, en la que el sujeto también está recibiendo una terapia contra el cáncer, en la que el virus deficiente en TK comprende un gen N1L inactivado, en la que el gen N1L se inactiva mediante la inserción de una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido heterólogo, y en la que la secuencia de ácido nucleico comprende al menos tres promotores del virus de vaccinia, estando colocados dichos promotores del virus de vaccinia en la misma orientación, que es opuesta a la del ORF L024 intacto del virus de vaccinia.
2. La composición para su uso según la reivindicación 1, en la que el polipéptido heterólogo es una citocina.
- 10 3. La composición para su uso según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que el polipéptido heterólogo se selecciona del grupo que consiste en GM-CSF, IL-7, IL-10, IL-12, IL-15 e IL-21.
4. La composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que la terapia contra el cáncer es quimioterapia, terapia biológica, radioterapia, inmunoterapia, terapia hormonal, terapia antivascolar, crioterapia, terapia con toxinas, terapia molecular contra el cáncer, terapia génica y/o cualquier combinación de las mismas.
- 15 5. La composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la terapia génica es una terapia génica supresora de tumores, una terapia de genes suicidas, estrategias de inmunización con vectores virales, una terapia antiangiogénica, una terapia génica proapoptosis o una terapia de sustitución génica.
6. La composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que el cáncer y/o el tumor es un cáncer y/o un tumor no resecable antes del tratamiento.

AAAAATTGAAAATAAATACAAAGGTTCTTGAGGGTTGTGTTAAATTGAAAGCGAGAAATAATCATAAATA

**Secuencia de mH5**

Fig 1

TTTGGTTACTAGTATAGTCACTATCGGACAAATAAGAAATCAGATGATCGATGAATAATACATTTAAATTCATCATCTGTAAGATTTTGGATGTC  
 TCATTAGAATATTATTAGGGTTAGTACTCATTATCATTCCGGCAGCTATTACTTATTTTATTATTTTACCATATAGATCAATCATTAGATCAAAAATTGAA  
 AATAAATACAAAGGTTCTTGAGGGTTGTGTTAAATTGAAAGCGAGAAATAATCATAAATAGTCGACAATCGAATTCGCCGGCCGGGAATTCCGATTAGA  
 TCTAAAAATTGAAAATAAATACAAAGGTTCTTGAGGGTTGTGTTAAATTGAAAGCGAGAAATAATCATAAATAGTACCGGACTCAGATCCACCGGTCCG  
 CCACCATGGCTCCTCCGAGGACGTCATCAAGGAGTTCATGCGCTTCAAGGTGCGCATGGAGGGCTCCGTGAACGGCCACGAGTTCGAGATCGAG  
 GCGGAGGGCGAGGGCCGCCCTACGAGGGCACCCAGACCGCAAGCTGAAGGTGACCAAGGGCGGCCCTGCCCTTCGCCTGGGACATCCTGT  
 CCCCCAGTTCAGTACGGCTCCAAGGTGTACGTGAAGCACCCCGCCGACATCCCGACTACAAGAAGCTGTCTTCCCGAGGGCTTCAAGTGGG  
 AGCGCGTGATGAACCTCGAGGACGGCGCGTGGTGACCGTGACCCAGACTCCTCCCTGCAGGACGGCTCCTCATCTACAAGGTGAAGTTCATCG  
 GCGTGAACCTCCCTCCGACGGCCCGTAATGCAGAAGAAGACTATGGGCTGGGAGGCTCCACCGAGCGCCTGTACCCCGCGACGGCGTGTG  
 AAGGGCGAGATCCACAAGGCCCTGAAGCTGAAGGACGGCGGCCACTACCTGGTGGAGTTCAGTCCATCTACATGGCCAAGAAGCCCGTGCAGCT  
 GCCCGGCTACTACTACGTGGACTCCAAGCTGGACATCACCTCCACAACGAGGACTACACTATCGTGGAGCAGTACGAGCGCGCCGAGGGCCGCC  
 ACCACCTGTTCTGTAGCGGCCGCGACTTAGATCATAATCAGCCATACCACATTTGTAGAGGTTTACTTGTCTTAAAAACCTCCACACCTCCCC  
 TGAACCTGAAACATAAAATGAATGCAATTGTTGTTGTTAACTTGTATTGTCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAATTTCAAAAT  
 AAAGCATTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTAAAGGGCAAAAATTGAAAATAAATACAAAGGTTCTTGAGGGTT  
 GTGTTAAATTGAAAGCGAGAAATAATCATAAATAAGCTTCGAGGGCTCGCATCTCTCCTTACGCGCCCGCCGCCCTACCTGAGGCCCATCCA  
 CGCCGTTGAGTCGGCTTCTGCCGCTCCGCCCTGTGGTGCCTCCTGAACTGCGTCCGCCGTCTAGGTAAGTTTAAAGCTCAGGTCGAGACCGGGC  
 CTTTGTCCGGCGCTCCCTTGAGCCTACCTAGACTCAGCCGCTCTCCACGCTTTCCTGACCCTGCTTGCTCAACTCTACGCTTTGTTTCGTTTTTC  
 TGTTCTGCCCGTTACAGATCCAAGCTGTGACCGGCCCTACGTAAGTGATATCTACTAGATTTATCAAAAAGAGTGTGACTTGTGAGCGCTCACAA  
 TTGATACTTAGATTCATCGAGAGGGACACGTCGACTACTAACCTTCTTCTTCTTCTACAGCTGAGATCACGGCGAAGGAGGGCCACCATGGGTCA  
 CCAGCAGTTGGTCACTCTTGGTTTTCCCTGGTTTTCTGGCATCTCCCTCGTGGCCATATGGGAAGTGAAGAAAGATGTTTATGTCGTAGAATTGG  
 ATTGGTATCCGGATGCCCTGGAGAAATGGTGGTCTCACCTGTGACACCCCTGAAGAAGATGGTATCACCTGGACCTTGGACCAGAGCAGTGAGG  
 TCTTAGGCTCTGGCAAAACCTGACCATCCAAGTCAAAGATTTGGAGATGCTGGCCAGTACACCTGTCACAAAAGGAGGGCGAGTTCTAAGCCATTC  
 GTCCTGCTGCTTCAAAAAGGAAGATGGAATTTGGTCCACTGATTTTTAAAGGACCAGAAAGAACCCAAAAATAAGACCTTTCTAAGATGCGAGG  
 CCAAGAATATTCTGGACGTTTACCTGCTGGTGGCTGACGACAATCAGTACTGATTTGACATTCAGTGTCAAAAGCAGCAGAGGGCTTCTTGACCCC  
 CAAGGGGTGACGTGCGGAGCTGCTACACTCTGTCAGAGAGAGTCAAGGGGACAACAAGGAGTATGAGTACTCAGTGGAGTGCCAGGAGGACAG  
 TGCTGCCAGCTGCTGAGGAGTCTGCCATTGAGGTCTGGTGGATGCGGTTTCAAAAGCTCAAGTATGAAAATACACCAGCAGCTTCTTTCATC  
 AGGGACATCAAAACCTGACCCACCCAAAGAACTTGACGCTGAAGCCATTAAGAATTCTCGGCAGGTGGAGGTGAGTGGAGTACCCCTGACACCT  
 GGAGTACTCCACATTCTACTTCTCCCTGACATTCTGCGTTTCCAGGTCCAGGCAAGAGCAAGAGAGAAAAGAAAGATAGAGTCTTACGGACAAGAC  
 CTCAGCCACGGTCACTGCGCAAAAATGCCAGCATTAGCGTGGCGGCCAGGACCGCTACTATAGCTCATCTTGGAGCGAATGGGCATCTGTGCC  
 CTGCAGTGTCTGAGTAGGGGTACCTGGGGTGGCGCCAGAAACCTCCCGTGGCCACTCCAGACCCAGGAATGTTCCCATGCCTTACCACCTC  
 CAAAACCTGCTGAGGGCCGTCAGCAACATGCTCCAGAAGGCCAGACAACTCTAGAATTTTACCCTTGCACCTTCTGAAGAGATTGATCATGAAGATA  
 TCACAAAAGATAAAACCAGCACAGTGGAGGCCTGTTTACCATTGGAATTAACCAAGAATGAGAGTTGCCATAAATCCAGAGAGACCTTTTCATAACTA  
 ATGGGAGTTGCCTGGCCTCCAGAAAGACCTCTTTTATGATGGCCCTGTGCCTTAGTAGTATTTATGAAGACTTGAAGATGTACCAGGTGGAGTTCAAG  
 ACCATGAATGCAAAGCTGCTGATGGATCCTAAGAGGCAGATCTTTCTAGATCAAAACATGCTGGCAGTTATTGATGAGCTGATGCAGGCCCTGAATTT  
 CAACAGTGAGACTGTGCCACAAAATCCTCCCTGAAGAACCGGATTTTATAAACTAAAATCAAGCTCTGCATACCTTTCATGCTTTCAGAATTCG  
 GGCAGTGACTATTGATAGAGTATGAGCTATCTGAATGCTTCTAAAAGCGAGGTCCCTCAAACCGTTGTCATTTTATAAACTTTGAAATGAGGA  
 AACTTTGATAGATGTGGATTAAGAAGTGGGAGGGGCTAGCTCGACATGATAAGATACATTTGATGAGTTTGGACAAAACCCACAACCTAGAATGCAGTGA  
 AAAAAATGCTTTATTTGTGAAATTTGTGATGCTATTGCTTTATTTGTGAAATTTGTGATGCTATTGCTTTATTTGTAACCATTATAAGCTGCAATAACAA  
 GTTAAACAACAACAATTGCATTCATTTATGTTTCAGGTTTCAGGGGAGGTGTGGGAGGTTTTTAAAGCAAGTAAAACCTCTACAAATGTGGTAGATCC  
 ATTTGGGACGCGTATCTAATAAGTAGAGTCTCATGCTTAGTTAACAACATTTTTTATGTTAAATCAATTAGTACACCGCTATGTTTAAATCTTATTCAT  
 ATTTTAGTTTTAGGATTGAGAATCAATACAAAATTAATGCATCATTAAATTTAGAAATCACTTAGTTCCACGTAGTCAATGAAACATTTGAACTCATCG  
 TACAGGACGTTCTCGTACAGGACGTAATAAACCGGTTTATTTGTTCAAGATAGATACAAATCCGATAACTTTTTTTACGAATTTCTACG

**Secuencia del casete de expresión**

Fig 2

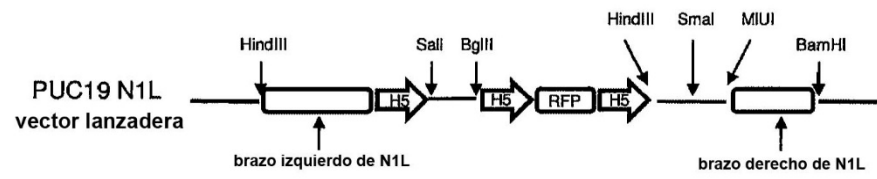


Fig 3

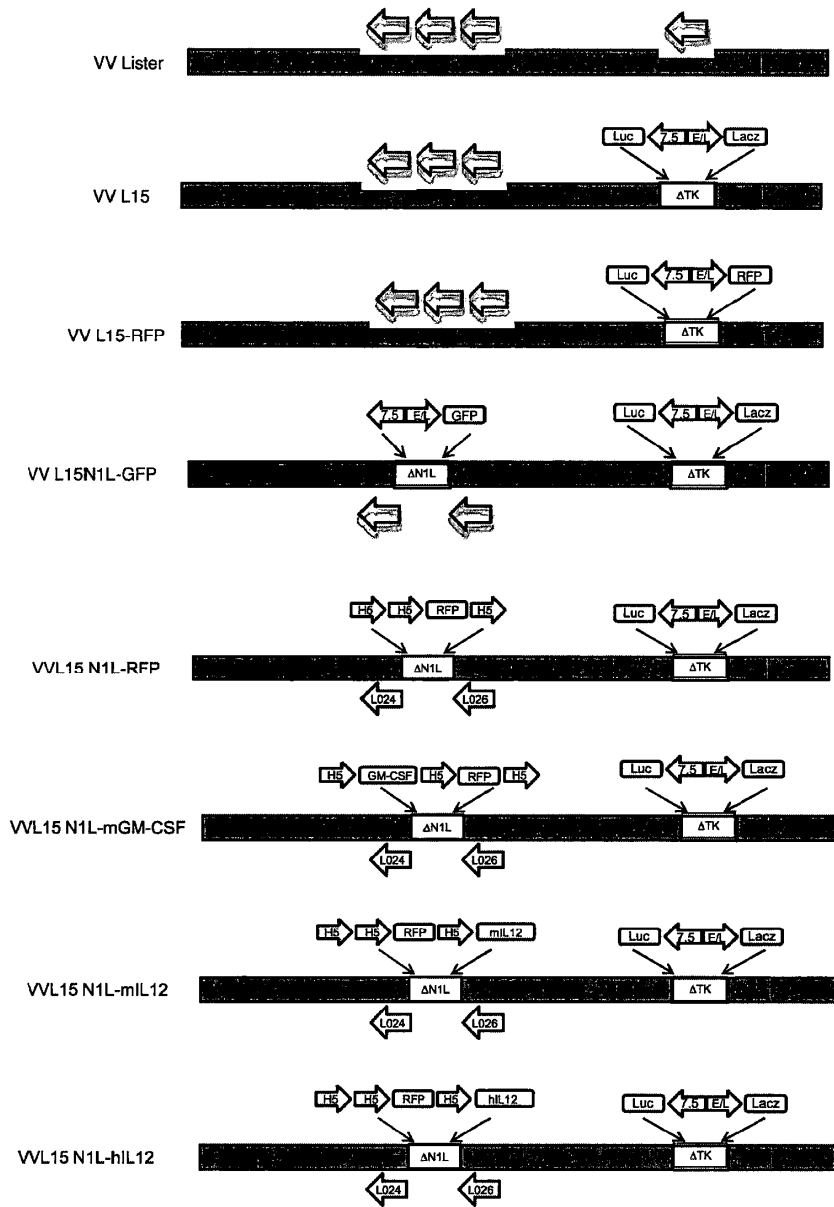
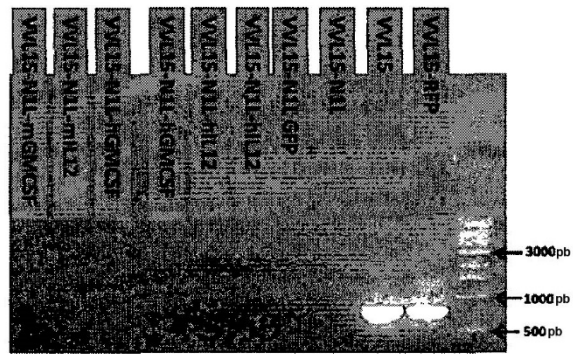


Fig 4

A)



B)

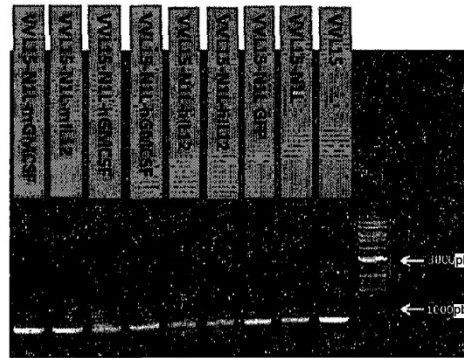


Fig 5

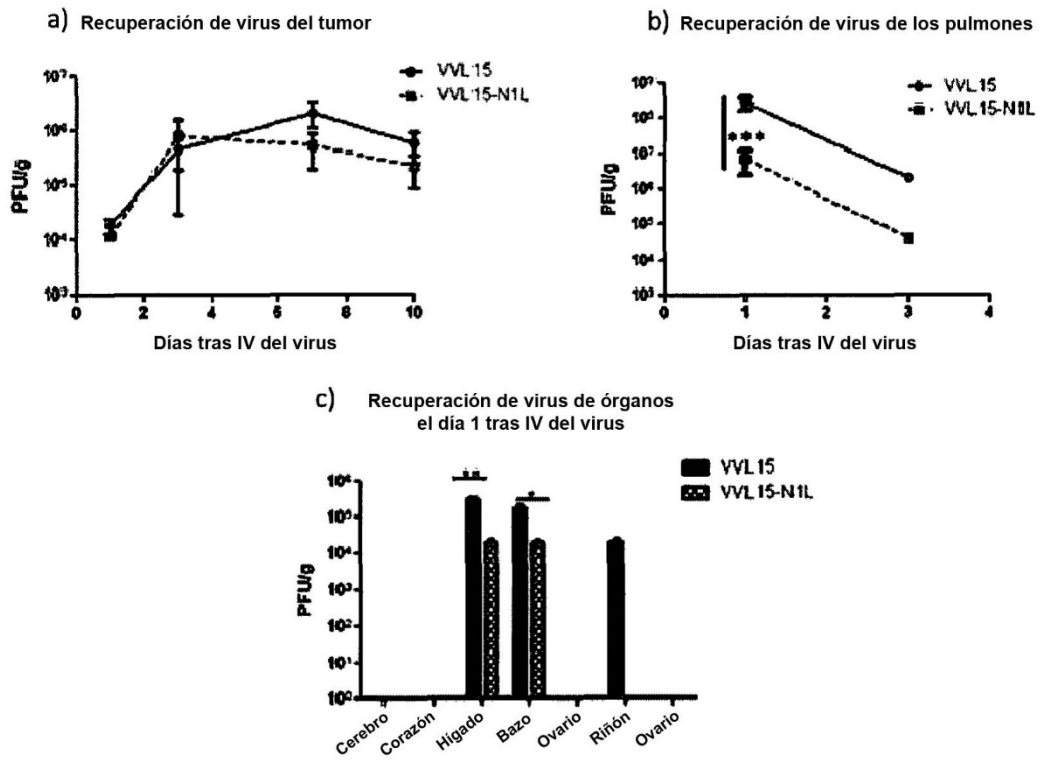


Fig 6

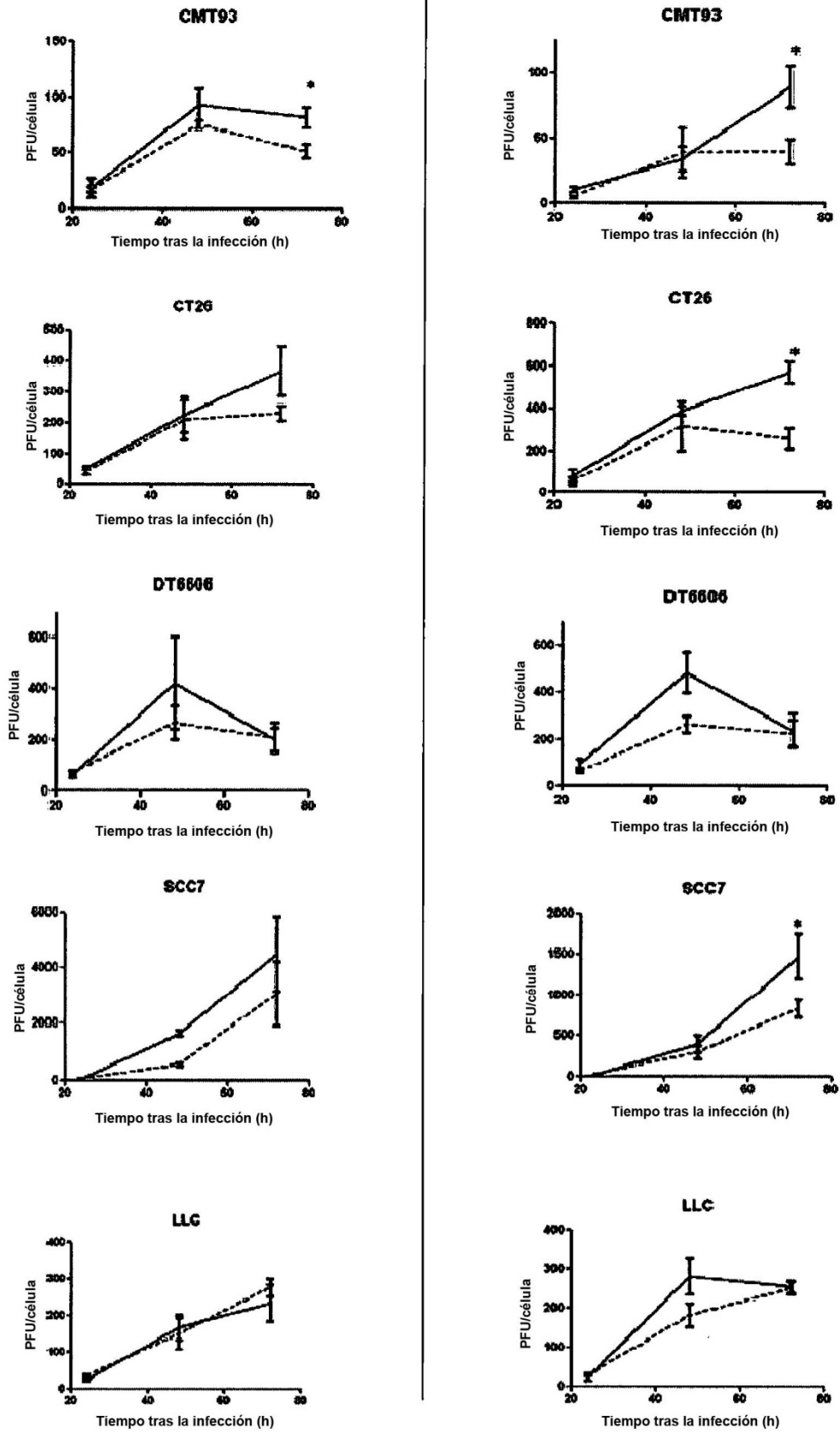


Fig 7

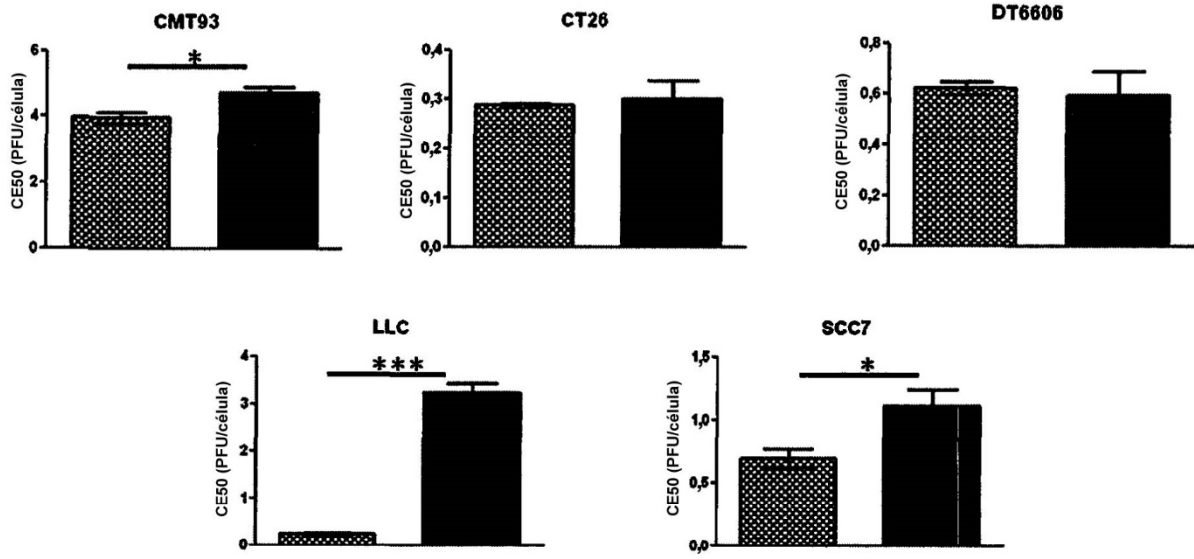


Fig 8

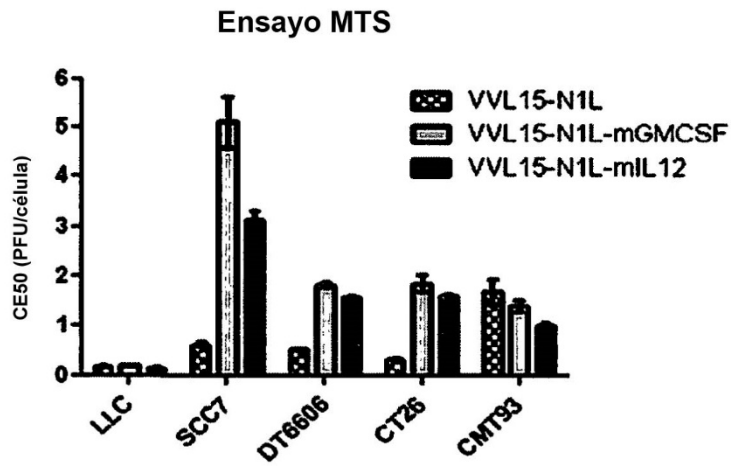


Fig 9

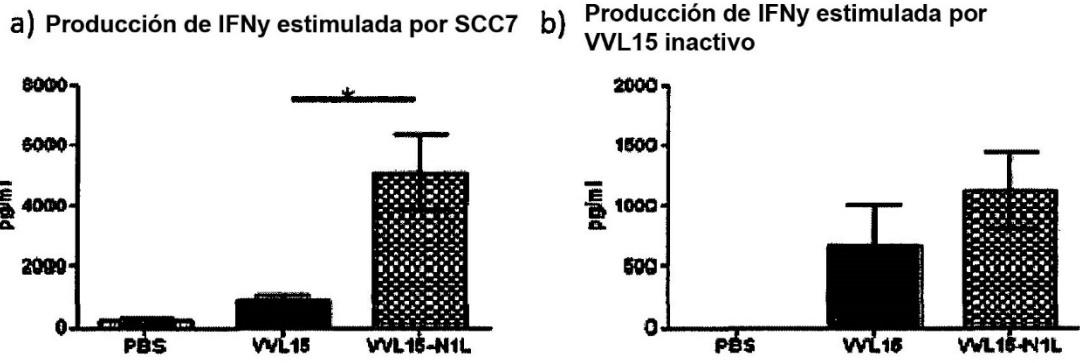


Fig 10

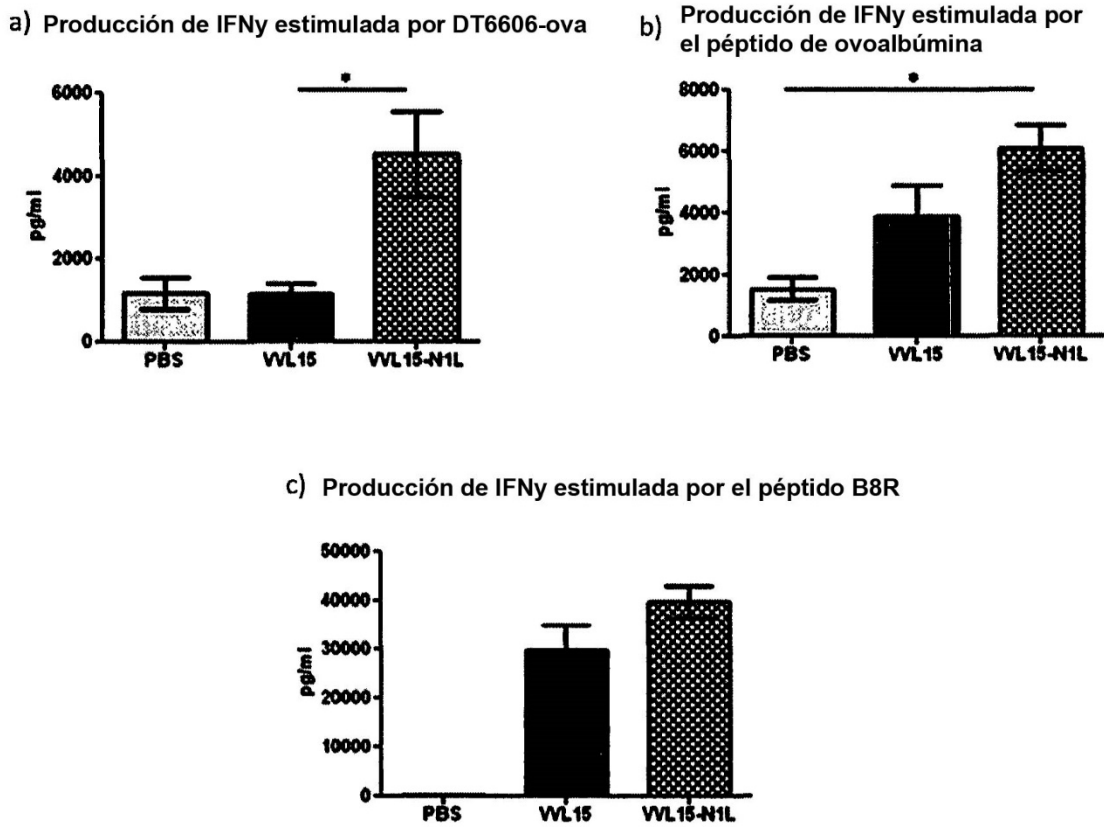
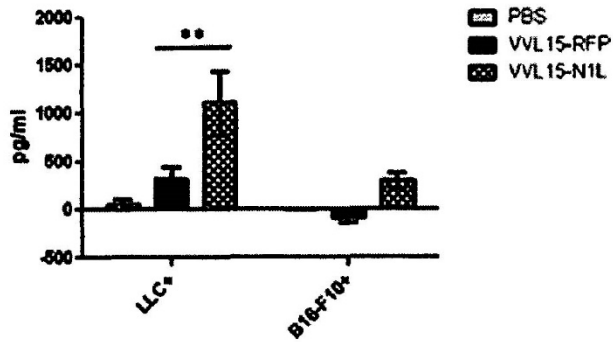


Fig 11

**a** Producción de IFN $\gamma$  estimulada por LLC/B16-F10



**b** Producción de IFN $\gamma$  estimulada por el péptido B8R

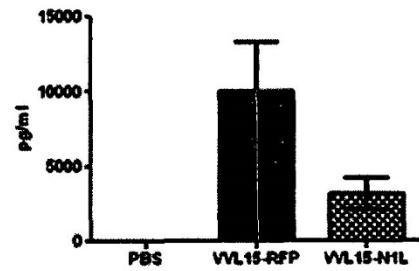


Fig 12

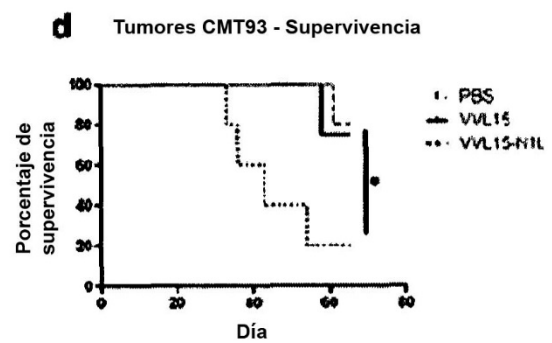
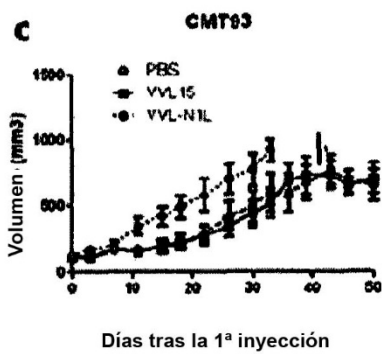
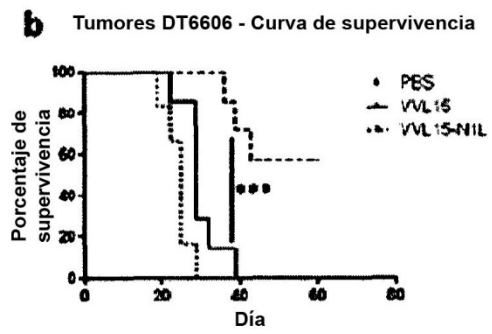
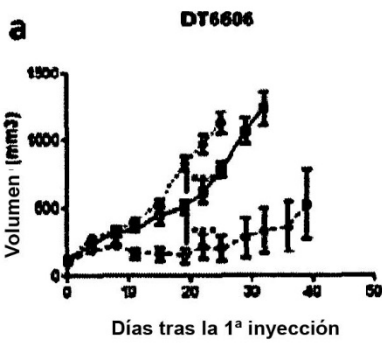


Fig 13

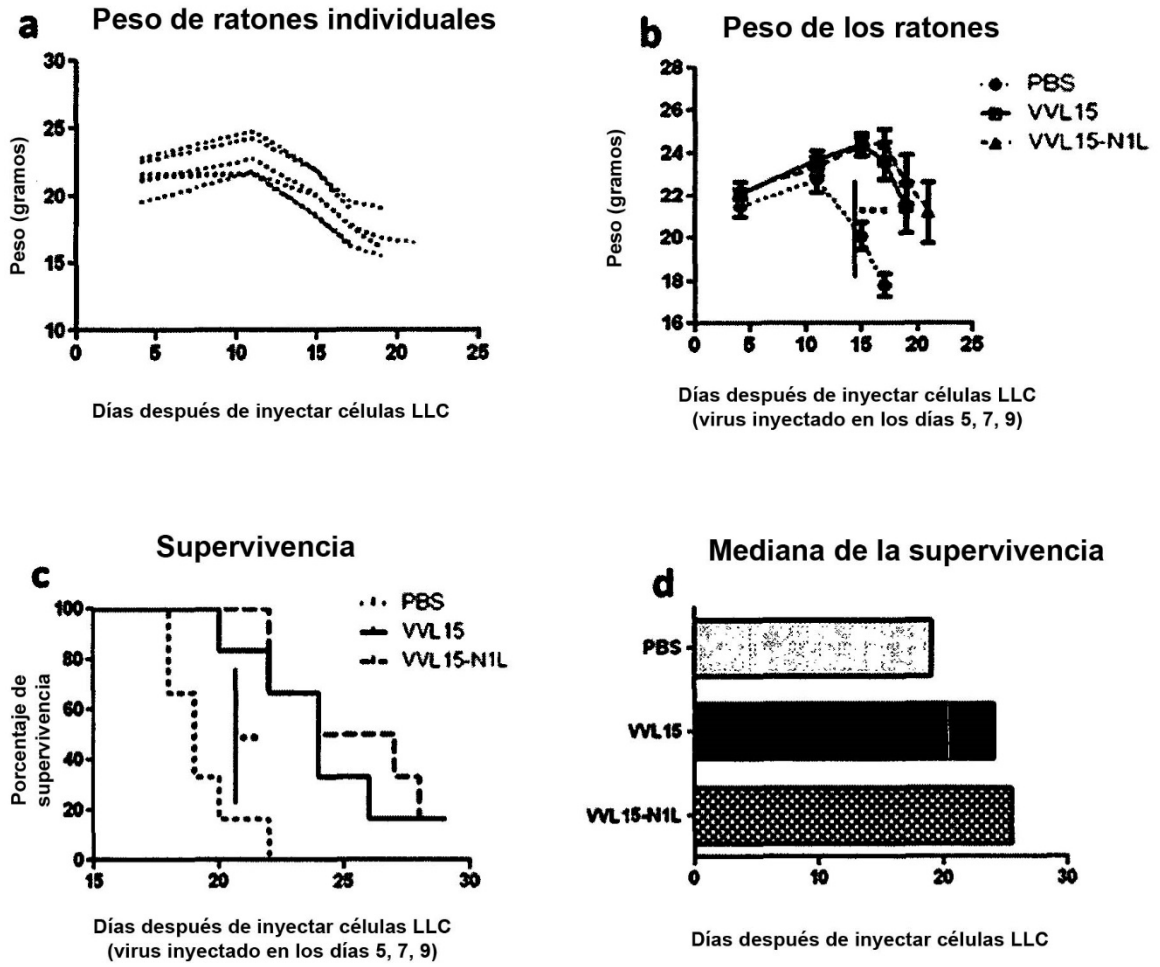


Fig 14

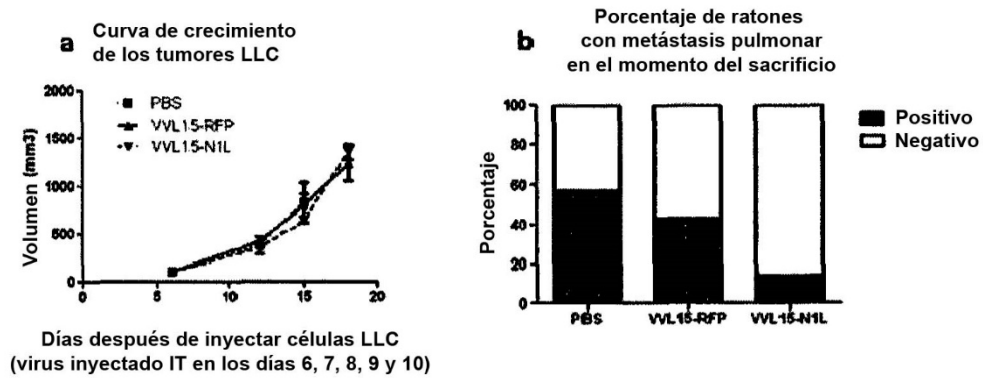


Fig 15

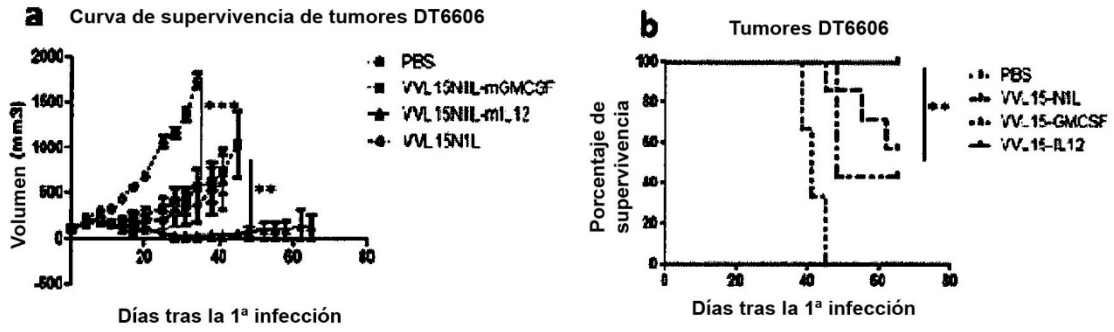


Fig 16

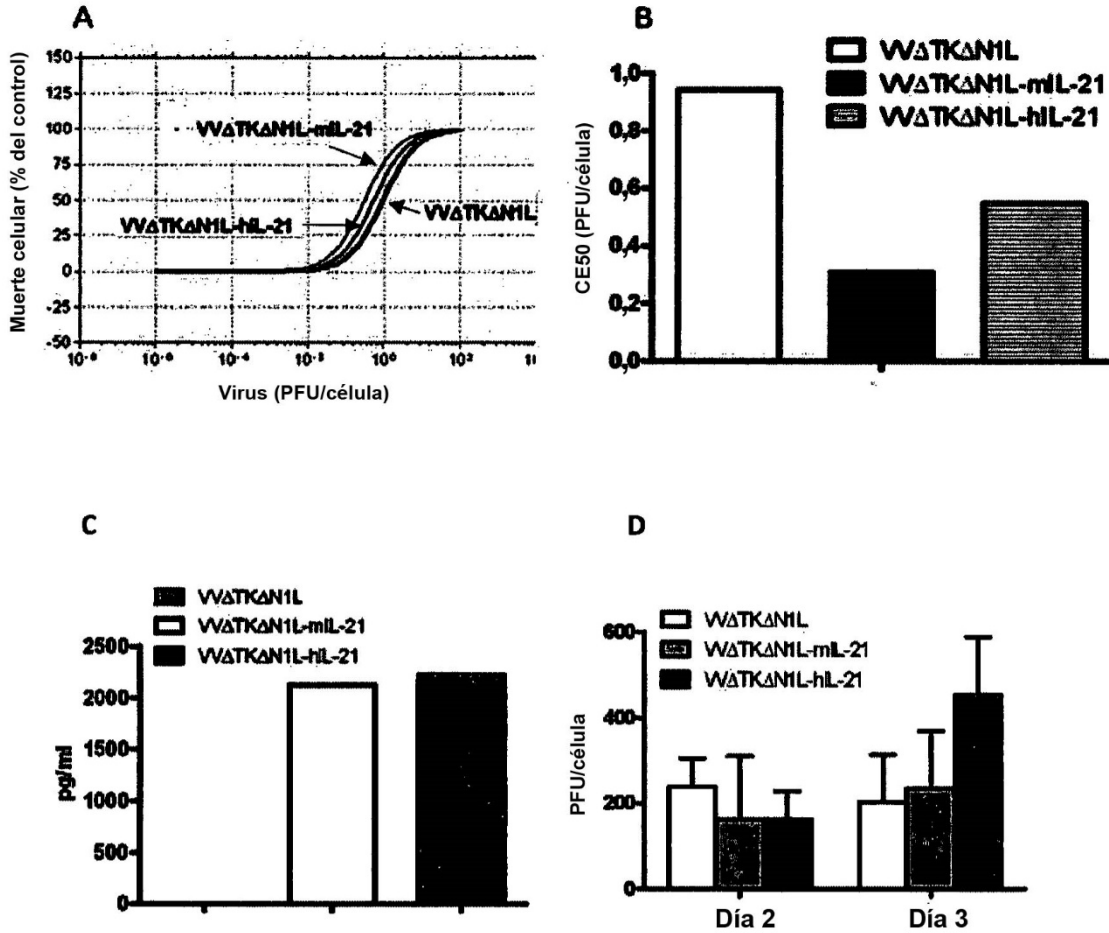


Figura 17

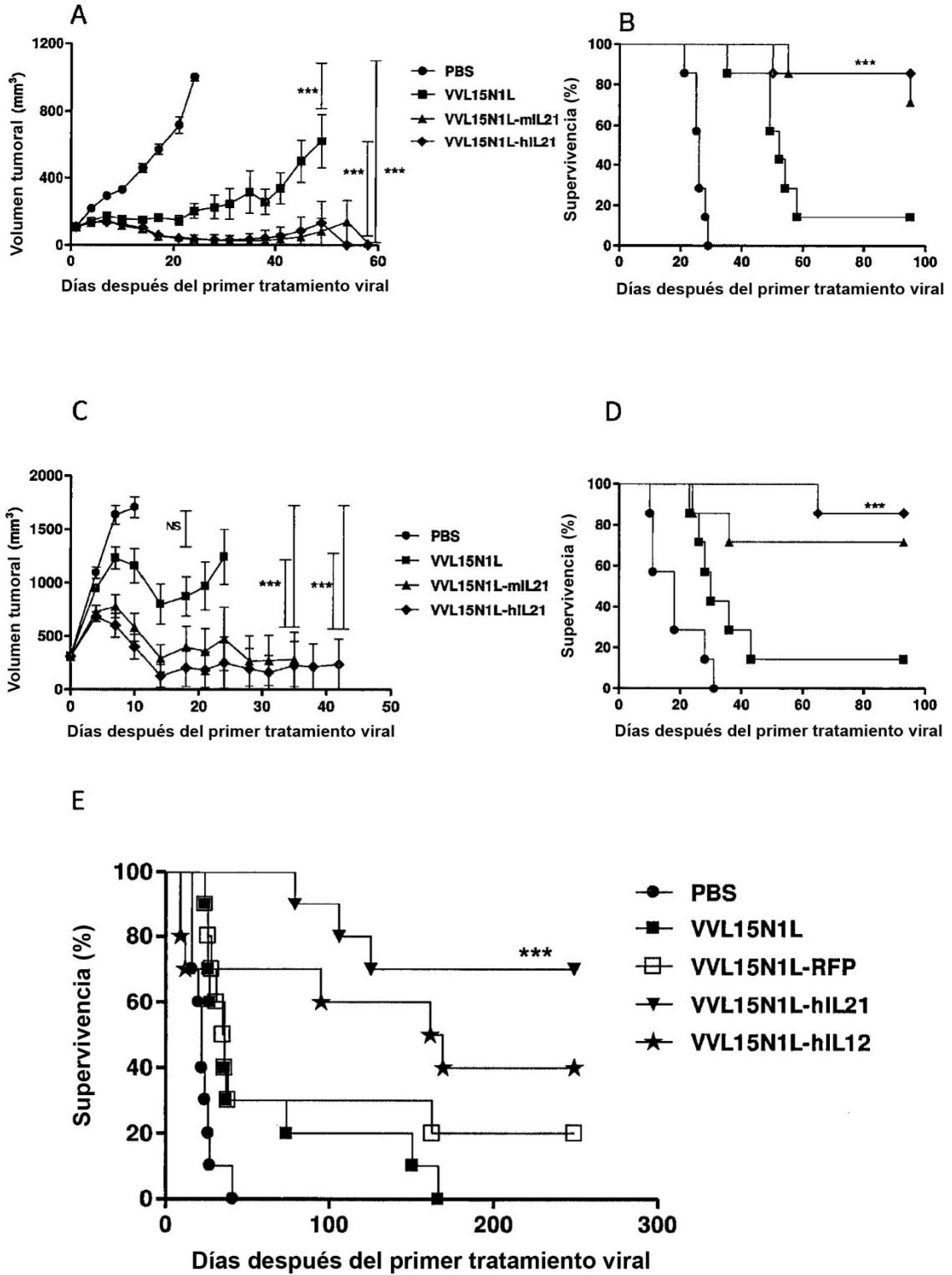


Figura 18

**Interleucina-21 (isoforma 1)**

MERIVICLMVIFLGLTLVHKSSSQGQDRHMIRMRLIDIVDQLKKNYVNDLVPEFLPAPEDVETNCEWSA  
FSCFQKAQLKSANTGNNERIINVS IKKLRKPPSTNAGRQKHRLTCPSCDSYEKKPPKEFLERFKSL  
LQKMIHQHLSRTHGSEDS

**Interleucina-21 (isoforma 2)**

MERIVICLMVIFLGLTLVHKSSSQGQDRHMIRMRLIDIVDQLKKNYVNDLVPEFLPAPEDVETNCEWSA  
FSCFQKAQLKSANTGNNERIINVS IKKLRKPPSTNAGRQKHRLTCPSCDSYEKKPPKEFLERFKSL  
LQKVSTLSFI

**Interleucina-12 (subunidad alfa)**

MCPARSLLLVATLVLLDHLNLPVATPDPMFCLHHSQNLRAVSNMLQKARQTLEFYPTSEE  
IDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSMALCLSS IYEDLKMYQV  
EFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMMLAVIDELMQALNFNSETVVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRI  
RAVTIDRVMSYLNAS

**Interleucina-12 (subunidad beta)**

MCHQQLVISWFLVFLASPLVAIWELKKDVYVVELDWYDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDSSEV  
LGSKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNY  
SGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVGRDNKEYEYSVEEQEDSACPAAEE  
SLPIEVMVDAVHKLKYENYTSFFIRDI IKPDPKLNQLKPLKNSRQVEVSWEYPTWSTPHSYFSLT  
FCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYSSSWSEWASVPCS

**Factor estimulante de colonias de granulocitos macrófagos (GM-CSF)**

MWLQSLLLGLTVACISAPARSPSPSTQPWEHVNAIQEARLLNLSRDAAEMNETVEISEMFDLQEPTCLQTRL  
ELYKQGLRGLTKLKGPLTMMASHYKQHCPTPETSCATQITFESFKENLKDFFLLVIPFDCWEPVQE

**Figura 19**