



(12) **Oversettelse av
europeisk patentskrift**

(11) **NO/EP 2137301 B1**

NORGE

(19) NO
(51) Int Cl.

C12N 7/01 (2006.01)
A61K 35/76 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Oversettelse publisert	2011.10.10
(80)	Dato for Den Europeiske Patentmyndighets publisering av det meddelte patentet:	2011.05.25
(86)	Europeisk søknadsnr:	08735417.1
(86)	Europeisk innleveringsdag	2008.03.12
(87)	Den europeiske søknadens Publiseringsdato	2009.12.30
(30)	Prioritet	2007.03.14 ES 200700665
(84)	Utpekte stater	AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HR HU IE IS IT LI LT LU LV MC MT NL NO PL PT RO SE SI SK TR
(73)	Innehaver	Institut Catala D'Oncologia, Avenida Gran Via S/n Km. 2,708907 L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spania
(72)	Oppfinner	CASCALLO PIQUERAS, Manel Maria, Institut Català d'OncologiaAvda. Gran Via, s/n, Km. 2, 7E-08907 L'hospitalet De Llobregat (Barcelona), Spania GROS, Alena, Institut Català d'OncologiaAvda. Gran Via, s/n, Km. 2, 7E-08907 L'hospitalet De Llobregat (Barcelona), Spania ALEMANY BONASTRE, Ramon, Institut Català d'OncologiaAvda. Gran Via, s/n, Km. 2, 7E-08907 L'hospitalet De Llobregat (Barcelona), Spania
(74)	Fullmektig	Bryn Aarflot AS, Postboks 449 Sentrum, 0104 OSLO, Norge

(54)	Benevnelse	Adenovirus med mutasjoner i det endoplasmatiske retikulum retensjonsdomenet av E3-19K proteinet og deres anvendelse i cancerterapi
(56)	Anførte publikasjoner	GABATHULER R ET AL: "REQUIREMENTS FOR THE ASSOCIATION OF ADENOVIRUS TYPE 2 E3-19K WILD-TYPE AND MUTANT PROTEINS WITH HLA ANTIGENS" JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 64, no. 8, 1990, pages 3679-3685, XP002495148 ISSN: 0022-538X, GABATHULER R ET AL: "The endoplasmic reticulum retention signal of the E3/19K protein of adenovirus type 2 consists of three separate amino acid segments at the carboxy terminus" JOURNAL OF CELL BIOLOGY 1990 US, vol. 111, no. 5 I, 1990, pages 1803-1810, XP002495147 ISSN: 0021-9525, YAN WEN ET AL: "Developing novel oncolytic adenoviruses through bioselection" JOURNAL OF VIROLOGY, THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, US, vol. 77, no. 4, 1 February 2003 (2003-02-01), pages 2640-2650, XP002394479 ISSN: 0022-538X cited in the application, PAHL H L ET AL: "Activation of transcription factor NF-[kappa]B by the adenovirus E3/19K protein requires its ER retention" JOURNAL OF CELL BIOLOGY 199602 US, vol. 132, no. 4, February 1996 (1996-02), pages 511-522, XP002495146 ISSN: 0021-9525 cited in the application, PÅÄBO S ET AL: "A short sequence in the COOH-terminus makes an adenovirus membrane glycoprotein a resident of the endoplasmic reticulum." CELL 17 JUL 1987, vol. 50, no. 2, 17 July 1987 (1987-07-17), pages 311-317, XP002495145 ISSN: 0092-8674, HERMISTON T ET AL: "THE DISCOVERY AND DEVELOPMENT OF SELECTIVITY REPLICATING ADENOVIRUSES AS ANTICANCER AGENTS" TUMOR TARGETING, CHAPMAN & HALL, GB, vol. 4, no. 4, 1 January 1999 (1999-01-01), pages 218-224, XP009070596 ISSN: 1351-8488

Beskrivelse

OPPFINNELSESOMRÅDE

- 5 Den foreliggende oppfinnelse vedrører generelt behandlingen av cancer og mere spesielt adenoviruser som inneholder E3-19K genet mutert i dets endoplasmatiske retikulum rentensjonsdomenet og anvendelsen av disse adenoviruser for å behandle cancer.

10 BAKGRUNN FOR OPPFINNELSEN

[0001] Nåværende cancerbehandling er hovedsakelig basert på kjemoterapi, radio-terapi og kirurgi. Til tross for en høy grad av suksess når behandlingen gjennomføres på tidlige stadier, er de fleste tilfeller av fremskreden sykdom ikke helbredelige fordi
 15 tumorer ikke kan fjernes ved kirurgi eller stråling og kjemoterapidoser som kan administreres er begrenset ved toksisitet overfor normale celler. For å avhjelpe dette problemet er bioteknologistrategier som søker høy selektivitet og potens blitt utviklet. Blant dem er genterapiviruser og virus for viroterapianvendelse med et terapeutisk formål mot cancer. I genterapi modifiseres viruset for å unngå dets replikasjon og for
 20 å funksjonere som en vehikkel eller vektor av terapeutisk genetisk material. Motsatt anvender viroterapi virus som replikerer og propagerer selektivt i tumorceller. I viroterapi dør tumorcellen ved den cytopatiske effekten bevirket ved replikasjonen av viruset inne i celler heller enn ved effekten av et terapeutisk gen. Den foretrukne replikasjon i en tumorcelle er kjent som onkolyse. Viruser som replikerer selektivt i
 25 tumorer er kjent som onkolytiske virus.

[0002] Cancer viroterapi er eldre enn genterapi. De første rapporter om cancerkurer med virus går tilbake til begynnelsen av det forrige århundre. I 1912 oppnådde De Pace tumorregresjoner etter inokuleringen av rabiesvirus i servikale karcinomer (De Pace N. Sulla scomparsa di un enorme cranco vegetante del collo dell'utero senza cura
 30 chirurgica. Ginecologia 1912;9:82-89). Siden da er mange typer av virus blitt injisert i tumorer for å behandle dem. Der er virus som har en naturlig onkotropisme slik som autonom parvovirus, vesikulær stomatittvirus og reovirus. Andre virus kan manipuleres genetisk for å oppnå selektiv replikasjon i tumorer. Herpes Simplex virus (HSV) har f.eks. blitt endret onkotropisk ved å deletere ribonukleotid reduktasegenet,
 35 en enzymatisk aktivitet som ikke er nødvendig i celler med kontinuerlig aktiv proliferasjon slik som tumorceller. På grunn av lav patogenitet og høy effektivitet for infisering

av tumorceller har imidlertid adenovirus vært det mest vanlige anvendte virus i viroterapi og genterapi av cancer.

[0003] Femtien serotyper av adenovirus er blitt identifisert og gruppert i seks differensierte grupper, A til F.

- 5 **[0004]** Det humane adenovirus type 5 (Ad5), som tilhører gruppe C, består av et ikosahedralt proteinkapsid som inneholder en lineær DNA med 36 kilobaser. I voksne individer er Ad5 infeksjon ofte asymptomatisk og fører til forkjølelser og konjunktivitt hos barn. Generelt infiserer Ad5 epitelceller, som i en naturlig infeksjon er de bronkiale epitelcellene. Det går inn i cellen ved hjelp av interaksjonen av fiberen, et
- 10 virusprotein som strekker seg som en antenne fra de tolv verteksene av kapsidet, med et cellulært protein involvert i intercellulær adhesjon kjent som Coxsackie-Adenovirus Receptor (CAR). Når virus DNA når kjernen, begynner transkripsjonen av tidlige gener (E1 til E4). De første gener som uttrykkes er dem av den tidlige 1A regionen (E1A). E1A binder til cellulært protein pRb (retinoblastomprotein) for å frigi
- 15 transkripsjonsfaktoren E2F for å aktivere transkripsjon av andre virusgener slik som E2, E3 og E4, og av cellulære gener som aktiverer cellyklusen. På den annen side binder E1 B til transkripsjonsfaktoren p53 for å aktivere cellyklusen og for å inhibere apoptosen av den infiserte cellen. E2 koder for proteiner for replikasjon av viruset. E3 koder for proteiner som inhiberer den antivirale immunresponsen. E4 koder for
- 20 proteiner for å transportere virus ARN. Ekspresjonen av tidlige gener fører til replikasjonen av genomet og, når replikert, til aktiveringen av den major sene promoter. Denne promoter driver ekspresjonen av et mRNA som prosesseres ved differensial spleising til å gi alle RNA'ene som koder for de strukturelle proteinene som danner kapsidet.
- 25 **[0005]** Som særlig relevant for den foreliggende oppfinnelse er E3 proteiner beskrevet mere detaljert. I den tidlige fasen til virus livssyklusen, før replikasjon av genomet, uttrykkes E3 gener fra E3 promoteren. Denne promoter driver ekspresjonen av et pre-mRNA som genererer ni ulike mRNA'er ved spleising. I de fleste serotypene av adenoviruset, nemlig dem i gruppene B, C, D og E, er syv proteiner (polypeptider) syntetisert fra disse mRNA'er: E3-12.5K, E3-6.7K, E3-19K, E3-11.6K (også kjent som
- 30 adenovirus dødsprotein eller ADP), E3-10,4K (RIDalpha), E3-14.5K (RIDbeta), og E3-14.7K (fra venstre til høyre posisjon i genomet). I den sene fasen er E3 promoteren undertrykket og den major sene promoter er aktivert. Fra denne promoter syntetiseres et pre-mRNA som gir forskjellige mRNA'er ved spleising. Det eneste E3 proteinet syntetisert fra disse sene mRNA'er er E3-11.6K (ADP). ADP eller E3-11.6K er et
- 35 integralt membranprotein lokalisert i kjerne-, golgi- og endoplasmatisk retikulum-membranene. Det spiller en rolle ved lysis av den infiserte cellen. De resterende E3

proteiner har funksjoner relatert til inhiberingen av immunresponsen mot den infiserte cellen. E3-6.7K, RIDalpha, RIDbeta og E3-14.7K beskytter f.eks. cellen fra TNF-mediert apoptose. E3-19K er et membranprotein som bibeholder "major histocompatibility class" 1 proteinene (MHC-I) i det endoplasmatiske retikulum. Følgelig unngår

5 E3-19K antigenpresentasjonen i membranen til de infiserte cellene. Der er to nøkkel-peptidregioner eller domener for å mediere denne E3-19K funksjonen. En er E3-19K MHC-I bindingsdomenet. Den andre er en peptidsekvens i karboksy-terminusenden til E3-19K som bibeholder proteinet i det endoplasmatiske retikulum og unngår dets

10 transport til den cellulære membranen. Beskrivelsen av disse funksjonelle domener av E3-19K med mutasjoner som er spesifikke for disse domener har blitt gjennomført ved å anvende E3-19K isolert i ekspresjonsplasmider (Gabathuler R, Kvist S. The endoplasmic reticulum retention signal of the E3/19K protein of adenovirus type 2 consists of three separate amino acid segments at the carboxy terminus. J Cell Biol 1990; 111 (5 Pt 1):1803-10).

15 **[0006]** Der er to viktige punkter å vurdere med hensyn til design av onkolytiske adenoviruser: selektivitet og potens. For å oppnå selektivitet overfor en tumorcelle er to strategier blitt anvendt: delesjon av virusfunksjoner som ikke er nødvendig i tumorceller og substitusjonen av virale promotere med tumorselektive promotere. Med slike genetiske modifikasjoner, er et betydelig nivå av selektivitet blitt oppnådd med en

20 replikasjonseffektivitet i tumorcelle som er 10000 ganger høyere enn i en normal celle. Med hensyn til onkolytisk potens er en rekke genetiske modifikasjoner for å øke den likeledes blitt beskrevet. Disse modifikasjoner påvirker enten virusets inntreden i cellen eller frigivelsen av viruset fra cellen. For å øke trinnet i forbindelse med inntreden, er kapsidproteinene som viruset anvender for å infisere cellen blitt modifisert.

25 Innersjon av RGD peptidet (arginin-glycin-asparaginmotiv) i fiberen lar adenovirus anvende integriner for å dokke i cellen og ikke bare internalisere som er tilfellet med villtype adenovirus. Anvendelsen av integriner som cellulære reseptorer av viruset øker infektiviteten og den onkolytiske potens. Når det gjelder modifikasjonene som øker frigivelsen av virus fra den infiserte celle, er to blitt beskrevet: delesjonen av

30 E1B-19K og overekspressjonen av E3-11.6K (ADP). E1B-19K er en apoptose inhibitor homolog til Bcl-2. E1B-19K delesjon øker celledød ved prematur apoptose av den infiserte cellen. Denne premature apoptosen resulterer ofte i en lavere total virusproduksjon i mange infiserte cellelinjer, men den akselererer imidlertid den hurtige frigivelsen av virus og vil i sin tur spre virus i en cellekultur. Følgelig presenterer

35 mutantene som ikke uttrykker E1B-19K en stor-plakk fenotype sammenlignet med villtype adenoviruset i en plakkanalyse. En annen strategi som er anvendt for å øke den onkolytiske potensen til adenoviruset er overekspressjonen av E3-11.6K (ADP)

protein. Dette protein spiller en rolle i lysis av den infiserte cellen og ADP overekspresjon øker frigivelsen av viruset akkumulert inne i kjernen. Fenotypen av ADP-overuttrykkende virus er også kjennetegnet ved store plakker og tilstedeværelsen av mere virus i supernatanten til de infiserte celler. ADP

5 overekspresjon har blitt oppnådd ved hjelp av to mekanismer: 1) eliminering av de andre E3 gener unntatt ADP, eller unntatt ADP og E3-12.5K. Denne delesjon fjerner andre spleiseseter i pre-mRNA drevet ved E3 promoteren. Uten konkurranse for disse spleiseseter, er prosessering av mRNA som koder for ADP favorisert. 2) Inersjon av ADP genet etter en sterk promoter.

10 **[0007]** Den foreliggende oppfinnelse omhandler en ny og forbedret mekanisme for å øke frigivelsen av adenovirus fra den infiserte cellen basert på en mutasjon av E3-19K proteinet.

OPPSUMMERING AV OPPFINNELSEN

15

[0008] Spesifikt beskriver oppfinnelsen en forøkelse av adenovirus frigivelse basert på mutasjonen av det endoplasmatiske retikulum retensjonsdomenet av E3-19K proteinet. Oppfinnelsen viser at fenotypen assosiert med mutasjonen som påvirker den cellulære lokaliseringen av E3-19K ikke er assosiert med overekspresjonen av ADP, og

20 den er derfor en annen mekanisme som tidligere hverken er beskrevet eller foreslått for å øke frigivelsen av adenovirus ut av den infiserte cellen.

[0009] En radom mutagenese av adenovirus 5 genomet etterfulgt av en seleksjon av mutanter som har oppnådd høyere onkolytisk potens ble gjort. Mutagenesen med natriumnitritt generer overgangsmutasjoner hvor en nukleotid base deaminering

25 produseres. Etter replikasjonen av DNA, genererer disse deaminerte baser nye paringer og mutasjonene fikseres. Etter mutagenesen av en adenovirus 5 basis ble den oppnådde samling amplifisert i en cancer cellelinje og renses med standard-prosedyrer. Virusbasen svarer til adenovirus referansematerialet (ARM) (GenBank sekvens nr AY339568). Bioseleksjonsprosessen av onkolytiske mutanter ble gjennom-

30 ført *in vivo* i immunodefisiente mus (nakne mus) med tidligere inokulerte humane tumorer. Viruser som vedvarte lenger i blod og som replikerte mere effektivt i tumorer ble isolert, amplifisert og injisert igjen i tumorbærende mus i påfølgende runder av bioseleksjon. Der er et eksisterende eksempel på anvendelsen av denne random-metoden for å oppdage mutanter som har en høyere onkolytisk potens skjønt bio-

35 seleksjonsprosessen som anvendes i dette forutgående eksempel er forskjellig (Yan W, Kitzes G, Dormishian F, Hawkins L, Sampson-Johannes A, Watanabe J, et al. Developing novel oncolytic adenoviruses through bioselection. J Virol 2003;77

(4):2640-50). Dette forutgående eksempel oppdager andre mutasjoner som er forskjellige fra den som er formålet for den foreliggende oppfinnelse.

[0010] Den foreliggende oppfinnelse vedrører et adenovirus som kjennetegnet ved at det inneholder mutasjon i det endoplasmatiske retikulum retensjonsdomenet av E3-19K. Spesielt er det karboksy-terminale domenet av E3-19K eliminert eller modifisert for å forhindre retensjonen av E3-19K i det endoplasmatiske retikulum og for å bevirke dets transport til plasmamembranen. Et adenovirus som replikerer og som inneholder denne spesielle mutasjon av E3-19K frigis mere effektivt fra den infiserte cellen. Denne høyere frigivelse fører til en høyere onkolytisk effekt. Denne økte onkolytiske effekten er anvendbar for å behandle cancer.

[0011] Identifikasjonen om at mutasjonen av den karboksy-terminale enden av E3-19K øker frigivelsen av adenovirus fra den infiserte cellen er overraskende fordi den beskrevne funksjonen til E3-19K er en immunmodulerende funksjon. Spesielt relaterer en funksjon beskrevet for E3-19K til bindingen til MHC-I og til retensjonstiden av MHC-I i det endoplasmatiske retikulum for å unngå transporten av MHC-I til plasmamembranen og presentasjonen av antigener assosiert til MHC-I. Følgelig er fenotypen av adenovirus mutanter som ikke uttrykker E3-19K kjennetegnet ved tilstedeværelsen av MHC-I i plasmamembranen og ved en høyere immunrespons overfor viruset. Denne fenotype påvirker ikke propageringen av adenovirus i cellekulturer *in vitro* og eksperter innenfor området av adenovirusene som genterapivektorer har vanligvis deletert hele E3 regionen uten noen bivirkninger på virusproduksjonen. For uten denne kunnskap om fenotypen av adenovirus som ikke uttrykker E3-19K, er fenotypen som kjennetegner adenoviruser med partielle delesjoner av E3-19K ikke kjent fordi funksjonelt studium av E3-19K domener har blitt gjennomført med E3-19K proteinet isolert, ut av sammenheng med adenoviruset (Gabathuler R, Kvist S. The endoplasmic reticulum retention signal of the E3/19K protein of adenovirus type 2 consists of three separate amino acid segments at the carboxy terminus. J Cell Biol 1990;111 (5 Pt 1):1803-10). Disse studier har aldri foreslått at delesjonen av karboksy-terminushalen eller det endoplasmatiske retikulum retensjonsdomenet av E3-19K vil kunne øke virus frigivelse. Således er der ingen rasjonell tidligere kunnskap som foreslår at modifikasjonen i det endoplasmatiske retikulum retensjonsdomenet av E3-19K kan resultere i en høyere frigivelse av adenovirus fra den infiserte cellen. Dette resultat stammer fra screeningen av et bibliotek av random mutanter av adenovirus, gjennomført i den foreliggende oppfinnelse, ved å anvende prosedyrer som favoriserer seleksjonen av adenoviruser som frigis mere effektivt fra infiserte celler.

[0012] Den foreliggende oppfinnelse vedrører således et replikativt adenovirus som omfatter en mutasjon i det endoplasmatiske retikulum retensjonsdomenet av E3-19K som forhindrer retensjonen av E3-19K i det endoplasmatiske retikulum, og omfatter videre en genetisk modifikasjon for å oppnå selektiv replikasjon i tumorer.

5 **[0013]** E3-19K mutasjonen i forbindelse med denne oppfinnelse kan være en inserasjon, forandring eller delesjon av ett eller flere basepar av gensekvensen som koder for E3-19K. I alle tilfeller er effekten den samme: den produserer en forandring i det endoplasmatiske retikulum retensjonsdomenet av E3-19K som resulterer i E3-19K relokasjon fra den endoplasmatiske membran til plasmamembranen.

10 **[0014]** I en utførelsesform av oppfinnelsen er det replikative adenovirus mutert i ett eller flere gener av gruppen E1a, E1b, E4 og VA-RNA'er for å oppnå selektiv replikasjon i tumorer.

[0015] I en annen utførelsesform av den foreliggende oppfinnelse, omfatter det replikative adenovirus en vevspesifikk promoter eller en tumorspesifikk promoter for å
15 oppnå selektiv replikasjon i tumorer.

[0016] I en annen utførelsesform av den foreliggende oppfinnelse, omfatter det replikative adenovirus promotersekvenser for å kontrollere ekspresjonen av ett eller flere gener fra gruppen som består av E1a, E1b, E2 og E4, for å oppnå selektiv replikasjon i tumorer.

20 **[0017]** I en annen utførelsesform av den foreliggende oppfinnelse omfatter det replikative adenovirus kapsidmodifikasjoner for å øke dets infektivitet eller målsøking mot en reseptor til stede i en tumorcelle.

[0018] I en annen utførelsesform av oppfinnelsen, omfatter det replikative adenovirus ytterligere gener som er vanlig anvendt innen området av cancer genterapi. Genene
25 som vanligvis anvendes innen området av cancer genterapi er foretrukket valgt fra gruppen som består av prodrug-aktiverende gener, tumor-supressor gener og immunstimulerende gener.

[0019] I en annen utførelsesform av den foreliggende oppfinnelse omfatter det replikative adenovirus genommodifikasjoner som reflekterer i en økning av ekspresjon
30 av nevnte E3-19K protein.

[0020] I en annen utførelsesform av den foreliggende oppfinnelse, omfatter det replikative adenovirus nukleotidsekvensen SEK ID NR: 4.

[0021] Det replikative adenoviruset ifølge oppfinnelsen uttrykker et endoplasmatisk retikulum retensjonsdomene av E3-19K med en karboksy-terminal hale med en SEK
35 ID NR: 5.

[0022] I en annen utførelsesform av oppfinnelsen, omfatter det replikative adenovirus i det minste nukleotidsekvensen SEK ID NR: 1, SEK ID NR: 7 og SEK ID NR: 8.

[0023] Det replikative adenoviruset ifølge oppfinnelsen uttrykker et endoplasmatisk retikulum retensjonsdomene av E3-19K med en karboksy-terminal hale med en SEK ID NR: 2, og inneholdende insersjonen av RGD motivet (definert fra posisjon 1648 til 1656 i SEK ID NR: 8), og regulerende regioner som gir selektiv replikasjon av den nevnte adenovirus i tumorceller, hvor nevnte regulerende regioner består i DM1 insulator (definert fra posisjon 367 til 1095 i SEK ID NR: 7), et fragment av E2F1 promoteren (definert fra posisjon 1282 til 1546 av SEK ID NR: 7), ccacc kozak sekvensen (definert fra posisjon 1546 til 1550 i SEK ID NR: 7) og E1a-Δ24 mutert adenovirusgen (definert fra posisjon 1551 til 2512 i SEK ID NR: 7).

[0024] Et annet formål med oppfinnelsen er et replikativt adenovirus som omfatter en mutasjon i det endoplasmatiske retikulum retensjonsdomenet av E3-19K som forhindrer retensjonen av E3-19K i det endoplasmatiske retikulum, hvor nevnte adenovirus omfatter nukleotidsekvensen SEK ID NR: 1.

[0025] I et annet aspekt av oppfinnelsen uttrykker det replikative adenoviruset et endoplasmatisk retikulum retensjonsdomene av E3-19K med en karboksy-terminal hale med en SEK ID NR: 2.

[0026] Et annet formål med den foreliggende oppfinnelse er et farmasøytisk preparat som omfatter en farmakologisk effektiv dose av det replikative adenovirus og en eller flere farmasøytisk aksepterbare bærere eller eksipienser.

[0027] Et annet formål med oppfinnelsen er et replikativt adenovirus som definert ovenfor for anvendelse som et medikament.

[0028] Det replikative adenoviruset ifølge oppfinnelsen er et profylaktisk og/eller terapeutisk middel ved cancer.

[0029] Den foreliggende beskrivelse tilveiebringer også en ny fremgangsmåte for å behandle cancer som omfatter administreringen av et replikativt adenovirus som inneholder en mutasjon i det endoplasmatiske retikulum retensjonsdomenet av E3-19K.

[0030] Et annet formål med den foreliggende oppfinnelse er anvendelsen av det replikative adenoviruset som definert ovenfor i fremstillingen av en farmasøytisk formulering for behandling eller forebygging av cancer eller den pre-maligne sykdom som fører til cancer.

[0031] I en annen utførelsesform kan E3-19K mutant adenoviruset ifølge oppfinnelsen anvendes i kombinasjon med andre cancerterapier slik som kjemoterapi eller stråleterapi.

[0032] Den foreliggende oppfinnelse beskriver et replikativt adenovirus som inneholder en mutasjon i det endoplasmatiske retikulum retensjonsdomenet av E3-19K og anvendelsen av nevnte adenovirus for behandlingen eller forebyggingen av cancer

eller en pre-malign sykdom som fører til cancer. Der er tidligere rapporter om over-
 ekspresjonen av E3-11.6K (ADP) eller delesjonen av E1-B-19K i onkolytisk adeno-
 viruser. I motsetning til den foreliggende oppfinnelse vil disse tidligere beskrevne
 modifikasjoner hverken innebære eller kreve lokaliseringen av E3-19K i plasma-
 5 membranen, og deres virkningsmekanisme er forskjellig. Før den foreliggende
 oppfinnelse er aktiviteten av et E3-19K protein som ikke er i stand til å forbli dokket i
 den plasmatiske retikulum aldri blitt analysert i et virusgenom. Aktiviteten av nevnte
 protein i forhold til økningen av onkolytisk potens assosiert med frigivelsen av virus er
 overraskende fordi den eneste funksjonen som er beskrevet for E3-19K er den av
 10 MHC-I binding og gjennom denne binding nedsetter E3-19K presentasjonen av
 antigener og immunresponsen.

[0033] Adenovirusene som inneholder mutasjon i det endoplasmatiske retikulum
 retensjonsdomenet av E3-19K som formålet for den foreliggende oppfinnelse er
 propagert og amplifisert i cellelinjer som er vanlig anvendt innen området av genterapi
 15 og viroterapi, slik som HEK-293 og A549. Prosedyrene for å rense et adenovirus som
 inneholder en mutasjon i det endoplasmatiske retikulum retensjonsdomenet av E3-
 19K for dets anvendelse i behandling av cancer er de samme prosedyrene som dem
 beskrevet for andre adenoviruser og adenovirus vektorer som anvendes i viroterapi og
 genterapi av cancer.

20 **[0034]** Oppfinnelsen retter seg mot behovet for forbedrede terapier for cancer som
 inkluderer, men som ikke er begrenset til, pankreascancer, koloncancer og lunge-
 cancer. Behandling av cancer med et onkolytisk adenovirus som inneholder en
 mutasjon i det endoplasmatiske retikulum retensjonsdomenet av E3-19K kan
 gjennomføres ved direkte injeksjon av dette virus inn i tumoren eller ved systemisk
 25 administrering til cancerpasienter ved å anvende standardmetoder innen området av
 genterapi og viroterapi med adenoviruser.

KORT BESKRIVELSE AV TEGNINGENE

30 **[0035]** De vedlagte tegninger er blitt inkludert heri slik at de ovennevnte trekk,
 fordeler og konstrukter vil fremkomme klart og kan forstås mere detaljert. Disse
 tegninger utgjør en del av beskrivelsen og illustrerer foretrukne utførelsesformer men
 skal ikke betraktes som begrensende for rammen for oppfinnelsen.

35 **Figur 1.** Skjematisk fremstilling av genomet av human adenovirus serotype 5
 (GenBank sekvensfil AY339865). Konvensjonelt er det lineære genom av 35934
 basepar oppdelt i 100 kartenheter (mu) fra venstre til høyre. Regionene som koder

tidlige (E1 til E4) og sene (L) RNA'er er indikert. E3 regionen koder for syv proteiner avledet fra et pre-mRNA transkript ved differensiell spleising. oppfinnelsen vedrører E3-19K proteinet og mutasjoner som påvirker dets karboksy-terminale hale.

5 Figur 2. Stor plakk fenotype karakteristikk av mutant AdT1. Denne mutant ble oppnådd ved random mutagenese av genomet av human adenovirus type 5 (GenBank sekvens fil AY339865) etterfulgt av en screening basert på isoleringen av virus fra blod og tumorer i mus med implanterte tumorer. Cytotoksisiteten mot tumorceller for adenoviruset AdT1 ble sammenlignet med cytotoksisiteten til villtype adenovirus
10 (Adwt). Humane tumor A549 celler ble utsådd på 6-brønns plater. Ved 80 % konfluens ble de infisert med seriefortynnet Adwt eller AdT1. 4 timer etter infeksjon ble viruset fjernet og celle monolaget ble dekket med et lag av medium blandet med agarose. Infiserte celler ble inkubert i 6 døgn og deretter farget med nøytral rød, en farge absorbert kun av levende celler. Resultatet viser at plakkene generert ved AdT1 har
15 en større diameter enn plakkene generert ved Adwt (øvre panel). Nedre panel viser en forstørrelse av plakkene observert under det optiske mikroskop (100X) hvor den høyere cytotoksisiteten av virus AdT1 kan konstateres.

Figur 3. Identifikasjon av mutasjonen som gir den store plakk-fenotypen til AdT1. En
20 rekke adenoviruser ved rekombinering av Adwt og mutanten AdT1 ble konstruert og disse rekombinanter som presenterer en stor plakk-fenotype ble studert. I figuren er Adwt genomet angitt som en fin linje og AdT1 genomet er en tykk linje. Den felles regionen som er til stede i alle rekombinantene som viste en stor plakk-fenotype ble sekvensert. Ved sammenligning med villtype adenovirus type 5 sekvensen identifiserte
25 man en insersjon av ett basepar (A i sense-tråden fra venstre til høyre av virus-genomet) i posisjonen 29173 til adenovirus type 5. Denne insersjon forandrer det endoplasmatiske retikulum retensjonssignalet av E3-19K.

Figur 4. Sekvens av mutasjonen til stede i AdT1 (SEK ID NR: 1) sammenlignet med
30 sekvensen av villtype adenovirus serotype 5 (Adwt). Adwt nukleotidsekvensen som representert tilsvarer fragmentet av AY339865 som koder for den karboksy-terminale halen av E3-19K (SEK ID NR: 3). AdT1 virus ble isolert fra et random bibliotek av adenovirus mutanter ved en seleksjon *in vivo* (i immunodefisiente mus med implanterte humane tumorer) for en lengre persistens i blod og i tumorer etter intravenøs
35 administrering. AdT1 viruset inneholder en insersjon av et adenosin nukleotid (A) i posisjon 445 til DNA som koder for proteinet E3-19K. Denne mutasjon (i det etterfølgende betegnet 445-A) forandrer sekvensen til aminosyrer og eliminerer det

endoplasmiske retikulum retensjonsdomenet av E3-19K. Sammenlignet med villtypesekvensen, gir den muterte sekvensen en kortere karboksy-terminal hale.

Figur 5. Skjema for E3-19K protein og effekt av 445-A mutasjonen i det endo-
 5 plasmatiske retikulum retensjonsdomenet av E3-19K. E3-19K er et transmembran glykoprotein som er forankret i det endoplasmatiske retikulum til de adenovirus-
 infiserte cellene. Funksjonelt inneholder E3-19K et lumnalt domene (amino-terminus) som inneholder aminosyrerestene som interagerer med "major histocompatibility complex" klasse 1 proteinene (MHC-1); og et cytoplasmadomene (karboksy-terminus)
 10 som inneholder et positivt signal for retensjon av det endoplasmatiske retikulum (EKKMP eller SEK ID NR: 6). Figuren viser epitopen gjenkjent ved antistoff Tw1.3, anvendt for deteksjonen av E3-19K. Mutasjonen 445-A er en rammeskiftmutasjon i den C-terminale halen som fjerner aminosyrerestene 156 til 160 svarende til EKKMP signalet. Denne mutasjon resulterer i en relokalisering av E3-19K til plasmamem-
 15 branen.

Figur 6. Stor plakk fenotype overføring til villtype adenovirus mediert ved insersjonen av 445-A mutasjonen i det endoplasmatiske retikulum retensjonsdomenet til E3-19K. 445-A mutasjonen til stede i AdT1 ble overført til villtypeviruset (Adwt) ved anvend-
 20 else av gjær-homologe rekombinasjonsteknikker for å oppnå adenoviruset Ad19K-445A. En annen adenovirus mutant ble også konstruert som inneholdt en uavhengig mutasjon som eliminerer endoplasmatisk retikulum retensjonssignalet til E3-19K, adenoviruset Ad19K-KS, hvor de to lysiner til signalet (KK) som er ansvarlig for retensjonen av E3-19K i det endoplasmatiske retikulum, ble substituert for to seriner
 25 (SS) (SEQ ID NR: 4 og SEK ID NR: 5). Plakkstørrelsen til AdT1, Ad19K-445A og Ad19K-KS ble sammenlignet i en plakkanalyse. De tre virusene viste en stor plakk fenotype.

Figur 7. Effekt av mutasjonen av det endoplasmatiske retikulum retensjonsdomenet
 30 av E3-19K på den cellulære lokalisering av E3-19K. For å demonstrere at den inserterte mutasjon forandrer den cellulære lokaliseringen av adenovirus E3-19K proteinet, infiserte man en human tumorcellelinje (A549) med de samme dosene av Adwt og AdT1 (1500 viruspartikler/celle) Trettiseks timer etter infeksjon ble celler høstet og inkubert i PBS eller permeabilisert med 70 % etanol. Deretter ble celler
 35 inkubert med antistoff Tw1.3 (anti-E3-19K) og dette antistoffet ble detektert med et sekundært antistoff merket med grønn fluorescerende protein. Cellesuspensjoner ble ført gjennom et flow cytometer og den gjennomsnittlige verdien for tre uavhengige

resultater er vist. I fravær av permeabilisering av plasmamembranen, ble E3-19K proteinet detektert kun i celler infisert med AdT1, som indikerer dets eksponering i celleoverflaten.

5 Figur 8. Effekt av mutasjonen i det endoplasmatiske retikulum retensjonsdomenet av E3-19K på den cellulære lokalisering av MHC-I. For å demonstrere at forandringene i den sub-cellulære lokaliseringen av den mutante formen av E3-19K modifiserer eksponeringen av "major histocompatibility complex" klasse 1 (MHC-1) ble humane tumorceller (A549) infisert med ekvivalente doser av Adwt eller AdT1 (1500 virus-
10 partikler/celle) og 24 timer etter infeksjon ble celler høstet. Deretter ble celler inkubert med antistoff W6/32 (mot MHC-1) uten permeabilisering for utelukkende å merke MHC-1 fraksjonen lokalisert i plasmamembranen. Bundet W6/32 ble deretter detektert ved å anvende et sekundært antistoff merket med grønn fluorescerende protein. Suspenderte celler ble ført gjennom et flow cytometer. Den gjennomsnittlige
15 verdien for tre uavhengige analyser er vist. MHC-I fra cellene infisert med AdT1 er eksponert i membranen til et tilsvarende nivå som MHC-I til ikke-infiserte celler og til et høyere nivå enn MHC-I til celler infisert med Adwt.

Figur 9. Bevis for at stor plakk fenotypen assosiert med mutasjonen i det endoplas-
20 matiske retikulum retensjonsdomenet av E3-19K ikke avhenger av funksjonen til MCH-I. I (A) ble det konstruert et adenovirus betegnet Ad 19K-445A-CS40 inneholdende 445A mutasjonen som fjerner det endoplasmatiske retikulum retensjonsdomenet av E3-19K og som også inneholder en mutasjon (CS40) som påvirker MHC-I bindingsdomenet til E3-19K. Ved A549 infeksjon, viste denne mutant den samme
25 store plakk fenotypen som AdT1 som indikerer at binding til MHC-I ikke er nødvendig for denne fenotype. Det større feltet (B) viser en plakk analyse av AdT1 i en cellelinje som mangler MHC-1 (DLD-1 celler, fra humant kolon adenokarcinom) og den store plakk fenotypen er likeledes observert.

30 Figur 10. Bevis for at mutasjonen i det endoplasmatiske retikulum retensjonsdomenet av E3-19K ikke resulterer i adenovirus døds-protein (ADP) overekspresjon. Man infiserte celler fra cellelinjen A549 med Adwt eller AdT1 (1500 viruspartikler/celle) og det totale celleprotein ble ekstrahert ved det indikerte tidspunktet. Som en kontroll ble de samme cellene men uten infeksjon (mock) anvendt. En ekvivalent mengde protein-
35 ekstrakt av hver prøve (30 µg) ble lastet på en akrylamid 15 % gel for å separere proteinene (SDS-PAGE). Etter gjennomkjøring av gelen ble proteinene overført til et nitrocellulosefilter (Western-blot prosedyre) og ble detektert med et antistoff mot ADP.

Resultatet viste at AdT1 og Adwt uttrykker den samme mengde ADP med de samme kinetikker.

Figur 11. Bevis for høyere frigivelse av virus til supernatanten av en celle infisert med et adenovirus som inneholder en mutasjon i det endoplasmatiske retikulum retensjonsdomenet av E3-19K. I (A) ble A549 celler infisert med Adwt eller AdT1 (1500 viruspartikler/celle) og mengden av virus som ble frigitt til supernatanten eller til stede i en celleekstrakt (totalt virus) målt ved forskjellige tidspunkter. Mens totalt produsert virus er det samme for Adwt og AdT1, blir AdT1 mutanten frigitt mere effektivt til supernatanten. Det nederste feltet (B) viser det samme forsøket anvendt på en rekke cellelinjer og representerer mengden av virus detektert i supernatanten til de infiserte cellene ved de indikerte tidspunkter etter infeksjon. I alle cellelinjene ble AdT1 frigitt mere effektivt til kultursupernatanten.

Figur 12. Frigivelse av virus til supernatanten av en human fibroblastkultur infisert med et adenovirus som inneholder en mutasjon i det endoplasmatiske retikulum retensjonsdomenet av E3-19K. Humane fibroblaster ble infisert med Adwt eller AdT1 (4500 viruspartikler/celle), og mengden av virus som ble frigitt til supernatanten eller til stede i celleekstrakten (totalt virus) ble målt ved forskjellige tidspunkter. Resultatet viser den høyere frigivelse av virus AdT1 som inneholder en mutasjon i det endoplasmatiske retikulum retensjonsdomenet av E3-19K.

Figur 13. Antitumoreffekt av et adenovirus som inneholder en mutasjon i det endoplasmatiske retikulum retensjonsdomenet av E3-19K sammenlignet med et villtype adenovirus. Humane pankreatiske adenokarcinomceller (NP-9) ble inokulert subkutan i immun-defisiente mus (nakne). Når tumorene utviklet seg, ble musen behandlet intravenøst med 2×10^{10} viruspartikler/mus av villtype adenovirus (Adwt) eller mutant AdT1 adenovirus (10 mus/gruppe) i en enkeltdose. Prosentandel av tumorvekst er vist som en funksjon av tiden i forhold til dag 0 (tid for behandling). Resultatet viser at mutasjonen i det endoplasmatiske retikulum retensjonsdomenet av E3-19K øker adenovirusets onkolytiske potens.

Figur 14. Stor plakk fenotypeoverføring til et onkolytisk adenovirus mediert ved inserasjon av 445-A (SEK ID NR: 1 og SEK ID NR: 2) mutasjonen av det endoplasmatiske retikulum retensjonsdomenet av E3-19K. ICOVIR5 (som omtalt i CASCALLO M, ALONSO MM, ROJAS JJ; PEREZ-GIMENEZA, FUEYO J AND ALEMANY R. "Systemic Toxicity-Efficacy Profile of ICOVIR-5, a potent and Selective Oncolytic

Adenovirus Based on the pRB Pathway". Molecular Therapy. 2007 Sep; 15(9): 1607-15) er et onkolytisk adenovirus, som inneholder en mutasjon i E1a genet ($\Delta 24$ mutasjon, delta-24 mutasjon, en delesjon av nukleotider fra 922 til 946 av AD5 som fjerner pRB-bindingssitet til E1a), en E2F1 promotersekvens for å kontrollere ekspresjonen av slik E1a- $\Delta 24$, DM1 insulatoren og ccacc kozak sekvensen (alle disse mutasjoner som definert ved SEK ID NR: 7), og en kapsidmodifikasjon (RGD peptidinsersjon) for å øke dens ineffektivitet mot tumorceller (mutasjon i SEK ID NR: 8). Posisjoner fra 1 til 366 av SEK ID NR: 7 inneholder ITR og pakkesignalet til det humane adenovirus type (serotype) 5 (AY339865). I SEK ID NR: 8, blir posisjoner fra 1 til 1638, og posisjoner fra 1666 til 1773, kodifiserende regioner for fiberen til den humane adenovirus type 5, som henholdsvis svarer til posisjoner fra nukleotid 31037 til 32674 og fra nukleotid 32675 til 32782 i AY339865. 445-A mutasjonen til stede i AdT1 ble overført til det onkolytiske adenovirus ICOVIR5 ved å anvende gjær-homologe rekombinasjonsteknikker for å oppnå adenoviruset ICOVIR5-T1. Ad $\Delta 24$ RGD (som omtalt av SUZUKI, K., FUEYO, J. KRASNYKH, V., REYNOLDS; P., CURIEL, D.T. and ALEMANY, R. 2001. "A conditionally replicative adenovirus with enhanced infectivity shows improved oncolytic potency". Clinical Cancer Research-2001; 7(1): 120-126) er en annen adenovirus mutant som inneholder $\Delta 24$ og RGD mutasjoner. Plakkstørrelsen til ICOVIR5-T1, ICOVIR5 og Ad $\Delta 24$ RGD ble sammenlignet i en plakkanalyse med infisering av et monolag av A549 lunge adenokarcinomceller med 1 viruspartikkel per celle (venstre felter) eller 0,1 viruspartikkel per celle (høyre felter) av ICOVIR5-T1, ICOVIR5 eller Ad $\Delta 24$ RGD. Etter 10 døgn ble platene fotografert. ICOVIR5-T1 viste en stor plakk fenotype sammenlignet med ICOVIR5 og Ad $\Delta 24$ RGD.

25 DETALJERT BESKRIVELSE AV OPPFINNELSEN

A. Struktur og funksjon til adenoviruser med mutasjoner i det endoplasmatiske retikulum retensjonsdomenet av E3-19K og deres anvendelse i cancerbehandling.

30 **[0036]** Den foreliggende oppfinnelse beskriver anvendelsen av adenoviruser med mutasjoner i det endoplasmatiske retikulum retensjonsdomenet av E3-19K for behandling av cancer. Behandlingen er basert på replikasjonen av disse virus i tumorer.

35 **[0037]** En rekke metoder anvendes for å manipulere det virale genomet. Metodene som anvendes for konstruksjonen av genetisk modifisert adenovirus er vel etablert innen området av genterapi og adenovirus viroterapi. Den mest vanlige anvendte metoden er basert på introduksjonen av den ønskede genetiske modifikasjon i et

plasmid som inneholder regionen av adenovirus genomet som skal modifiseres, og med påfølgende gjennomføring av homolog rekombinasjon i bakterier med et plasmid som inneholder resten av det virale genomet.

[0038] Forskjellige typer av mutasjoner og genetiske manipulasjoner har blitt gjennomført for å oppnå tumorselektiv replikasjon. En av disse er insersjonen av promoterer som er aktive i tumorceller og anvendes for å kontrollere ekspresjonen av virale gener. Disse promoterer inkluderer E2F promoteren, telomerase (hTERT) promoteren, tyrosinasepromoterer, den prostata-spesifikke antigen (PSA) promoteren, alfa-fetoprotein promoteren, cyklooksigenase 2 (cox-2) promoteren og artifiisielle promoterer basert på introduksjonen av transkripsjonsfaktor-bindingsseter slik som HIF-1 (Hypoxia-induserbar faktor), Ets (transkripsjonsfaktorer for E26 familien) og tcf (T-celle faktor). En utførelsesform av den foreliggende oppfinnelse er anvendelsen av adenoviruser med mutasjoner i det endoplasmatiske retikulum retensjonsdomenet av E3-19K i kombinasjon med disse promoterer.

[0039] En annen modifikasjon som er beskrevet for å oppnå tumor-selektiv replikasjon er delesjonen av tidlige E1A funksjoner som blokkerer pRB sporet. Den selektive replikasjon av slike mutanter er blitt vist innen en rekke tidligere kjente dokumenter. Andre virusgener som interagerer direkte med pRB slik som E4 og E4orf6/7 er kandidater til å deleteres for å oppnå selektiv replikasjon i tumorceller. En utførelsesform av oppfinnelsen er anvendelsen av adenoviruser med mutasjoner i det endoplasmatiske retikulum retensjonsdomenet av E3-19K i kombinasjon med disse E1 deleterte mutanter som gir selektiv replikasjon.

[0040] En annen modifikasjon som er beskrevet for å oppnå tumor-selektiv replikasjon er delesjonen av adenovirusgener som koder for de virus-assosierte RNA'er (VA-RNA'er). Disse RNA'er blokkerer den antivirale aktiviteten til interferon og deres delesjon resulterer i adenoviruser som er sensitive overfor interferon inhibering. På grunn av den karakteristiske trunkering i interferonsporet i tumorceller replikerer slike adenoviruser normalt i tumorer. En utførelsesform av den foreliggende oppfinnelse er anvendelsen av adenoviruser med mutasjoner i det endoplasmatiske retikulum retensjonsdomenet av E3-19K i kombinasjon med disse delesjoner i de virus-assosierte RNA'er som gir selektiv replikasjon.

[0041] I en annen utførelsesform av denne oppfinnelse, kan adenoviruser med mutasjoner i det endoplasmatiske retikulum retensjonsdomenet av E3-19K inneholde modifikasjoner i deres kapsid for å øke deres infektivitet eller dirigering derav til reseptorer til stede i tumorcellen. De adenovirale kapsidproteinene er blitt genetisk modifisert til å inkludere ligander som øker infektivitetet eller som leder viruset til en reseptor til stede i tumorcellen. Dirigeringen av virus til tumorcellen kan også oppnås

med bifunksjonelle ligander som binder til viruset i en ende og til tumorreseptoren i den andre. For å øke blodpersistens til adenovirus for å øke mulighetene for å nå de utbredte tumorsvulstene, kan kapsidet også belegges med polymerer slik som polyetylenglykol. En utførelsesform av den foreliggende oppfinnelse anvendelsen av
 5 adenoviruser med mutasjoner i det endoplasmatiske retikulum retensjonsdomenet av E3-19k i kombinasjon med disse kapsidmodifikasjoner.

[0042] I en annen utførelsesform av den foreliggende oppfinnelse, inneholder adenoviruset som replikerer (replikativt adenovirus) andre genommodifikasjoner som resulterer i en økning i ekspresjonen av nevnte muterte E3-19K protein. Der kan være
 10 mange måter å øke ekspresjonen av det muterte E3-19K på. For eksempel modifikasjoner av E3 promoteren for å øke gentranskripsjon eller mutasjoner som øker aktiviteten av virusproteiner involvert i prosessering av virus RNA'er og proteinsyntese. Da det muterte E3-19K tilveiebringer en ny funksjon, vil denne overekspresjon resultere i en økt funksjon.

[0043] I en annen utførelsesform av den foreliggende oppfinnelse, inneholder adenovirusene andre gener for å øke deres cytotoxiskitet i tumorceller, slik som
 15 tymidin kinasegenet, cytosin-deaminasegenet, pro-apoptotiske gener, immunstimulerende gener eller tumor suppressorgener.

20 B. Produksjon, rensing og formulering av adenoviruser med mutasjoner i det endoplasmatiske retikulum retensjonsdomenet av E3-19K.

[0044] Adenovirusene beskrevet i denne oppfinnelse kan propageres i henhold til standardmetoden innen området for adenovirologi og adenovirale vektorer, som
 25 omtalt i Graham FL, Prevec L. Manipulation of adenoviral vectors. Clifton, N.J.: Humana Press; 1991; and Alemany R, Zhang W. Oncolytic adenoviral vectors. Totowa, JN.: Humana Press; 1999. Den foretrukne metoden for propagering består i infeksjonen av en cellelinje som tillater replikasjonen av adenovirus med mutasjoner i det endoplasmatiske retikulum retensjonsdomenet av E3-19K. Lunge-adenokarcinom
 30 A549 cellelinjen er et eksempel på en slik cellelinje. Propageringen gjennomføres f.eks. som følger: A549 celler dyrkes i plast cellekulturplater og infiseres med 50 viruspartikler per celle. To døgn senere viser den cytopatiske effekten virusproduksjonen når celler løsriveres og danner "druelignende" klynger. Cellene høstes og lagres i rør. Cellene sentrifugeres ved 1000 g i 5 minutter og cellepelletten fryses og
 35 tines tre ganger for å befri det intracellulære virus. Den oppnådde celleekstrakten sentrifugeres ved 1000 g i 5 minutter og supernatanten som inneholder viruset legges på en cesium klorgradient og sentrifugeres i 1 time ved 35000 g. Båndet til det

oppnådde viruset samles og legges igjen på en annen gradient av cesiumklorid og sentrifugeres i 16 timer ved 35000 g. Virusbåndet samles og dialyseres mot PBS-10 % glyserol. En prøvemengde av det dialyserte viruset tas og oppbevares ved -80°C.

Kvantifiseringen av antallet viruspartikler og plakkdannende enheter gjennomføres i
5 henhold til standard protokoller.

[0045] Fosfatbufret saltoppløsning (PBS) med 10 % glyserol er en standardformulering som anvendes for lagring av adenovirus. Andre formuleringer som forbedrer stabiliteten til viruset er imidlertid blitt beskrevet.

10 C. Anvendelse av adenoviruser med mutasjoner i det endoplasmatiske retikulum retensjonsdomenet av E3-19K i cancerbehandling.

[0046] Denne oppfinnelse beskriver anvendelsen av adenoviruser med mutasjoner i det endoplasmatiske retikulum retensjonsdomenet av E3-19K for behandlingen av
15 cancer. Behandlingen er basert på replikasjonen av disse viruser i tumorceller.

[0047] Protokollene for anvendelsen av virusene beskrevet i denne oppfinnelse for behandlingen av cancer følger de samme prosedyrene som dem anvendt innen områdene av viroterapi og genterapi med adenovirus. Der er bred erfaring i anvendelsen av replikasjonsdefekte og replikasjonskompetente adenoviruser innen
20 området av genterapi. En rekke publikasjoner beskriver behandlingen av tumorceller *in vitro*, i dyremodeller eller i kliniske forsøk med pasienter. For behandlingen av celler *in vitro* blir de rensede adenovirus, i en hvilken som helst av formuleringene som beskrevet ovenfor, tilsatt til dyrkingsmediet for å infisere tumorcellene. For å behandle
25 tumorer i dyremodeller eller pasienter kan adenovirus avleveres ved lokal eller regional administrering gjennom intratumoral eller intrakavital injeksjon eller systemisk ved intravenøs injeksjon. Behandlingen av tumorer med adenovirusene beskrevet i denne oppfinnelse kan anvendes i kombinasjon med andre terapeutiske modaliteter slik som kjemoterapi eller radioterapi, som tidligere beskrevet innen
30 området av onkolytisk adenovirus.

EKSEMPLER

EKSEMPEL 1

35 Et adenovirus med en mutasjon i det endoplasmatiske retikulum retensjonsdomenet av E3-19K spres mere effektivt.

[0048] Et bibliotek av mutagenisert adenovirus ble konstruert som følger: 2×10^{10} viruspartikler av human adenovirus type 5 (Adwt) ble mutagenisert ved behandling med 0,7 M salpetersyre i 8 minutter. Deretter ble den virale oppløsning fortynnet og dialysert for å eliminere det mutageniserende middel. For å fikse mutasjonene, ble det mutageniserte viruset anvendt for å infisere humane tumor A549 celler og ble 5 amplifisert og renset med en cesiumklorid gradient, som tidligere beskrevet. Den mutageniserte grunnstamme ble injisert inn i immunsupprimerte mus med subkutane pankreatiske NP-9 tumortransplantater. Viruset oppnådd i blodet til musene 4 timer etter injeksjon ble amplifisert *in vitro* i A549 celler, renset og injisert igjen intravenøst 10 i påfølgende runder med bioseleksjon. Etter flere runder, ble viruset inneholdt i tumoren som hadde vist den beste tumorregresjon (best onkolytisk aktivitet) ekstrahert (T1 ekstrakt). Til slutt ble et virus betegnet AdT1 isolert fra T1 ekstrakten ved å anvendt en plakkanalyse. Denne analyse består i infeksjonen av et monolag av tumorceller med en oppløsning av fortynnet virus og tilsetningen av et agarosebelegg 15 etter injeksjon. Agar danner en gelerende polymer som forhindrer spredning av viruset gjennom kulturen og fører til at viruset spres fokalt fra de initialt infiserte cellene resulterende i dannelsen av mer eller mindre runde områder uten celler betegnet plakk. En plakkanalyse viste at plakkene til T1 var større enn de parenterale Ad5 plakkene (se figur 2 i denne oppfinnelse). Denne fenotypen indikerte at AdT1 celle-til-celle spredning var hurtigere enn Adwt. Denne økte spredning er 20 svær interessant for dens anvendelse i viroterapi og cancer, da den kan øke antitumoraktiviteten som vist i denne oppfinnelse.

[0049] Når AdT1 virus var isolert var det neste trinn bestemmelsen av den genetiske modifikasjon som var ansvarlig for fenotypen med stor plakk. En rekke virus ble 25 konstruert ved å insertere fragmenter av AdT1 genomet inn i Ad5 villtype genomet (se figur 3). Dette fenotypiske kart indikerte at mutasjonen ansvarlig for stor-plakk fenotypen var til stede i en region fra 75,8 (posisjon 27300 i Ad5) til 100 kartenheter av adenovirussekvensen. Denne region av AdT1 ble sekvensert og sammenlignet med sekvensen til Adwt. Den eneste mutasjonen som ble funnet var lokalisert i den C-terminale regionen av E3-19K proteinet i det endoplasmatiske retikulum retensjonsdomenet (se figurer 4 og 5 ifølge oppfinnelsen). Denne mutasjon betegnet 445-A 30 inserterer ett basepar (et adenin i translasjonstråden og det respektive tymin i den komplementære tråden som man kan se i SEK ID NR: 1) som forandrer leserammen til mRNA og resulterer i en forandring i restene 5'-SRRSFIDEKKMP-3' i den C-terminale enden av det native proteinet (SEK ID NR: 3). For å vise at denne mutasjon var 35 ansvarlig for fenotypen til virus AdT1 ble et adenovirus type 5 som inneholdt denne mutasjon konstruert ved seterettet mutagenese. Dette virus betegnet Ad-19K-445A

ga den samme stor-plakk fenotypen som virus AdT1, som viste at fenotypen av AdT1 var bevirket ved mutasjon E3-19K 445-A (se figur 6 i oppfinnelsen).

[0050] Før denne oppfinnelse, hadde stor-plakk fenotypen som indikerer en bedre celle-til-celle spredning i cellekulturer aldri blitt assosiert til mutasjoner i det endo-
 5 plasmatiske retikulum retensjonsdomenet av E3-19K. Faktisk, og så langt oppfinnerne vet, er der ingen publikasjoner av virusser som inneholder mutasjoner i dette domenet av E3-19K da studiet av domenene til E3-19K har blitt gjennomført med cDNA til det isolerte protein og ikke i virussammenheng, som indikert ovenfor. Dette tidligere studium beskrev at mutasjonen av den C-terminale halen av E3-19K resulterer i
 10 tilstedeværelsen av proteinet i plasmamembranen. For å bevise om mutant E3-19K proteinet av AdT1 er lokalisert til plasmamembranen, ble E3-19K protein deteksjonen gjennomført med et antistoff spesifikt mot dette protein (TW1.3 antistoff) i celler som ikke var blitt permeabilisert. I disse betingelser presenterte cellene infisert med AdT1 celleoverflateekspresjon av E3-19K mens celler infisert med Adwt ikke gjorde dette
 15 (se figur 7 i oppfinnelsen). Når membranene ble permeabilisert, blir fraksjonen av E3-19K i det endoplasmatiske retikulum tilgjengelig for antistoffet og detekteres i både cellene infisert med AdT1 og med Adwt.

[0051] Mutasjon 445-A til stede i adenovirus AdT1 påvirker det endoplasmatiske retikulum retensjonsdomenet av E3-19K og resulterer i stor-plakk fenotypen som
 20 indikerer en forbedret celle-til-celle virusspredning. For å demonstrere at denne fenotypen er assosiert med en forandring i lokaliseringen av E3-19K proteinet fra det endoplasmatiske retikulum til cellemembranen og ikke til den spesifikke 445-A mutasjonen uten assosiasjon med forandringen i lokalisering, ble et annet virus konstruert med en mutasjon som var forskjellig fra 445-A, men som også påvirket det
 25 endoplasmatiske retikulum retensjonsdomenet av E3-19K proteinet. Dette adenovirus betegnet Ad19K-KS er kjennetegnet ved substitusjonen av to lysiner i det endoplasmatiske retikulum retensjonsdomenet av E3-19K for to seriner (SEK ID NR: 4 og SEK ID NR: 5). Denne modifikasjon i E3-19K, når man studerer det isolerte protein, er blitt beskrevet for å eliminere retensjonen av E3-19K i det endoplasmatiske retikulum
 30 (Pahl HL, Sester M, Burgert HG, Baeuerle PA. Activation of transcription factor NF-kappaB by the adenovirus E3/19K protein requires its ER retention. J Cell Biol 1996; 132(4):511-22). Som vist i figur 6 i oppfinnelsen, presenterer det konstruerte adenovirus (Ad19K-KS) også en stor-plakk fenotype. Dette resultat viser at forskjellige mutasjoner som påvirker endoplasmatiske retikulum lokaliseringen av E3-19K
 35 resulterer i en økt virusspredning.

[0052] Da den viktigste funksjonen til E3-19K er å binde til MHC I og bibeholde MHC I i det endoplasmatiske retikulum for å forhindre immunresponsen mot den infiserte

cellen, ble sammenhengen mellom fenotypen av AdT1 og denne funksjon studert.

Infeksjonen med AdT1 som inneholder en mutasjon i det endoplasmatiske retikulum retensjonsdomenet av E3-19K resulterer i en økning i celleoverflateekspresjon av E3-19K (figur 7). Parallelt var der en økning i celleoverflateekspresjonen av MHC I

5 sammenlignet med celler infisert med villtype adenovirus (figur 8). Denne forandring i lokalisering av E3-19K/MHC-I komplekset kunne være ansvarlig for stor-plakk fenotypen. For å bevise denne hypotesen ble et virus som inneholdt på begge mutasjoner 445-A i AdT1 og en mutasjon i MHC i bindingsdomenet av E3-19K, betegnet CS-40 (forandring av aminosyre 40 i den native protein fra cystein til serin) konstruert. Virus
10 Ad19K-445A-CS40 presenterte fremdeles en stor-plakk fenotype (se figur 9) som indikerer at tilstedeværelsen av E3-19K/MHC I komplekset i cellemembranen ikke var nødvendig for å indusere stor-plakk fenotypen. Videre bevis som bekrefter at MHC-I ikke var ansvarlig for stor-plakk fenotypen var infeksjon av DLD-1 celler med AdT1. Skjønt disse celler manglet celleoverflate MHC I ekspresjon presenterte AdT1
15 fremdeles større plakker enn Adwt (se figur 9).

[0053] Tidligere har ADP (E3-11.6K) overekspresjon blitt beskrevet til å resultere i en fenotype som er tilsvarende den som er presentert i denne oppfinnelse. Adenoviruser med ADP overekspresjon er kjennetegnet ved en stor-plakk fenotype som et resultat av en mere effektiv og tidlig viral frigivelse fra den infiserte cellen. Overekspresjon av
20 ADP kan oppnås ved å eliminere E3-19K og andre E3 proteiner og således øke spleisingen av E3-11.6K mRNA. For å teste om et adenovirus med en mutasjon i det endoplasmatiske retikulum retensjonsdomenet av E3-19K, formålet med denne oppfinnelse, resulterer i overekspresjonen av ADP, som kunne forklare fenotypen, ble ADP ekspresjon i AdT1-infiserte celler bestemt. Som observert i figur 10 i oppfinnelsen,
25 indikerte ADP deteksjon ved western-blot med et anti-ADP antistoff at protein-ekstraktene til AdT1-infiserte celler inneholdt den samme mengden av ADP som ekstraktene til Adwt-infiserte celler og at det var uttrykt med tilsvarende kinetikker. Dette viser at den økte spredning bevirket ved mutasjonen i det endoplasmatiske retikulum retensjonsdomenet av E3-19K ikke var avhengig av ADP overekspresjon og
30 impliserer en ny mekanisme som er forskjellig fra dem som tidligere er beskrevet innen fagområdet for denne oppfinnelse.

[0054] Oppsummert, illustrerer dette eksempel av mutasjoner i det endoplasmatiske retikulum retensjonsdomenet av E3-19K resulterer i en forbedret spredning av adenovirus. To forskjellige mutasjoner, begge som påvirker dette domenet, har den samme
35 effekt som indikerer at fenotypen er assosiert med forandring i lokaliseringen av E3-19K og ikke med den spesifikke mutante sekvensen. Den økende spredning av adeno-

viruser med mutasjoner i det endoplasmatiske retikulum retensjonsdomenet av E3-19K avhenger ikke av interaksjon med MHC I og heller ikke med ADP overekspressjon.

EKSEMPEL 2

5

Et adenovirus med mutasjoner i det endoplasmatiske retikulum retensjonsdomenet av E3-19K frigis mere effektivt fra de infiserte cellene i supernatanten.

[0055] Stor-plakk fenotypen oppdaget i eksempel 1 indikerer en økt spredning av
 10 adenoviruser med mutasjoner i det endoplasmatiske retikulum retensjonsdomenet av E3-19K. Plakkanalysen begynner med et lite antall infiserte celler og reflekterer celle-til-celle spredningen av viruset som et resultat av flere virussykluser. For å bestemme om mutasjoner i det endoplasmatiske retikulum retensjonsdomenet av E3-19K produserte en åpenbar fenotypisk forandring i løpet av en viral syklus ble et monolag
 15 av celler infisert med en stor mengde AdT1, og produksjonen og frigivelsen av virus etterkommeren ble sammenlignet med Adwt. For å oppnå informasjon om total virusproduksjon og frigivelse i en syklus av viral replikasjon ble det intracellulære virus og viruset til stede i supernatanten til cellekulturen målt separat. Et monolag av A549 celler i seks-brønns plater ble infisert med 15400 viruspartikler per celle. Viruset
 20 til stede i supernatanten og celleekstrakten ble målt ved forskjellige tidspunkter etter infeksjon. Resultatet indikerer at adenovirus AdT1, som inneholder en mutasjon i det endoplasmatiske retikulum retensjonsdomenet av E3-19K, er frigitt 100 ganger mer effektivt enn Adwt, mens det totale virusutbyttet var upåvirket (figur 11 i oppfinnelsen, øverst). Denne analyse ble gjennomført i et panel av tumorcellelinjer av forskjellig opprinnelse. AdT1 ble frigitt mere effektivt enn Adwt i alle de testede cellelinjer
 25 (figur 11, nederst) og forskjeller i virusfrigivelse varierte fra 5 til 125 ganger. For å bekrefte om denne fenotypen av økt frigivelse inn i supernatanten også var åpenbar i ikke-tumorceller, ble humane karcinom-assosierte fibroblaster isolert fra humane tumorbiopsier. Resultatet indikerte at adenovirus AdT1 mutasjoner i det endoplasmatiske retikulum retensjonsdomenet av E3-19K også ble frigitt mere effektivt i
 30 disse fibroblaster. Oppsummert, viser dette eksempel at et replikasjonskompetent adenovirus med mutasjoner i det endoplasmatiske retikulum retensjonsdomenet av E3-19K ble frigitt mere effektivt fra infiserte celler. Den økte frigivelse av viruset fra den infiserte cellen er en passende egenskap for et replikerende adenovirus for
 35 behandlingen av cancer.

EKSEMPEL 3

Mutasjonen i det endoplasmatiske retikulum retensjonsdomenet av E3-19K øker den onkolytiske potensen til adenovirus og et adenovirus med denne mutasjon kan også anvendes for å behandle tumorer effektivt.

[0056] Et *in vivo* forsøk ble gjennomført i Balb/c nakne mus som har subkutane pankreatiske humane tumorer. Totalt 8×10^6 NP-9 celler ble injisert subkutan inn i siden til musene. Etter 15 døgn når tumorvolumene nådde $80\text{--}100 \text{ mm}^3$ ble musene randomisert til ulike eksperimentelle grupper ($n=10$ per gruppe). Kontrolltumorene ble injisert intravenøst via halevenen med fosfatbufret saltvann ($150 \mu\text{l}$). Gruppen behandlet med AdT1 mottok en enkel intravenøs injeksjon av 2×10^{10} viruspartikler/mus. Tumorene ble målt hvert annet døgn og volumet ble beregnet med formel: $V(\text{mm}^3) = A \times B^2(\text{mm}^2) \times 3,14/6$, hvor B er lengden av tumoren. Figur 13 viser tumorveksten siden injeksjonsdagen (dag 0). Resultatene er angitt som gjennomsnitt $\pm$ S.E.M. Signifikansen av forskjellene ble beregnet ved å anvende en ikke-parametrisk Mann-Whitney-test for uparede prøver. Vekstkurvene ble sammenlignet ved å anvende en variansanalyse. Resultatene ble betraktet som signifikante når $p < 0,05$. Beregningene ble gjennomført med SPSS statistisk pakke (SPSS Inc., Chicago, IL). En signifikant forskjell ble observert i veksten av tumorene behandlet med AdT1 siden dag 10 etter injeksjon inntil slutten av forsøket.

EKSEMPEL 4

Et onkolytisk betinget-replikativt adenovirus (ICOVIR5) med en mutasjon i det endoplasmatiske retikulum retensjonsdomenet av E3-19K spres mere effektivt.

[0057] ICOVIR5 (Cascallo et al. Molecular Therapy 15:1607. 2007) er et tumor-selektivt adenovirus som er mutert i E1a genet ($\Delta 24$ mutasjon), inneholder en E2F1 promotersekvens for å kontrollere ekspresjonen av et slikt mutert E1 a (mutasjoner reflektert i SEK ID NR: 7), og inneholder en kapsidmodifikasjon (RGD peptid insersjon) for å øke dets ineffektivitet mot tumorceller, som definert ved SEK ID NR: 8. For å demonstrere at en mutasjon i det endoplasmatiske retikulum retensjonsdomenet av E3-19K kan være effektivt kombinert med disse genetiske modifikasjoner karakteristisk for onkolytiske adenoviruser, ble et derivat av ICOVIR5 inneholdende 445-A mutasjonen i E3-19K (i henhold til SEK ID NR: 1 og SEK ID NR: 2) konstruert og betegnet ICOVIR5-T1. Dette virus ble sammenlignet, i en plakkanalyse, med

parenteralt virus ICOVIR5, og med et andre kontrollvirus med $\Delta 24$ og RGD mutasjoner (betegnet Ad $\Delta 24$ RG). En plakkanalyse består i infeksjonen av et monolag av tumor-celler med en oppløsning av fortynnet virus og tilsetningen av et agar belegg etter infeksjon. Agar danner en geleringspolymer som forhindrer spredningen av virus og

5 bevirker at viruset spres fokalt fra de initialte infiserte cellene resulterende i dannelsen av hull i celle-monolaget kjent som "plakk". En plakkanalyse ble gjennomført ved infeksjon av et monolag av A549 lunge-adenokarcinomceller med 1 eller 0,1 viruspartikler per celle av ICOVIR5-T1, ICOVIR5- eller Ad $\Delta 24$ RGD. Etter 10 døgn ble platene fotografert (figur 14 ifølge oppfinnelsen). Plakkene av ICOVIR5-T1 var større

10 enn ICOVIR5 og Ad $\Delta 24$ RGD plakkene.

[0058] Skjønt de ovennevnte eksempler illustrerer adenoviruser med en mutasjon i det endoplasmatiske retikulum retensjonsdomenet av E3-19K oppnådd fra serotypen 5, vil en fagkyndig på området forstå at alle serotypene som har E3 genene og som er i stand til å transludere proteinet E3-19K også kan anvendes i den foreliggende

15 oppfinnelse.

SEKVENSLISTE

[0059]

20

<110> INSTITUT CATALA D'ONCOLOGIA

<120> Adenovirus with mutations in the endoplasmic reticulum retention domain of the E3-19K protein and use in cancer treatment

<130> P1101PC00

<150> ES 200700665

<151> 2007-03-14

<160> 8

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 484

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Mutant of coding region for protein E3-19K of human adenovirus serotype 5

<400> 1

```

atgattagggt acataatcct aggtttactc acccttgcgt cagcccacgg taccacccaa      60
aagggtggatt ttaaggagcc agcctgtaat gttacattcg cagctgaagc taatgagtgc      120
accactctta taaatgcac cacagaacat gaaaagctgc ttattcgcca caaaaacaaa      180
attggcaagt atgctgttta tgctatttgg cagccagggtg acactacaga gtataatgtt      240
acagttttcc agggtaaaag tcataaaact tttatgtata cttttccatt ttatgaaatg      300
tgcgacatta ccatgtacat gagcaaacag tataagttgt ggccccaca aaattgtgtg      360
gaaaacactg gcactttctg ctgcactgct atgctaatta cagtgtcgcg tttggtctgt      420
accctactct atattaaata caaaaagcag acgcagcttt attgaggaaa agaaaatgcc      480
ttaa                                         484

```

<210> 2

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Fragment of mutated carboxy-terminal fragment of protein E3-19K of human adenovirus type S

<400> 2

Lys Lys Gln Thr Gln Leu Tyr
1 5

<210> 3

<211> 13

<212> PRT

<213> Fragment of wild type C-terminus fragment of E3-19K of human adenovirus type 5

24

<400> 3

Lys Ser Arg Arg Ser Phe Ile Glu Glu Lys Lys Met Pro

1

5

10

<210> 4

<211> 483

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Mutant of codifying region for protein E3-19K of human adenovirus type 5

<400> 4

atgattaggt acataatcct aggtttactc acccttgcgt cagcccacgg taccacccaa	60
aagggtggatt ttaaggagcc agcctgtaat gtacattcg cagctgaagc taatgagtgc	120
accactctta taaaatgcac cacagaacat gaaaagctgc ttattcgcca caaaaacaaa	180
attggcaagt atgctgttta tgctatttgg cagccaggtg acactacaga gtataatgtt	240
acagttttcc agggtaaaaag tcataaaaact tttatgtata cttttccatt ttatgaaatg	300
tgcgacatta ccatgtacat gagcaaacag tataagttgt ggccccaca aaattgtgtg	360
gaaaacactg gcactttctg ctgcaactgct atgctaatta cagtgcctgc ttgggtctgt	420
accctactct atattaaata caaaagcaga cgcagcttta ttgaggaaag cagcatgcct	480
taa	483

<210> 5

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Fragment of mutated carboxy-terminal fragment of protein E3-19K of human adenovirus type 5

<400> 5

Lys Ser Arg Arg Ser Pro Ile Glu Glu Ser Ser Met Pro
1 5 10

<210> 6

<211> 5

<212> PRT

<213> Signal sequence for retention at the endoplasmic reticulum of E3-19K of wild type human adenovirus type 5

<400> 6

<210> 7

<211> 2512

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Sequence with the regulatory regions DM1 insulator (from position 367 to 1095), a fragment of the E2F1 promoter (from position 1282 to 1545), the ccacc kozak sequence (from position 1546 to 1550), and the E1a- 24 gene (from position 1551 to 2512)

<400> 7

catcatcaat tataccttcc attttggatt gaagccaata tgataatgag ggggtggagt	60
ttgtgacgtg ggcggggcg tgggaacggg gcggtgacg tagtagtgtg gcggaagtgt	120
gatgttgcaa gtgtggcggg acacatgtaa gcgacggatg tggcaaaagt gacgtttttg	180
gtgtgcccgg gtgtacacag gaagtgacaa ttttcgcgcg gttttaggcg gatgtttag	240
taaatttggg cgtaaccgag taagatttgg ccattttcgc gggaaaactg aataagagga	300
agtgaatct gaataatttt gtgttactca tagcgcgtaa tctctagcat cgatgtcgag	360
gatccctcga gaccctgaaa ctgtcttcga ctccggggcc ccgttggag actgagtgcc	420
cggggcacgg cacagaagcc ggcgccaccg cctgccagtt cacaaccgct ccgagcgtgg	480
gtctccgccc agctccagtc ctgtgatccg gggccgcccc ctagcggccg gggagggagg	540
ggcgggtcc ggcggcggcg aacggggctc gaagggtcct tgtagccggg aatgctgctg	600
ctgctgctgg ggggatcaca gaccatttct ttctttcggc caggctgagg ccctgacgtg	660
gatgggcaa ctgcaggcct ggggaaggcag caagccgggc cgtccgtgtt ccattctcca	720
cgcaccccca cctatcgttg gttcgcaaag tgcaaagctt tcttgatcat gacgccctgc	780
tctggggagc gtctggcgcg atctctgcct gcttactcgg gaaatttgct tttgcaaac	840
ccgctttttc ggggatcccg cggcccccctc ctacttgcg ctgctctcgg agccccagcc	900
ggctccgccc gcttcggcgg tttggataat tattgacctc gtcctccgac tcgctgacag	960
gctacaggac cccaacaac cccaatccac gttttggatg cactgagacc ccgacattcc	1020
tcggtattta ttgtctgtcc ccacctagga ccccccaccc cgaccctcgc gaataaaagg	1080
ccctccatct gcccctcgag tctagagatg gccgcaataa aatatcttta ttttcattac	1140
atctgtgtgt tggttttttg tgtgaatcga tagtactaac atacgctctc catcaaaaca	1200
aaacgaacaa aaacaaacta gcaaaatagg ctgtccccag tgcaagtgca ggtgccagaa	1260
catttctcta tcgataggta ccatccggac aaagcctgcg gcgccccgc cccgccattg	1320
gccgtaccgc cccgcgcgcg cggcccatct cggccctcgc cgcgggtcc ggcgcgttaa	1380
agccaatagg aaccgccgcc gttgttcccg tcacggccgg ggcagccaat tgtggcggcg	1440
ctcggcggct cgtggctctt tcgcggcaaa aaggatttgg cgcgtaaaag tggccgggac	1500
tttgaggcca gcggcggccg ggggcggagc gggatcgagc cctcgccacc atgagacata	1560
ttatctgccg cggagggtgt attaccgaag aaatggccgc cagtcttttg gaccagctga	1620
tcgaagaggt actggctgat aatcttccac ctcttagcca ttttgaacca cctacccttc	1680
acgaactgta tgatttagac gtgacggccc ccgaagatcc caacgaggag gcggtttcgc	1740
agatttttcc cgactctgta atgttggcgg tgcaggaagg gattgactta ctacttttc	1800
cgcggcgcc cggttctccg gagccgcctc acctttcccg gcagcccag cagccggagc	1860
agagagcctt gggtcgggtt tctatgccaa accttgatcc ggaggatgc gatccacca	1920
gtgacgacga ggatgaagag ggtgaggagt ttgtgttaga ttatgtggag cccccgggc	1980
acggttgacg gtcttgtcat tatcaccgga ggaatacggg ggaccagat attatgtgtt	2040

cgctttgcta tatgaggacc tgtggcatgt ttgtctacag taagtgaaaa ttatgggcag	2100
tgggtgatag agtgggtgggt ttgggtgtggt aatttttttt ttaattttta cagttttgtg	2160
gtttaaagaa ttttgtattg tgattttttt aaaagggtcct gtgtctgaac ctgagcctga	2220
gcccagagcca gaaccggagc ctgcaagacc taccgcgcgt cctaaaaatgg cgcctgctat	2280
cctgagacgc ccgacatcac ctgtgtctag agaatgcaat agtagtacgg atagctgtga	2340
ctccggtcct tctaacacac ctctgagat acaccgggtg gtcccgtgtg gcccattaa	2400
accagttgcc gtgagagttg gtgggcgtcg ccaggctgtg gaatgtatcg aggacttgct	2460
taacgagcct gggcaacctt tggacttgag ctgtaaacgc cccaggccat aa	2512

<210> 8

<211> 1773

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Sequence codifying the fiber of the human adenovirus type 5 (from position 1 to 1638; and position 1666 to 1773) containing an insertion of the peptide RGD (from position 1639 to 1665) containing the RGD motif (from 1648 to 1656)

<400> 8

atgaagcgcg caagaccgtc tgaagatacc ttcaaccccg tgtatccata tgacacggaa	60
accggtcctc caactgtgcc ttttcttact cctccctttg tatcccccac tgggtttcaa	120
gagagtcccc ctgggttact ctctttgcgc ctatccgaac ctctagttag ctccaatggc	180
atgcttgccg tcaaaatggg caacggcctc tctctggacg aggccggcaa cttacctcc	240
caaaatgtaa ccactgtgag cccacctctc aaaaaaacca agtcaaacat aaacctggaa	300
atatctgcac ccctcacagt tacctcagaa gccctaactg tggctgccgc cgcacctcta	360
atggtcgcgg gcaacacact caccatgcaa tcacaggccc cgctaaccgt gcacgactcc	420
aaacttagca ttgccaccca aggacccctc acagtgtcag aaggaaagct agccctgcaa	480
acatcaggcc ccctcaccac caccgatagc agtaccctta ctatcactgc ctcaccccct	540
ctaactactg ccactggtag cttgggcatt gacttgaaag agccattta tacacaaaat	600
ggaaaactag gactaaagta cggggctcct ttgcatgtaa cagacgacct aaacactttg	660
accgtagcaa ctggtccagg tgtgactatt aataatactt ccttgcaaac taaagttagt	720
ggagccttgg gttttgattc acaaggcaat atgcaactta atgtagcagg aggactaagg	780
attgattctc aaaacagacg ccttatactt gatgttagtt atccgtttga tgctcaaac	840
caactaaatc taagactagg acagggccct ctttttataa actcagccca caacttgat	900
attaactaca acaaaggcct ttacttgttt acagcttcaa acaattccaa aaagcttgag	960
gttaacctaa gcactgccaa ggggttgatg ttgacgcta cagccatagc cattaatgca	1020
ggagatgggc ttgaatttgg ttcacctaat gcaccaaaca caaatcccct caaaacaaaa	1080
attggccatg gcctagaatt tgattcaaac aaggctatgg ttcctaaact aggaactggc	1140
cttagttttg acagcacagg tgccattaca gtaggaaaca aaaataatga taagctaact	1200
ttgtggacca caccagctcc atctcctaac tgtagactaa atgcagagaa agatgctaaa	1260
ctcacttttg tcttaacaaa atgtggcagt caaatacttg ctacagtttc agttttggct	1320
gttaaaggca gtttggctcc aatatctgga acagttcaaa gtgctcatct tattataaga	1380
tttgacgaaa atggagtgt actaaacaat tccttcctgg acccagaata ttggaacttt	1440
agaaatggag atcttactga aggcacagcc tatacaaacg ctgttggtatt tatgcctaac	1500
ctatcagctt atccaaaatc tcacggtaaa actgccaaaa gtaacattgt cagtcaagtt	1560
tacttaaacg gagacaaaac taaacctgta aactaacga tcacactaaa cggtacacag	1620
gaaacaggag acacaacttg tgactgccgc ggagactgtt tctgcccata tgcatactct	1680
atgtcatttt catgggactg gtctggccac aactacatta atgaaatatt tgccacatcc	1740
tcttacactt tttcatacat tgcccaagaa taa	1773

Patentkrav

1. Replikativt adenovirus som omfatter en mutasjon i det endoplasmatiske retikulum retensjonsdomenet av E3-19K som forhindrer retensjonen av E3-19K i det endo-
5 plasmatiske retikulum og som videre omfatter en genetisk modifikasjon for å oppnå selektiv replikasjon i tumorer.
2. Replikativt adenovirus ifølge krav 1, hvor nevnte adenovirus omfatter mutasjoner i ett eller flere gener fra gruppen bestående av E1a, E1b, E4 og VA-RNA'er, for å oppnå
10 selektiv replikasjon i tumorer.
3. Replikativt adenovirus ifølge krav 1, hvor nevnte adenovirus omfatter en vev-spesifikk promoter eller en tumorspesifikk promoter, for å oppnå selektiv replikasjon i tumorer.
- 15 4. Replikativt adenovirus ifølge krav 3, hvor den vevspesifikke promoter eller den tumorspesifikke promoter er promotersekvenser for å kontrollere ekspresjonen av ett eller flere gener fra gruppen som består av E1a, E1b, E2 og E4 for å oppnå selektiv replikasjon i tumorer.
- 20 5. Replikativt adenovirus ifølge krav 1, hvor nevnte adenovirus videre omfatter kapsid-modifikasjoner for å øke dets infektivitet eller for å målrette det mot en reseptor til stede i en tumorcelle.
- 25 6. Replikativt adenovirus ifølge krav 1, hvor nevnte adenovirus videre omfatter gener som er vanlig å anvende innen området av cancer genterapi.
7. Replikativt adenovirus ifølge krav 6, hvor nevnte gener som er vanlig anvendt innen området av cancerterapi er i det minst et gen valgt fra gruppen som består av
30 prodrug-aktiverende gener, tumor-suppressorgener eller immunstimulerende gener.
8. Replikativt adenovirus ifølge krav 1, hvor nevnte adenovirus videre omfatter genom-modifikasjoner som resulterer i en økning av ekspresjonen av E3-19K proteinet.
- 35 9. Replikativt adenovirus som omfatter en mutasjon i det endoplasmatiske retikulum retensjonsdomenet av E3-19K som forhindrer retensjonen av E3-19K i det endo-

plasmatiske retikulum, hvor nevnte adenovirus omfatter nukleotidsekvensen SEK ID NR: 1.

10. Replikativt adenovirus ifølge krav 9, som uttrykker et endoplasmatisk retikulum
5 retensjonsdomene av E3-19K med en karboksy-terminal hale med en SEK ID NR: 2.

11. Replikativt adenovirus ifølge et hvilket som helst av kravene 1-8, hvor nevnte adenovirus har nukleotidsekvensen SEK ID NR: 4.

10 12. Replikativt adenovirus ifølge et hvilket som helst av kravene 1-8 og 11, som uttrykker et endoplasmatisk retikulum retensjonsdomene av E3-19K med en karboksy-terminal hale med en SEK ID NR: 5.

13. Replikativt adenovirus ifølge et hvilket som helst av kravene 1-8, hvor nevnte
15 adenovirus omfatter i det minste nukleotidsekvensene SEK ID NR: 1, SEK ID NR: 7 og SEK ID NR: 8.

14. Replikativt adenovirus ifølge krav 13, som uttrykker et endoplasmatisk retikulum retensjonsdomene av E3-19K med en karboksy-terminal hale med en SEK ID NR: 2.
20

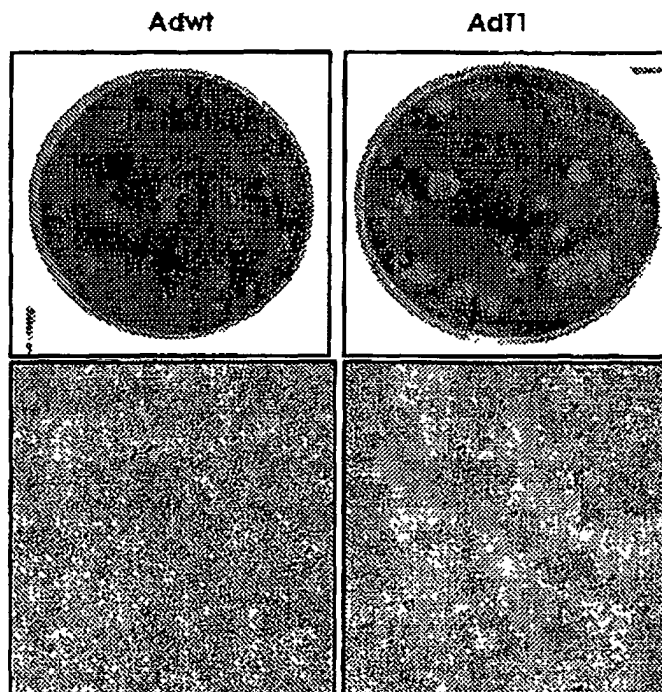
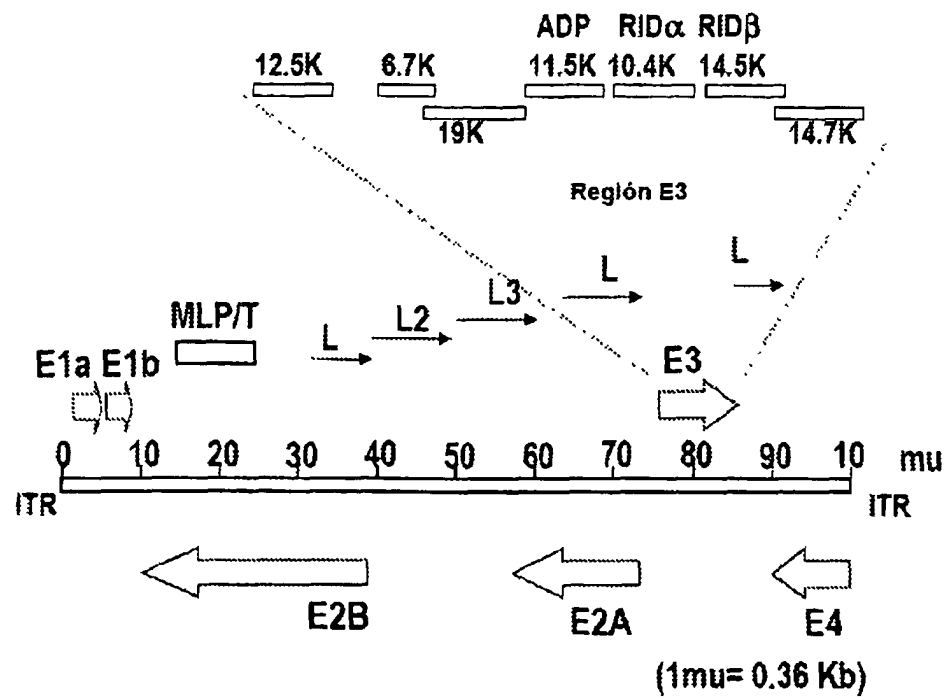
15. Farmasøytisk preparat som omfatter en farmakologisk effektiv dose av et adenovirus ifølge krav 1 til 14 og en eller flere farmasøytiske aksepterbare bærere eller eksipienser.

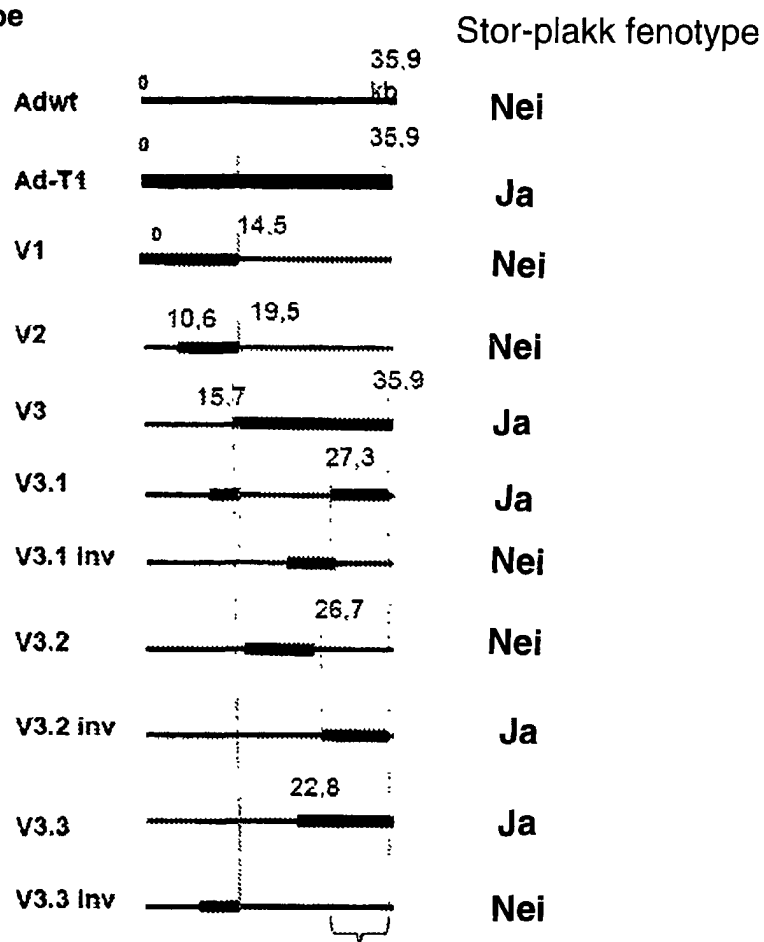
25 16. Replikativt adenovirus ifølge krav 1 til 14 for anvendelse som et medikament.

17. Replikativt adenovirus for anvendelse som i krav 16 som et profylaktisk og/eller terapeutisk middel i cancer.

30 18. Anvendelse av det replikative adenovirus ifølge et hvilket som helst av kravene 1-14 for å fremstille et farmasøytisk preparat for behandling eller forebygging av cancer eller den pre-maligne sykdommen som fører til cancer.

19. Replikativt adenovirus som omfatter en mutasjon i det endoplasmatiske retikulum
35 retensjonsdomenet av E3-19K som forhindrer retensjonen av E3-19K i det endoplasmatiske retikulum for anvendelse i behandling eller forebygging av cancer eller den pre-maligne sykdommen som fører til cancer.

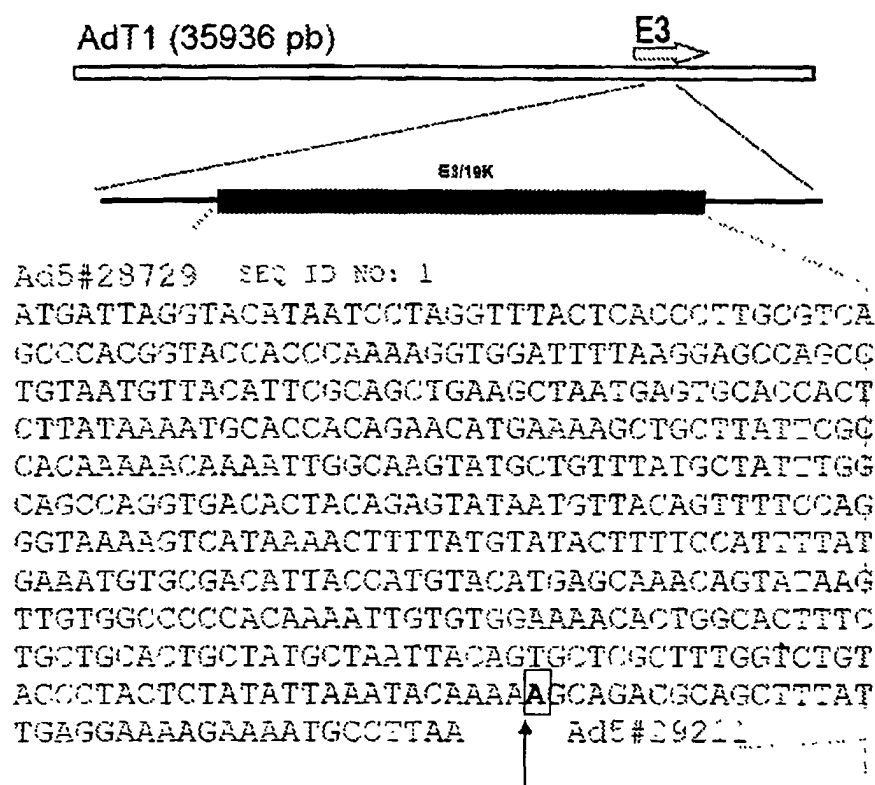
Figur 1Figur 2

Figur 3**Kartlegging av stor-plakk
fenotype**

Felles sekvens i alle viruser
med stor-plakk fenotype

DNA sekvensering

Adenin insersjon i posisjon 29173 av adenovirus
type 5 som påvirker det endoplasmatiske retikulum
retensjonssignalet av E3-19K.



Mutasjon 445-A tilstede i AdT1

Adenin insersjon etter nukleotid 445 E3-19K cDNA danner et :
 rammeskift (forandrer AA sekvens og trunkerer proteinet):

SEK ID NR: 3

Lys Ser Arg Arg Ser Phe Ile Glu Glu Lys Lys Met Pro STOP

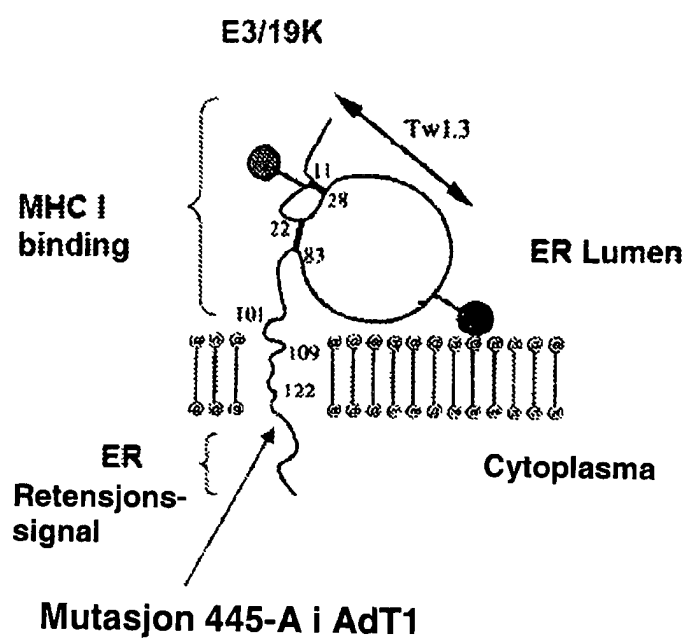
Adwt AAA AGC AGA CGC AGC TTT ATT GAG GAA AAG AAA ATG CCT TAA

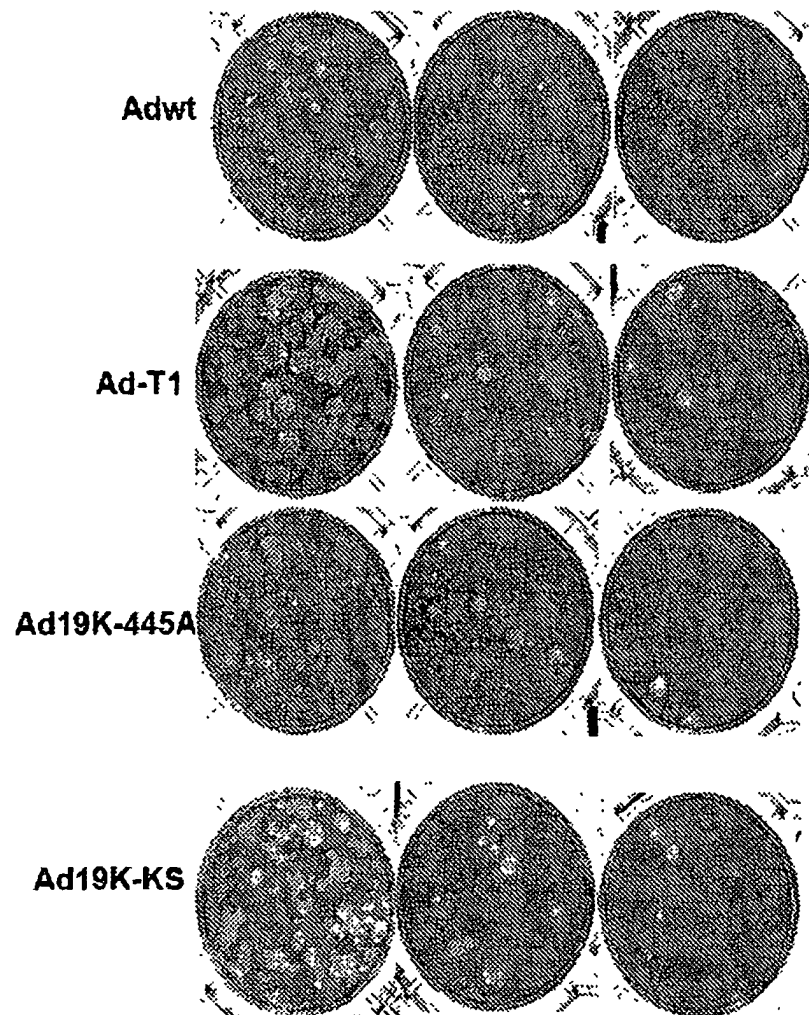
AdT1 AAA AAG CAG ACG CAG CTT TAT TGA GGA AAA GAA AAT GCC TTA A

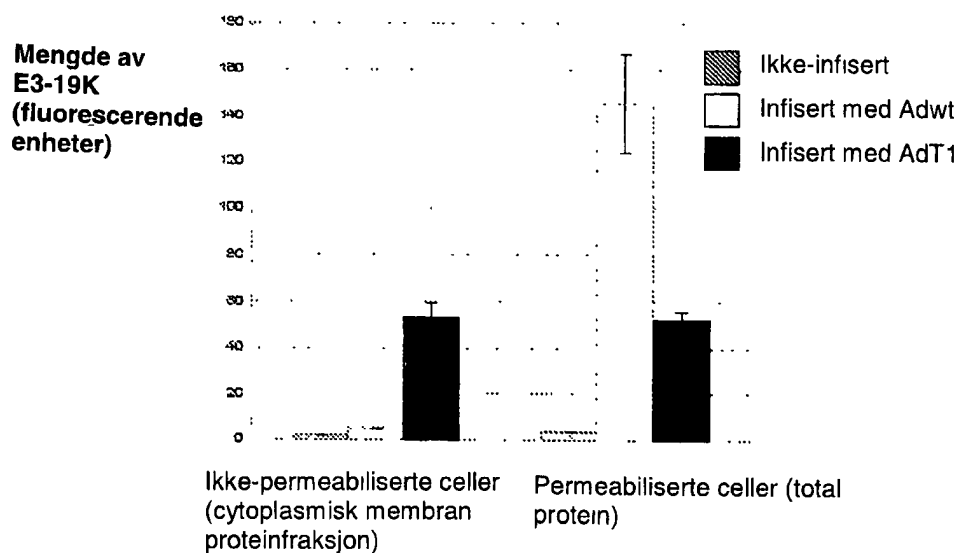
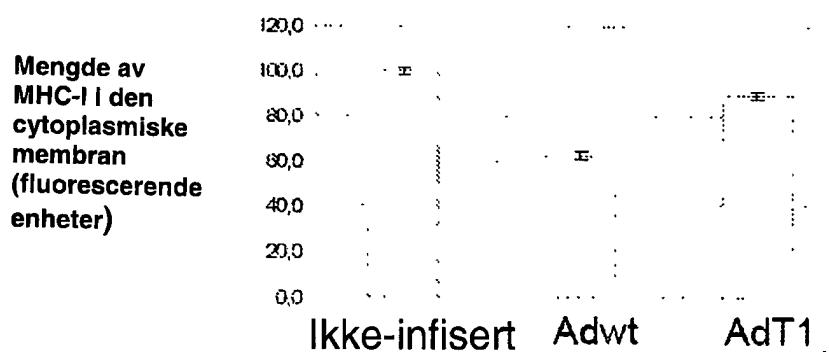
Lys Lys Gln Thr Gln Leu Tyr

SEK ID NR: 2

Figur 4

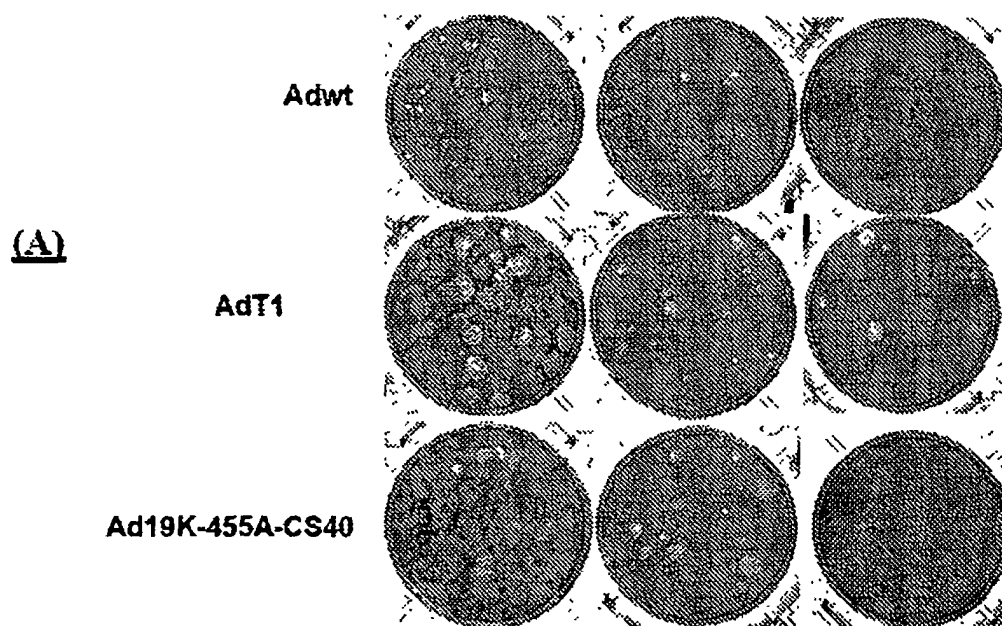
Figur 5

Figur 6

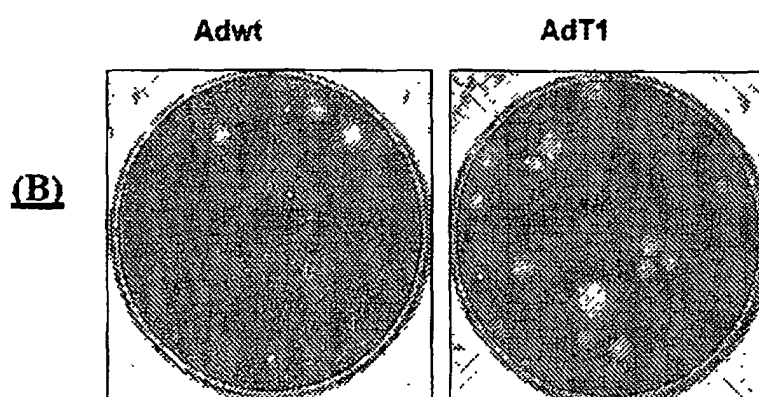
Figur 7Figur 8

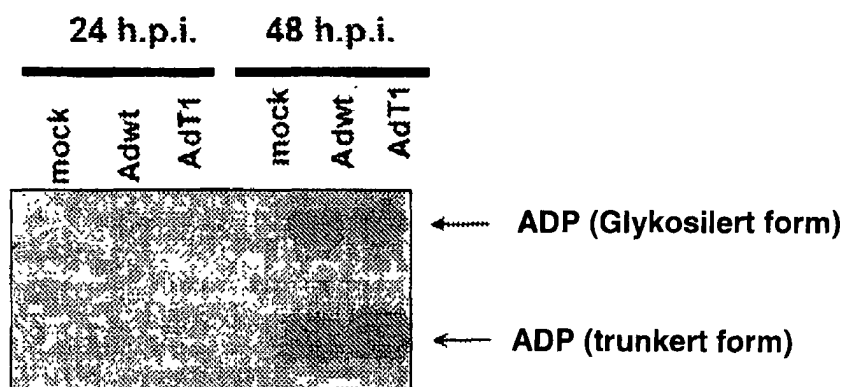
Figur 9

**Plakk analyse med viruser inneholdende 445-A mutasjonen
og ikke i stand til å binde MHC-I**

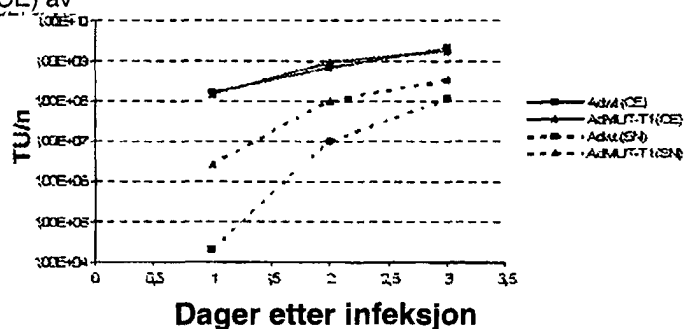


Plakk analyse i DLD-1 (mangler MHC I)

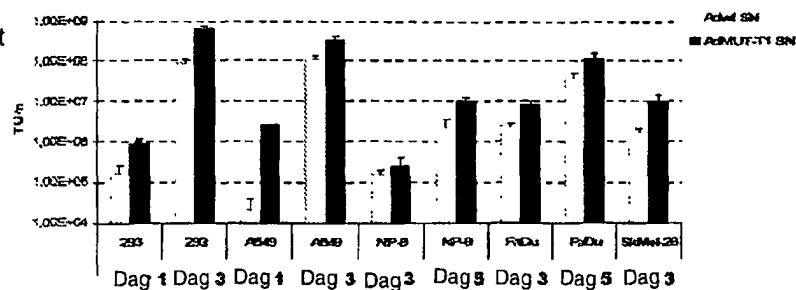


Figur 10Figur 11

Mengde virus i
supernatant (SN) og i
celleekstrakter (CE) av
cellelinjen A549

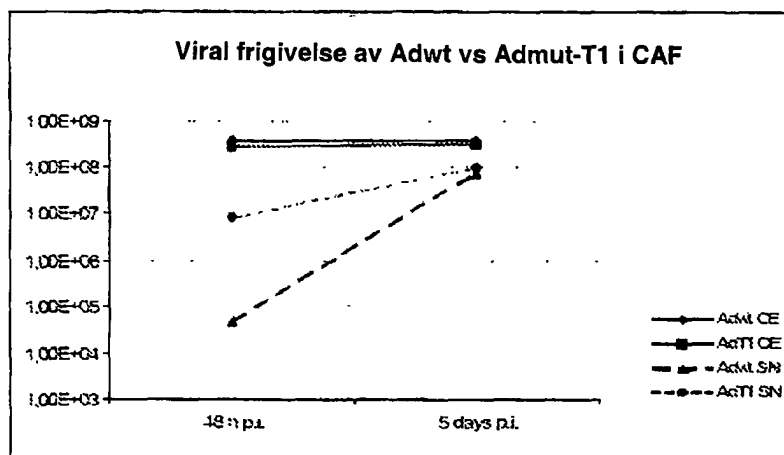
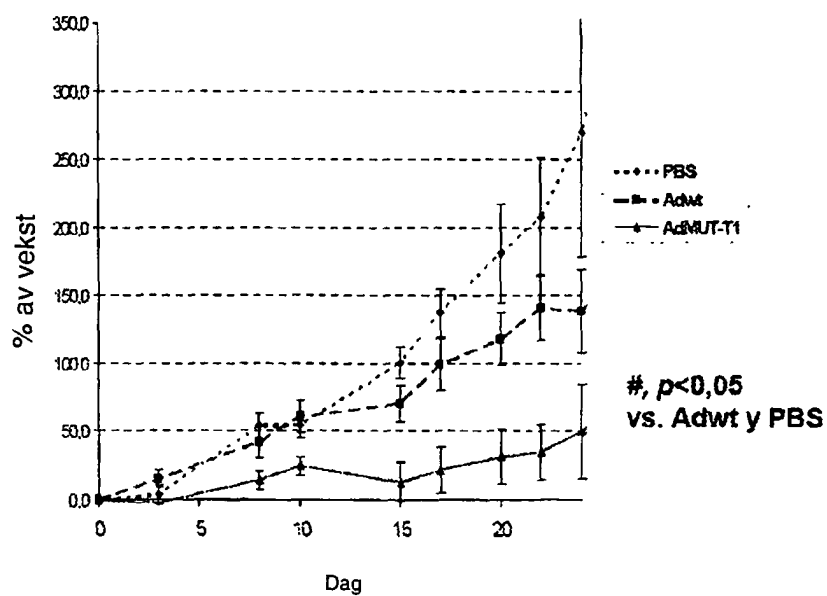
(A)

Mengde
virus i
supernatant

(B)

Figur 12

Kvantifisering av virus i totale celle-ekstrakter (CE) og frigitt til supernatanten (SN) av

Figur 13

Figur 14