



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 366 608**

51 Int. Cl.:

A01N 63/00 (2006.01)

A61K 39/12 (2006.01)

A61K 39/245 (2006.01)

C12N 7/00 (2006.01)

C12N 7/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02753865 .1**

96 Fecha de presentación : **27.03.2002**

97 Número de publicación de la solicitud: **1381280**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **21.01.2004**

54 Título: **Vectores víricos y su uso en métodos terapéuticos.**

30 Prioridad: **27.03.2001 US 279069 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
21.10.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
21.10.2011

73 Titular/es: **Catherex, Inc.**
3500 South DuPont Highway
City of Dover, Delaware, US
THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION
GEORGETOWN UNIVERSITY

72 Inventor/es: **Johnson, Paul;**
Martuza, Robert;
Rabkin, Samuel, D. y
Todo, Tomoki

74 Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

ES 2 366 608 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

Vectores Víricos y su Uso en Métodos Terapéuticos

Campo de la Invención

Esta invención se relaciona con virus y su uso en métodos terapéuticos.

5 Antecedente de la Invención

El uso de vectores competentes para replicación vírica, tal como los vectores del virus del herpes simple tipo 1 (HSV-1), es una estrategia atractiva para la terapia de tumor, debido a que tales virus se pueden replicar y propagar in situ, exhiben actividad oncolítica a través del efecto citopático directo (Kirn, *J. Clin. Invest.* 105:837-839, 2000). Se ha desarrollado un número de vectores HSV-1 oncolíticos que tienen mutaciones en los genes asociados con neurovirulencia y/o síntesis de ADN vírica, con el fin de restringir la replicación de estos vectores a las células transformadas y no provoca enfermedad (Martuza, *J. Clin. Invest.* 105:841-846, 2000).

En el diseño de los vectores víricos para uso clínico, es esencial que se utilicen amplias protecciones. El G207 es un vector HSV-1 oncolítico derivado de la cepa F HSV-1 tipo natural (Mineta et al., *Nat. Med.* 1:938-943, 1995). Este tiene eliminaciones en ambas copias del determinante principal de la neurovirulencia del HSV, el gen γ 34.5 y una inserción de inactivación del gen LacZ E. coli en UL39, que codifica la proteína de célula infectada 6 (ICP6) (Mineta et al., *Nat. Med.* 1:938-943, 1995). La ICP6 es la subunidad grande de reductasa de ribonucleótido, una enzima clave para el metabolismo de nucleótido y la síntesis de ADN vírico en las células sin división pero no en células en división (Goldstein et al., *J. Virol.* 62:196-205, 1988). Además de ser el principal determinante de la neurovirulencia del HSV (Chou et al., *Science* 250:1262-1266, 1990), el ICP34.5 también funciona al bloquear la interrupción inducida por las células anfitrionas de la síntesis de proteína en respuesta a la infección vírica (Chou et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89:3266-3270, 1992). Esto es probablemente responsable del crecimiento menos eficiente de los mutantes γ 34.5 comparado con el HSV tipo natural, que ha sido observado en muchos tipos de células de tumor (McKie et al., *Br. J. Cancer* 74:745-752, 1996; Andreansky et al., *Cáncer Res.* 57: 1502-1509, 1997; Chambers et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92:1411-1415, 1995). Esta mutación doble confiere ventajas importantes: oportunidad mínima de revertir a tipo natural, la replicación preferencial en las células de tumor, neurovirulencia atenuada, e hipersensibilidad de ganciclovir/aciclovir. El G207 mata efectivamente múltiples tipos de células de tumor en el cultivo y en ratones que tienen tumores subcutáneamente o intracranalmente (Mineta et al., *Nat. Med.* 1:938-943, 1995; Yazaki et al., *Cancer Res.* 55:4752-4756, 1995; Toda et al., *Hum. Gene Ther.* 9:2177-2185, 1998; Todo et al., *Hum. Gene Ther.* 10:2741-2755, 1999; Chahlavi et al., *Neoplasia* 1:162-169, 1999; Kooby et al., *FASEB J.* 13:1325-1334, 1999; Lee et al., *J. Gastrointest. Surg.* 3:127-133, 1999). En diversos modelos de tumor singeneicos en ratones inmunocompetentes, la oncólisis originada por inoculación intraneoplásica de G207 provoca una respuesta inmune sistémica y linfocitos T citotóxicos específicos de tumor (Todo et al., *Hum. Gene Ther.* 10:2741-2755, 1999; Toda et al., *Hum. Gene Ther.* 10:385-393, 1999; Todo et al., *Hum. Gene Ther.* 10:2869-2878, 1999).

El G207 tiene toxicidad mínima cuando se inyecta en los cerebros de ratones susceptibles a HSV-1 o primates diferentes de humanos (Hunter et al., *J. Virol.* 73:6319-6326, 1999; Sundaresan et al., *J. Virol.* 74:3832-3841, 2000; Todo et al., *Mol. Ther.* 2: 588-595, 2000). Recientemente, se ha examinado el G207 en pacientes con glioma maligno recurrente (Markert et al., *Gene Ther.* 7:867-874, 2000), y los resultados de este ensayo clínico fase I indican que la inoculación intracerebral de G207 es segura en dosis de hasta 3×10^9 unidades formadoras de placa (pfu), la dosis más alta probada. Aunque el uso de virus oncolíticos es un método promisorio para terapia oncológica, los beneficios terapéuticos dependerán probablemente de la dosis y la ruta de administración, el grado de replicación vírica intratumoral, y la respuesta inmune anfitriona.

La infección de HSV-1 provoca regulación por disminución de la expresión del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) clase I en la superficie de las células anfitrionas infectadas (Jennings et al., *J. Virol.* 56:757-766, 1985; Hill et al., *J. Immunol.* 152:2736-2741, 1994). La unión del ICP47 al transportador asociado con la presentación de antígeno (TAP) bloquea el transporte de péptido antigénico en el retículo endoplásmico y carga las moléculas MHC clase I (York et al., *Cell* 77:525-535, 1994; Hill et al., *Nature* 375:411-415, 1995; Früh et al., *Nature* 375:415-418, 1995). La unión de ICP47 es específica de las especies para los TAP de mamíferos grandes (Jugovic et al., *J. Virol.* 72:5076-5084, 1998), con la afinidad de TAP de murino aproximadamente 100 veces menor que para el humano (Ahn et al., *EMBO J.* 15:3247-3255, 1996).

50 Resumen de la invención

La invención proporciona virus del herpes simple (por ejemplo, virus HSV-1) que incluyen mutaciones dentro del fragmento BstEII - EcoNI del fragmento BamHI x de los virus. Estos virus también pueden incluir, por ejemplo, una mutación de inactivación en el locus de neurovirulencia γ 34.5 de los virus, y/o una mutación de inactivación en el locus ICP6 de los virus.

- 5 También se incluyen en la invención el virus del herpes simple (por ejemplo, un virus HSV-1) que incluye una mutación de inactivación en el locus ICP47 de los virus, en la ausencia de una mutación de inactivación en el locus de neurovirulencia γ 34.5 del virus. Opcionalmente, estos virus también pueden incluir una mutación de inactivación en el locus ICP6 de los virus.

- 10 La invención también se puede utilizar para inducir una respuesta inmune sistémica al cáncer en un paciente, que implica administrar al paciente un virus de herpes que incluye una mutación de inactivación en el locus ICP47 del virus de herpes. El virus de herpes se puede administrar, por ejemplo, a un tumor del paciente. Adicionalmente, el paciente puede tener o estar en riesgo de desarrollar cáncer metastásico, y el tratamiento se puede llevar a cabo para tratar o evitar tal cáncer. La mutación de inactivación en el locus ICP47 de los virus de herpes está en el fragmento BstEII - EcoNI del fragmento BamHI x del virus. Opcionalmente, el virus puede incluir una mutación de inactivación en el locus de neurovirulencia γ 34.5 del virus de herpes, y/o una mutación de inactivación en el locus ICP6 del virus de herpes.

- 15 La invención también proporciona virus de herpes que incluyen una primera mutación que inactiva el locus de neurovirulencia γ 34.5 de los virus y una segunda mutación que resulta en la expresión temprana de US11, en la ausencia de una mutación de inactivación ICP47 en el fragmento BamHI x de los virus. Se puede lograr la expresión temprana de US11, por ejemplo, al insertar un promotor en la dirección 5' del gen US11, o al insertar un gen US11 bajo el control de un promotor de expresión temprana en el genoma del virus. Los virus también pueden incluir una mutación que resulta en la regulación por disminución de la expresión ICP47, en la ausencia de una mutación en el fragmento BamHI x del virus. La regulación por disminución de ICP47 puede ser debido a, por ejemplo, una eliminación de, o inactivación de, el promotor ICP47, o la fusión de ICP47 con un péptido que evita la expresión funcional de ICP47.

Los virus descritos anteriormente también pueden incluir una mutación adicional (por ejemplo, una mutación en el locus ICP6) para evitar la reversión al tipo natural. Los virus también pueden incluir, opcionalmente, las secuencias que codifican un producto de gen heterólogo, tal como un antígeno de vacuna o una proteína inmunomoduladora. Los virus descritos aquí pueden ser un virus del herpes simple (HSV), tal como virus del herpes simple-1 (HSV-1).

- 30 La invención proporciona adicionalmente composiciones farmacéuticas que incluyen cualquiera de los virus descritos aquí y un portador, adyuvante o diluyente farmacéuticamente aceptable, que se puede utilizar para tratar cáncer en un paciente, que involucra administrar tal una composición farmacéutica al paciente. La invención también se puede utilizar para inmunizar un paciente contra una enfermedad infecciosa, cáncer, o una enfermedad autoinmune, que involucra administrar tal una composición farmacéutica al paciente.

- 35 La invención proporciona varias ventajas. Por ejemplo, los virus de la invención replican en, y así destruyen, las células en división, tal como células de cáncer, aunque no se afectan otras células en el cuerpo. Una ventaja adicional de los virus de la invención en los que se elimina el ICP47 es que se mejora la respuesta inmune inducida por tales virus, que resulta en una respuesta mejor inmune antineoplásica. Los virus de la invención también incluyen múltiples mutaciones, eliminando la posibilidad de la reversión tipo natural. Más aún, aunque los virus de la invención pueden tener replicación mejorada, esto no se acompaña por toxicidad incrementada. Adicionalmente, la replicación de los virus del herpes simple se puede controlar a través de la acción de fármacos antivíricos, tal como aciclovir, que bloquea la replicación vírica. Estas características hacen que los virus de la invención no solo sean efectivos, sino también seguros.

- 40 Serán evidentes otras ventajas y características de la invención a partir de la siguiente descripción detallada, dibujos, y reivindicaciones.

Breve Descripción de los Dibujos

- 45 Las Figuras 1A-1E son representaciones esquemáticas del genoma HSV-1 y métodos para elaborar los vectores incluidos en la invención. La Figura 1A es una representación esquemática del genoma HSV-1. La Figura 1B es un mapa extendido del locus ICP47, que muestra las ubicaciones de los transcritos de coterminal 3' superpuestos para US10, US 11, y US12 (ICP47). La Figura 1C es una representación esquemática de plásmido pIE12, que contiene un fragmento BamHI-EcoRI de par base 1818 del fragmento HSV-1 BamHI x, que abarca la región ICP47 (Johnson et al., J. Virology 68(10):6347-6362, 1994). Este plásmido se puede utilizar para introducir modificaciones en el locus

ICP47 del genoma vírico, como se describe adicionalmente adelante. La Figura 1D es una representación esquemática del plásmido pIE12 Δ , que se deriva de pIE12 al eliminar 312 pares bases entre los sitios BstEII y NruI indicados. Este plásmido se utiliza para generar los mutantes supresores γ 34.5 R47 Δ y G47 Δ . La Figura 1E es una representación esquemática de los detalles del terminal 3' de la región que codifica ICP47. Las secuencias se pueden insertar en el sitio BstEII indicado, sin interrumpir las secuencias entre los sitios BstEII y NruI, para los propósitos de cambiar la regulación temporal del último gen US 11, para generar una función supresora γ 34.5, y/o evitar la expresión funcional del producto de gen ICP47.

Las Figuras 2A-2C son representaciones esquemáticas de la estructura de G47 Δ . La Figura 2A es un esquema del genoma HSV-1 que muestra las regiones modificadas en G47 Δ . El genoma HSV-1 consiste de regiones únicas cortas y largas (UL y US), cada una vinculada mediante las regiones de repetición de terminal (T) e internas (I) (RL y RS). El virus pariente G207 se construye por ingeniería desde la cepa F HSV-1 tipo natural al eliminar 1 kilobase dentro de ambas copias del gen γ 34.5, e insertar el gen lacZ E. coli en la región que codifica ICP6. El G47 Δ se deriva de G207 al eliminar 312 pares base del locus ICP47, como se indica. La Figura 2B es un mapa del locus ICP47, que muestra las ubicaciones de los transcritos co-terminales 3' superpuestos (US10, US11, y ICP47), marco de lectura abierto (flecha gruesa), y uniones de empalme ICP47 (\wedge). La Figura 2C es un mapa del plásmido pIE12 Δ , que se utiliza para generar eliminaciones mediante recombinación homóloga con las secuencias de flanco indicadas. Aunque se regula el US 11 como un gen tardío verdadero en el HSV-1 tipo natural, la eliminación entre los sitios BstEII y EcoNI indicados pone el US11 bajo el control del promotor temprano inmediato ICP47. Las abreviaturas del sitio de restricción son: B, BamHI; Bs, BstEII; E, EcoRI; EN, EcoNI; Nr, NruI.

La Figura 3 es una gráfica que muestra los rendimientos de virus de mutantes HSV-1 competentes para replicación en varias estirpes celulares. Las células se siembran en placas de 6 pozos a 5×10^5 células/pozo. Se infectan pozos en triplicado con R3616, R47 Δ , G207, G47 Δ , o la cepa F en un MOI de 0.01. A 24 horas post-infección, se raspan células en el medio y la progenie del virus se titula en células Vero. En todas las estirpes celulares probadas, el G47 Δ muestra una significativamente mayor capacidad de replicación que el G207. Los resultados representan la media de los triplicados \pm DE.

La Figura 4 es una serie de gráficas que muestra el efecto citopático de G47 Δ in vitro. Las células se colocan en placas, en placas de 6 pozos a 2×10^5 células/pozo. Después de 24 horas de incubación, las células se infectan con G207 o G47 Δ en un MOI de 0.01 o 0.1, o sin virus (Control). El número de células que sobreviven se cuentan diariamente y se expresan como un porcentaje de controles infectados simulados. El G47 Δ exhibe un efecto citopático significativamente fuerte que el G207 en todas las tres estirpes celulares de tumor humano (U87MG y melanomas 624 y 888) en un MOI de 0.01, y también en células de neuroblastoma de murino Neuro2a en un MOI de 0.1. Los resultados son la media de los triplicados \pm DE. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, G207 versus G47 Δ , prueba t para datos independientes.

Las Figuras 5A-5C son una serie de gráficas que muestra que el G47 Δ excluye la regulación por disminución de la expresión MHC clase I en las células anfitrionas infectadas. La Figura 5A es una gráfica de análisis citométrico de flujo de la expresión MHC clase I en células de fibroblasto humanas Detroit 551 48 horas después de la infección con HSV-1 (MOI = 3). Aunque todos los HSV con un gen intacto α 47 (cepa F tipo natural y G207) regula por disminución significativamente la expresión MHC clase I, el G47 Δ excluye completamente la regulación por disminución. La Figura 5B es una gráfica que muestra un curso de tiempo de la regulación por disminución MHC clase I en células Detroit 551 infectadas con HSV-1. Para cada virus, el valor pico de la expresión MHC clase I a 6, 24, o 48 horas postinfección, que se analiza mediante citometría de flujo, se expresa como un porcentaje del valor pico de las células en las que se simula infección (control) en cada punto de tiempo. La regulación por disminución MHC clase I mediante G207 y R3616 ocurre en una forma que depende del tiempo. La disociación de la expresión MHC clase I entre mutantes eliminados α 47 (G47 Δ y R47 Δ) y virus intactos α 47 llega a ser evidente a 24-48 horas post-infección. La Figura 5C es una serie de gráficas que muestran análisis citométricos de flujo de la expresión MHC clase I en estirpes celulares de melanoma humano 24 horas después de la infección con G207 y G47 Δ . G47 Δ que origina una exclusión parcial de la regulación por disminución MHC clase I en melanomas 1102 y 938, que resulta en expresión MHC clase I mayor que el G207.

La Figura 6 es una serie de gráficas que muestra que las células de tumor infectadas con G47 Δ - estimulan las células T a un grado mayor que las células de tumor infectadas con G207. Las células de melanoma humanas se infectan con el simulado (sin virus), G207, o G47 Δ en un MOI de 3, y después de 3-6 horas, se cocultivan con un número igual de células T humanas correspondientes durante 18 horas. Se evalúa la estimulación de células T mediante un incremento en la liberación de IFN- γ en medio acondicionado. Las células 1102 de melanoma infectadas con G47 Δ - provocan una estimulación significativamente mayor de las células TIL888 comparado con células 1102 infectadas con G207 ($p < 0.01$, prueba t para datos independientes). Las células de melanoma 938 infectadas con G47 Δ también estimulan las células TIL1413, aunque la mejora no es estadísticamente significativa

comparado con células 938 infectadas con G207 ($p = 0.1$, prueba t para datos independientes). Ni las células de melanoma 888 infectadas con G207 ni con G47 Δ provocan una estimulación significativa de las células TIL888.

5 La Figura 7 es un conjunto de gráficas que muestra que el G47 Δ exhibe eficacia de antineoplásica mayor que el G207 in vivo. Se generan tumores subcutáneos del glioma humano U87MG (Izquierdo) o neuroblastoma de murino Neuro2a (Derecho) en ratones atímicos hembra de 6 semanas de edad o ratones A/J hembra de 6 semanas de edad, respectivamente. Los tumores establecidos de aproximadamente 6 mm en diámetro se inoculan con G207 o G47 Δ (1 x 10⁶ pfu), o el simulado (PBS con 10% de glicerol) en los días 0 y 3. G47 Δ el tratamiento es significativamente más eficaz que el G207 en ambos modelos de tumor, que resulta en volúmenes de tumor de promedio más pequeño ($p < 0.05$ para U87MG en el día 24 y $p < 0.001$ para Neuro2a en el día 15, G207 versus G47 Δ , prueba t para datos independientes).

Descripción Detallada

15 La invención proporciona virus que se pueden utilizar en los métodos terapéuticos, tal como, por ejemplo, en el tratamiento de cáncer. Estos virus son particularmente muy adecuados para este propósito, cuando ellos se replican en, y así destruyen, las células en división (por ejemplo, células de cáncer), pero ellos no se replican sustancialmente, y así son avirulentos, en las células sin división. Los virus de la invención también se pueden utilizar en los métodos de inmunización, para el tratamiento o prevención de, por ejemplo, enfermedades infecciosas, cáncer, o enfermedades autoinmunes. Una característica ventajosa de muchos de los virus de la invención es que, en adición a la lisis originada directamente de las células de tumor, ellos inducen una respuesta inmune sistémica contra los tumores. Así, se pueden utilizar estos virus no solo para tratar un tumor dado, al que se pueden administrar directamente, sino también para evitar o tratar las metástasis de cáncer.

20 Varios de los virus de la invención son virus del herpes simple (HSV) que incluyen una mutación de inactivación en el locus ICP47 del virus. Esta mutación ocurre entre el sitio BstEII y el sitio EcoNI del fragmento BamHI x de HSV-1, y puede comprender, por ejemplo, la eliminación del fragmento BstEII - ExoNI. Opcionalmente, un virus del herpes simple que incluye una mutación entre los sitios BstEII y EcoNI también puede incluir mutaciones adicionales. Por ejemplo, tal un virus puede incluir una mutación de inactivación en el locus de determinación de neurovirulencia γ 34.5 del virus, y/o una mutación de inactivación en cualquier parte del genoma, por ejemplo, en el locus ICP6. La invención también incluye virus del herpes simple que incluyen mutaciones inactivantes en el locus ICP47, en la ausencia de una mutación de inactivación en el locus de neurovirulencia γ 34.5. Opcionalmente, tal un virus puede incluir una mutación de inactivación en otro, locus de neurovirulencia sin γ 34.5, por ejemplo, en el locus ICP6.

30 La invención incluye virus adicionales que se basan en el virus de herpes, tal como herpes simple (virus HSV), por ejemplo, HSV-1 (por ejemplo, cepa HSV-1 F o cepa Patton) o HSV-2, que incluye una mutación de inactivación en un gen de virulencia. En el caso del virus del herpes simple, esta mutación puede ser una mutación de inactivación en el gen γ 34.5, que es determinante de neurovirulencia HSV principal. (Ver, por ejemplo, la Figura 1 para detalles que se relacionan con la construcción de los ejemplos de los virus que se incluyen en la invención.)

35 En adición a la mutación γ 34.5, en un ejemplo, los virus de la invención incluye una modificación que resulta de la expresión temprana de US11, en la ausencia de una mutación de inactivación ICP-47 en el fragmento BamHI x del vector. El US11 se expresa normalmente con un gen tardío verdadero, que requiere la replicación de ADN para su expresión. Sin embargo, la expresión temprana de US11 en algunos de los virus de la invención puede compensar el defecto γ 34.5 al evitar la inactivación mediada por PKR de la síntesis de proteína (ver, por ejemplo, Figura 1E). La expresión temprana de US11 tal un virus se puede lograr mediante, por ejemplo, insertar un promotor que actúa temprano en la dirección 5' del gen US11 (Figura 1E). Tales promotores pueden incluir, por ejemplo, el promotor IE de citomegalovirus humano (CMV), un promotor HSV-1 IE, un promotor HSV-1 E, o cualquier otro promotor heterólogo que es activo antes del inicio de la replicación de ADN en el genoma HSV-1 (ver, por ejemplo, adelante). Un método alternativo para lograr la expresión temprana de US11 incluida en la invención involucra insertar una copia exógena de un gen US11 en cualquier parte en el genoma vírico, bajo el control de cualquier promotor adecuado que se activa temprano en la infección, tal como por ejemplo uno de aquellos enumerados anteriormente.

50 Un virus con base en HSV adicional incluido en la invención tiene una mutación que resulta en la expresión temprana de US11 e incluye, en adición a una mutación de inactivación en el locus γ 34.5, una segunda modificación que resulta en la regulación por disminución de la expresión ICP47, en la ausencia de una mutación en el fragmento BamHI x del virus. En un ejemplo de tal un virus, el ICP47 que codifica las secuencias se fusionan con las secuencias que codifican un péptido que evita la expresión funcional de ICP47 (ver, por ejemplo, Figura 1E). Tal un péptido puede incluir, por ejemplo, una secuencia PEST, que es rica en prolina (P), glutamato (E), serina (S), y treonina (T), y proporciona así las señales intramoleculares para la degradación proteolítica rápida (Rechsteiner et al., Trends Biochem. Sci. 21(7):267-271, 1996). Se puede insertar tal una secuencia veneno en el virus a, por

ejemplo, el sitio BstEII, en la dirección 5' de un promotor fuerte que conduce el US11 (Figura 1E). En un vector alternativo, las señales que dirigen la degradación de ARN se incorporan dentro del virus, para dirigir la degradación de ARN ICP47.

- 5 Otros virus incluidos en la invención pueden incluir, en adición a una mutación de inactivación en el locus γ 34.5, dos modificaciones adicionales. La primera modificación adicional resulta de la expresión temprana de US11 y la segunda modificación resulta de la regulación por disminución de la expresión ICP47, como se describió anteriormente, en la ausencia de una mutación en el fragmento BamHI x del virus. En un ejemplo de tal un virus, se inserta un promotor de expresión temprana en la dirección 5' del gen US11 y el ICP47 que codifica las secuencias se fusionan con las secuencias que codifican una secuencia veneno, tal como una secuencia PEST (Figura 1E).
- 10 Cualquiera de los virus descritos anteriormente y aquí y en cualquier parte pueden incluir una mutación adicional o modificación que se hace para evitar la reversión del virus a tipo natural. Por ejemplo, el virus puede incluir una mutación en el gen ICP6 (ver adelante), que codifica la subunidad larga de la reductasa de ribonucleótido. Un ejemplo específico de un virus que se incluye en la invención, G47 Δ , se describe en detalle adicional adelante. En resumen, este virus incluye una eliminación en el gen γ 34.5, una inserción de inactivación en el gen ICP6, y una
- 15 eliminación de 312 pares base en el gen ICP47.

- Los virus descritos aquí se pueden generar a partir de cualquier miembro de la familia de virus de herpes, tal como un virus de herpes neurotrófico, B-linfotrófico, o T-linfotrófico. Por ejemplo, se puede utilizar un virus del herpes simple (HSV), tal como HSV-1 o HSV- 2. Alternativamente, se puede utilizar cualquiera de los siguientes virus: virus zoster de Varicela (VZV), virus de herpes 6 (HSV- 6), virus Epstein Barr, citomegalovirus, HHV6, y HHV7. Los
- 20 métodos y virus descritos aquí se describen principalmente en referencia a HSV-1, pero estos métodos se pueden aplicar fácilmente a cualquiera de estos otros virus por un experto en esta técnica.

- Como se observó anteriormente, los virus de la invención se pueden utilizar para tratar cáncer, cuando estos virus replican en, y destruyen así las células en división, tal como células de cáncer, pero son avirulentas con otras células. Ejemplos de células de cáncer que se pueden destruir, de acuerdo con la invención, incluyen células cáncer
- 25 de tumores del tipo de sistema nervioso, por ejemplo, astrocitoma, oligodendroglioma, meningioma, neurofibroma, glioblastoma, ependimoma, Schwannoma, neurofibrosarcoma, neuroblastoma, tumor pituitario (por ejemplo, adenoma pituitario), y células de meduloblastoma. Otros tipos de células de tumor que se pueden matar, de acuerdo con la presente invención, incluyen, por ejemplo, melanoma, carcinoma de próstata, carcinoma de célula renal, cáncer pancreático, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer gástrico, fibrosarcoma, carcinoma
- 30 epidermoide, neurectodérmico, tumor de tiroides, linfoma, hepatoma, mesotelioma, y células de carcinoma epidermoide, así como también otras células de cáncer mencionadas anteriormente. También como se observó anteriormente, los virus de la invención, que inducen una respuesta inmune sistémica al cáncer, se puede utilizar para evitar o para tratar metástasis de cáncer.

- Otras aplicaciones terapéuticas en las que la muerte de una célula objetivo es deseable incluye, por ejemplo, extirpación de queratinocitos y células epiteliales responsables de verrugas, extirpación de células en órganos hiperactivos (por ejemplo, tiroides), extirpación de células grasas en pacientes obesos, extirpación de tumores benignos (por ejemplo, tumores benignos de la hipertrofia prostática benigna o tiroide), extirpación de células
- 35 adenohipofisiales que producen crecimiento de hormona para tratar acromegalia, extirpación de mamotropos para detener la producción de prolactina, extirpación de células que producen ACTH para tratar la enfermedad de Cushing, extirpación de células cromafina que producen epinefrina de la médula adrenal para tratar feocromocitoma, y extirpación de células islote beta que producen insulina para tratar insulinoma. Los virus de la invención se pueden utilizar en estas aplicaciones muy bien.
- 40

- Los efectos de los virus de la invención se pueden argumentar si los virus también contienen una secuencia de ácido nucleico heteróloga que codifica uno o más productos terapéuticos, por ejemplo, una citotoxina, una proteína
- 45 inmunomoduladora (es decir, una proteína que mejora o suprime una respuesta inmune anfitriona en un antígeno), un antígeno de tumor, una molécula de ARN anticodificante, o una ribozima. Ejemplos de proteína inmunomoduladora incluyen, por ejemplo, citoquinas (por ejemplo, interleucinas, por ejemplo, cualquiera de las interleucinas 1-15, interferones α , β , o γ , factor de necrosis de tumor, factor que estimula la colonia de macrófagos de granulocito (GM-CSF), factor que estimula la colonia de macrófago (M-CSF), y factor que estimula la colonia de
- 50 granulocito (G-CSF)), quimioquinas (por ejemplo, proteína de activación de neutrófilo (NAP), factor de activación y quimioatracción de macrófago (MCAF), RANTES, y péptidos inflamatorios de macrófagos MIP-1a y MIP-1b), componentes de complemento y sus receptores, módulos accesorios del sistema inmune (por ejemplo, B7.1 y B7.2), moléculas de adhesión (por ejemplo, ICAM-1, 2, y 3), y moléculas del receptor de adhesión. Ejemplos de antígenos de tumor que se pueden producir utilizando los actuales métodos incluyen, por ejemplo, los antígenos E6 y E7 del
- 55 virus de papiloma humano, proteínas derivadas de EBV (Van der Bruggen et al., Science 254:1643-1647, 1991), mucinas (Livingston et al., Curr. Opin. Immun. 4(5):624-629, 1992), tal como MUC1 (Burchell et al., Int. J. Cancer 44:

691-696, 1989), tirosinasa de melanoma, y MZ2-E (Van der Bruggen et al., supra). (También ver la WO 94/16716 para una descripción adicional de la modificación de los virus que incluyen genes que codifican los antígenos de tumor o citoquinas.)

5 Como se observó anteriormente, el producto terapéutico también puede ser una molécula de ARN, tal como una molécula de ARN anticodificante que, mediante interacciones de hibridación, se puede utilizar para bloquear la expresión de un mRNA de patógeno o celular. Alternativamente, la molécula de ARN puede ser una ribozima (por ejemplo, una ribozima cabeza de martillo o con base en horquilla) designada para reparar un ARN celular defectuoso, o para destruir un ARN que codifica el patógeno o celular indeseado (ver, por ejemplo, Sullenger, Chem. Biol. 2(5): 249-253, 1995; Czubayko et al., Gene Ther. 4(9):943-949, 1997; Rossi, Ciba Found. Symp. 209:195-204, 1997; James et al., Blood 91(2):371-382, 1998; Sullenger, Citoquinas Mol. Ther. 2(3):201-205, 1996; Hampel, Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Bio. 58:1-39, 1998; Curcio et al., Pharmacol. Ther. 74(3):317-332, 1997).

15 Se puede insertar una secuencia de ácido nucleico heteróloga en un virus de la invención en una ubicación que se hace bajo el control de una secuencia reguladora del virus. Alternativamente, se puede insertar la secuencia de ácido nucleico heteróloga como parte de un casete de expresión que incluye los elementos reguladores, tal como promotores o mejoradores. Se pueden seleccionar elementos reguladores apropiados por aquellos medianamente expertos en la técnica con base en, por ejemplo, la especificidad de tejido deseada y el nivel de expresión. Por ejemplo, se puede utilizar un promotor específico de tumor o específico de tipo de célula para limitar la expresión de un producto de gen en un tipo de célula específico. Esto es particularmente útil, por ejemplo, cuando un producto de gen citotóxico, inmunomodulador, o antigénico de tumor que se produce en una célula de tumor con el fin de facilitar su destrucción. Además de utilizar los promotores específicos de tejido, la administración local de los virus de la invención puede resultar en expresión y efecto localizado.

25 Ejemplos de promotores específicos de no tejido que se pueden utilizar en la invención incluyen el promotor Citomegalovirus temprano (CMV) (Patente Estadounidense No. 4,168,062) y el promotor de Virus Rous Sarcoma (Norton et al., Molec. Cell. Biol. 5: 281, 1985). También, se pueden utilizar los promotores HSV, tal como los promotores HSV-1 IE y IE 4/5.

30 Ejemplos de promotores específicos de tejido que se pueden utilizar en la invención incluyen, por ejemplo, el promotor de antígeno específico de próstata (PSA), que es específico para las células de la próstata; el promotor de la desmina, que es específico para células de músculo (Li et al., Gene 78:243, 1989; Li et al., J. Biol. Chem. 266:6562, 1991; Li et al., J. Biol. Chem. 268:10403, 1993); el promotor enolasa, que es específico para las neuronas (Forss-Petter et al., J. Neuroscience Res. 16(1):141-156, 1986); el promotor β -globina, que es específico para células eritroides (Townes et al., EMBO J. 4:1715,1985); el promotor tau-globina, que también es específico para células eritroides (Brinster et al., Nature 283:499, 1980); el promotor de la hormona de crecimiento, que es específico para células pituitarias (Behringer et al., Genes Dev. 2:453, 1988); el promotor de insulina, que es específico para células β pancreáticas (Selden et al., Nature 321:545, 1986); el promotor de proteína ácida fibrilar glial, que es específico para astrocitos (Brenner et al., J. Neurosci. 14:1030, 1994); el promotor hidroxilasa tirosina, que es específico para neuronas catecolaminérgicas (Kim et al., J. Biol. Chem. 268:15689, 1993); el promotor de proteína precursora amiloide, que es específico para neuronas (Salbaum et al., EMBO J. 7:2807, 1988); el promotor de β -hidroxilasa dopamina, que es específico para neuronas adrenérgicas y no adrenérgica (Hoyle et al., J. Neurosci. 14:2455, 1994); el promotor hidrolasa triptofan, que es específico para serotonina/ células de glándula pineal (Boularand et al., J. Biol. Chem. 270:3757, 1995); el promotor acetiltransferasa colina, que es específico para neuronas colinérgicas (Hersh et al., J. Neurochem. 61:306, 1993); el promotor descarboxilasa de aminoácido L aromático (AADC), que es específico para células del tipo catecolaminérgico/5-HT/D (Thai et al., Mol. Brain Res. 17:227, 1993); el promotor proencefalina, que es específico para células del epidídimo neuronales/espermatogénicas (Borsook et al., Mol. Endocrinol. 6:1502, 1992); el promotor reg (proteína de cálculo pancreático), que es específico para tumores de colon y rectal, y células de páncreas y riñón (Watanabe et al., J. Biol. Chem. 265:7432, 1990); y el promotor de péptido relaciona con la hormona paratiroide (PTHrP), que es específico para tumores de hígado y ciego, y neurilemoma, células suprarrenales, de páncreas y riñón (Campos et al., Mol. Rnfovtinol. 6:1642, 1992).

50 Ejemplos de promotores que funcionan específicamente en células de tumor incluyen el promotor estromelisin 3, que es específico para las células de cáncer de mama (Basset et al., Nature 348:699, 1990); el promotor A de proteína de tensoactivo, que es específico para células de cáncer de pulmón macrocítico (Smith et al., Hum. Gene Ther. 5:29-35, 1994); el promotor de inhibidor de leucoproteasa secretora (SLPI), que es específico para los carcinomas que expresan SLPI (Garver et al., Gene Ther. 1:46-50, 1994); el promotor tirosinasa, que es específico para células de melanoma (Vile et al., Gene Therapy 1:307, 1994; WO 94/16557; WO 93/GB1730); el promotor grp78/BiP inducible por tensión, que es específico para células de fibrosarcoma/tumorigénicas (Gazit et al., Cáncer Res. 55(8):1660, 1995); el mejorador de adiposa AP2, que es específico para adipocitos (Graves, J. Cell. Biochem. 49:219, 1992); el promotor de transtiretina antitripsina α -1, que es específico para hepatocitos (Grayson et al.,

Science 239: 786, 1988); el promotor interleucina-10, que es específico para células multiformes de glioblastoma (Nitta et al., Brain Res. 649: 122, 1994); el promotor c-erbB-2, que es específico para células de pulmón macrocítico, pancreáticas, de mama, gástricas y de ovario (Harris et al., Gene Ther. 1:170, 1994); el promotor 27 de proteína α -B-cristalina/choque de calor, que es específico para células de tumor de cerebro (Aoyama et al., Int. J. Cancer 55:760, 1993); el promotor del factor de crecimiento de fibroblasto básico, que es específico para células de glioma y meningioma (Shibata et al., Growth Fact. 4:277, 1991); el promotor del factor de receptor de crecimiento epidérmico, que es específico para carcinoma epidermoide, glioma, y células de tumor de mama (Ishii et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90:282, 1993); el promotor de glucoproteína similar a mucina (DF3, MUC1), que es específico para células de carcinoma de mama (Abe et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90:282, 1993); el promotor mts1, que es específico para tumores metastásicos (Tulchinsky et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89:9146, 1992); el promotor NSE, que es específico para células de cáncer de pulmón microcítico (Forss-Petter et al., Neuron 5:187, 1990); el promotor del receptor somatostatina, que es específico para células de cáncer de pulmón microcítico (Bombardieri et al., Eur. J. Cancer 31A:184,1995; Koh et al., Int. J. Cancer 60:843, 1995); los promotores c-erbB-3 y c-erbB- 2, que son específicos para células de cáncer de mama (Quin et al., Histopathology 25:247, 1994); el promotor c-erbB4, que es específico para células de cáncer gástrico y de mama (Rajkumar et al., Breast Cancer Res. Trends 29:3, 1994); el promotor tiroglobulina, que es específico para células de carcinoma de tiroides (Mariotti et al., J. Clin. Endocrinol. Meth. 80:468, 1995); el promotor α -fetoproteína, que es específico para células de hepatoma (Zuibel et al., J. Cell. Phys. 162:36, 1995); el promotor villina, que es específico para células de cáncer gástrico (Osborn et al., Virchows Arch. A. Pathol. Anat. Histopathol. 413: 303, 1988); y el promotor de albúmina, que es específico para células de hepatoma (Huber, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 88: 8099, 1991).

Como se observó anteriormente, se pueden utilizar los virus de la invención en métodos in vivo, por ejemplo, para matar una célula y/o para introducir un producto de gen terapéutico dentro de la célula. Para llevar a cabo estos métodos, los virus de la invención se pueden administrar mediante cualquier ruta convencional utilizada en la medicina. Por ejemplo, un virus de la invención se puede administrar directamente en un tejido en el que se desea un efecto, por ejemplo, muerte de célula y/o expresión terapéutica del gen, por ejemplo, mediante inyección directa o mediante métodos quirúrgicos (por ejemplo, inyección estereotáctica en un tumor de cerebro; Pellegrino et al., Methods in Psychobiology (Academic Press, New York, New York, 67-90, 1971)). Un método adicional que se puede utilizar para administrar los vectores en el cerebro es el método de convección descrito por Bobo et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 91:2076-2080, 1994) y Morrison et al. (Am. J. Physiol. 266:292-305, 1994). En el caso de tratamiento de tumor, como una alternativa para dirigir la inyección de tumor, se puede llevar a cabo cirugía para eliminar el tumor, y los vectores de la invención inoculados en el lecho de tumor eliminado para asegurar la destrucción de cualquiera de las células de tumor restantes. Alternativamente, los vectores se pueden administrar por medio de una ruta parenteral, por ejemplo, mediante una ruta intravenosa, intraarterial, intracerebroventricular, subcutánea, intraperitoneal, intradérmica, intraepidérmica, o intramuscular, o por medio de una superficie de mucosa, por ejemplo, una superficie ocular, intranasal, pulmonar, oral, intestinal, rectal, vaginal, o del tracto urinario.

Se puede utilizar en la invención cualquiera de un número de formulaciones bien conocidas para introducir los virus en células de mamífero, tal como humanos. (Ver, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences (18 edición), ed. A. Gennaro, 1990, Mack Publishing Co., Easton, PA.). Sin embargo, los virus se pueden diluir simplemente en una solución fisiológicamente aceptable, tal como solución salina estéril o solución salina regulada estéril, con o sin un adyuvante o portador.

La cantidad de virus que se va a administrar depende, por ejemplo, de la meta específica que se va a alcanzar, la resistencia de cualquier promotor utilizado en el virus, la afección del mamífero (por ejemplo, humano) destinado para la administración (por ejemplo, el peso, la edad, y salud general del mamífero), el modo de administración, y el tipo de formulación. En general, una dosis terapéuticamente o profilácticamente efectiva de, por ejemplo, de aproximadamente 10^1 a 10^{10} unidades formadoras de placa (pfu), por ejemplo, de aproximadamente 5×10^4 a 1×10^6 pfu, por ejemplo, de aproximadamente 1×10^5 a aproximadamente 4×10^5 pfu, aunque los rangos más efectivos pueden variar de anfitrión a anfitrión, como se puede determinar fácilmente por un experto en la técnica. También, se puede lograr la administración en una dosis única o repetida en intervalos, cuando se determina que es apropiado por parte de aquellos expertos en esta técnica.

Ahora se describe un ejemplo específico de virus de la invención, designado G47 Δ , que es un nuevo virus HSV-1, multimutado, competente para replicación, derivado de G207 mediante una eliminación dentro del gen α 47 no esencial (Mavromara-Nazos et al., J. Virol. 60:807-812, 1986). Debido a que los transcritos superpuestos que codifican ICP47 y US 11 (La Figura 2B), la eliminación en α 47 también pone el gen US11 tardío bajo el control del promotor α 47 temprano inmediato. Esto mejora las propiedades de crecimiento de los mutantes γ 34.5- al impedir la inactivación de la síntesis de proteína (Mohr et al., EMBO J. 15:4759-4766, 1996; He et al., J. Virol. 71:6049-6054, 1997; Cassady et al., J. Virol. 72:7005-7011, 1998; Cassady et al., J. Virol. 72: 8620-8626, 1998). No obstante, encontramos que el G47 Δ es tan seguro que G207, que está ahora en ensayos clínicos en humanos, cuando se inoculan dentro de los cerebros de ratones A/J en 2×10^6 pfu. Nosotros mostramos aquí que las células de melanoma

humanas infectadas con G47 Δ son más efectivas en la estimulación de sus linfocitos que infiltran tumores (TIL) emparejados que aquellos infectados con G207, ese G47 Δ muestra la replicación mejorada en células de tumor cultivadas, y ese G47 Δ es más eficaz que el G207 en inhibir el crecimiento de tumor en los modelos de tumor singeneico de ratón y de xenoinjertos humanos probados. Nuestros resultados muestran que el G47 Δ se puede utilizar para terapia de tumor. Los detalles adicionales del virus y sus propiedades se proporcionan como sigue.

Resultados Experimentales

Construcción y Replicación de G47 Δ

Se construye el G47 Δ al eliminar 312 pares base de G207 en la región U_S adyacente a TRS (Figura 2). Los análisis Southern blot de ADN G47 Δ confirman la presencia de una eliminación de 0.3 kilobase en el gen α 47 y una eliminación de 1 kilobase en el gen γ 34.5. R47 Δ , con la misma eliminación en el locus α 47, se genera a partir de R3616, el virus pariente de G207 que tiene una reductasa de ribonucleótido activa (Chou et al., Science 250:1262-1266, 1990).

Para investigar los efectos de la eliminación de α 47 en las propiedades de crecimiento de los mutantes deficientes de γ 34.5 (G207 y R3616), determinamos la producción de la progenie del virus luego de la infección de las estirpes celulares de tumor humano SK-N-SH (neuroblastoma), U87MG (glioma), U373MG (glioma), y SQ20B (carcinoma epidermoide de cabeza y cuello). Mediante 24 horas post-infección en un MOI bajo, el G47 Δ produce rendimientos mayores que el G207, que resulta en un incremento de aproximadamente 4 a 1000 veces el título (Figura 3). En un experimento de crecimiento de única etapa en células U87MG (MOI=2), el virus producido de G47 Δ es 12 veces mayor que con G207. El R47 Δ produce de forma similar títulos mayores que su R3616 progenitor en todas las estirpes celulares de tumor probadas; sin embargo, ni G47 Δ ni R47 Δ crecen así como también la cepa F parental tipo natural. Para determinar si las producciones de virus se afectan por la densidad celular, se siembran células Vero y SK-H-SH en densidad alta o normal (8×10^5 o 1.6×10^6 células/pozo), infectadas con la cepa F, G207, o G47 Δ en un MOI de 0.01, y se cosechan 48 horas post-infección. El G47 Δ produce una producción mayor en el cultivo de alta densidad, cuando se opone a G207, que tiene una producción reducida. La capacidad de generar altas producciones de G47 Δ en células Vero facilita la fabricación de estirpes de alto título para uso clínico.

Efecto Citopático de G47 Δ In Vitro

La actividad citolítica de G47 Δ in vitro se compara con aquella del G207 en varias estirpes celulares de tumor derivado de cresta neural. En las estirpes celulares humanas, el U87MG y los melanomas 624 y 888, las células de tumor muertas G47 Δ son significativamente más rápidas que G207 en un MOI bajo de 0.01 (Figura 4). En un MOI de 0.1, el G207 y G47 Δ mata todas las células dentro de 1-3 días de infección. El Neuro2a, una estirpe celular de neuroblastoma de murino, es resistente a la muerte mediante el G207 y G47 Δ en un MOI de 0.01. En un MOI de 0.1, G47 Δ es significativamente más eficiente en la destrucción de las células de tumor que el G207 (Figura 4), también se puede ver un efecto con células de neuroblastoma de ratón N18. Encontramos que las células de tumor de ratón son generalmente más resistentes a la replicación de G207 que las células de tumor humanas (Todo et al., Hum. Gene Ther. 10:2741-2755, 1999; Toda et al., Hum. Gene Ther. 10:385-393, 1999; Todo et al., Cáncer Res. 61:153-161, 2001).

Células Infectadas G47 Δ en Expresión MHC Clase I

El ICP47 inhibe la función de TAP en la translocación de péptidos a través del retículo endoplásmico en células humanas, pero no en células de ratón o rata (Ahn et al., EMBO J. 15:3247-3255, 1996; Tomazin et al., J. Virol. 72:2560-2563, 1998). Debido a que el G47 Δ carece de ICP47, las células infectadas deben tener niveles de expresión MHC clase I de células no infectadas. Examinamos la regulación por disminución MHC clase I en fibroblastos diploides humanos Detroit 551 utilizando análisis citométricos de flujo para el antígeno de linfocito humano clase I (HLA-1). En 48 horas post-infección, todas las células infectadas con HSV-1 que contienen un gen intacto α 47 (cepa F, G207, y R3616) muestran una reducción en la superficie celular MHC clase I, que resulta en aproximadamente 40% en niveles pico comparado con las células de control en las que se simula infección (Figuras 5A y 5B). En contraste, no existe regulación por disminución en las células infectadas G47 Δ (Figura 5A). En las células infectadas R47 Δ , la expresión MHC clase I permanece mayor que en la cepa F o las células infectadas R3616, pero se reduce comparado con G47 Δ (~75% de niveles pico en los que se simula infección). Los estudios en diferentes puntos de tiempo (6, 24, y 48 horas post-infección) revelan que las diferencias en la regulación por disminución MHC clase I entre el ICP47 que expresa (G207 y R3616) y células infectadas sin expresión (G47 Δ y R47 Δ) no llegan a ser evidentes sino hasta después de 6 horas post-infección (Figura 5B).

La infección de células de melanoma humano con G47Δ también resulta en mayores niveles de la expresión MHC clase I que con G207, aunque la exclusión de la regulación por disminución es parcial. En general, se observa un efecto mayor en las estirpes celulares con altos niveles basales de MHC clase I (938 y 1102) comparado con aquellos con bajos niveles de MHC clase I (624, 888, y 1383) (Figura 5C).

5 Células de Melanoma Humano Inyectadas G47Δ que Estimulan las Células T In Vitro

Se prueban tres estirpes celulares de melanoma humano por sus capacidades de estimular las líneas TIL emparejadas después de la infección G47Δ (888 y 1102 con TIL888 (Robbins et al., *Cáncer Res.* 54:3124-3126, 1994)), y 938 con TIL1413 (Kang et al., *J. Immunol.* 155:1343-1348, 1995). Las células de melanoma 1102 infectadas con G47Δ, con el nivel más alto de la expresión MHC clase I, originado por una mejor estimulación de células TIL comparado con células infectadas con G207, que resulta en 41 % más de secreción de IFN-γ (Figura 6). No existe esencialmente estimulación de esta misma línea TIL con células de melanoma 888 infectadas con G47Δ o G207, que tienen muy bajos niveles de la expresión MHC clase I. Las células de melanoma 938 infectadas con G47Δ- estimulan las células TIL1413, que originan un incremento en la secreción IFN-γ que no es estadísticamente significativa. Los resultados demuestran que la mayor expresión MHC clase I que puede resultar en G47Δ versus células infectadas con G207 puede mejorar la estimulación de célula T.

Eficacia Antineoplásica de G47Δ In Vivo

En un modelo de xenoinjerto humano, los ratones atímicos que tienen tumores de glioma U87MG subcutáneos establecidos (aproximadamente 6 mm en diámetro), inoculación intraneoplásica de G207 o G47Δ (106 pfu) seguido por una segunda inoculación 3 días después producen una reducción significativa en el crecimiento de tumor U87MG ($p < 0.05$ y $p < 0.001$ versus control en el día 24, respectivamente; prueba t para datos independientes; Figura 7). El tratamiento de G47Δ es significativamente más eficaz que el G207, que resulta en volúmenes de tumor promedio reducidos (Figura 7). Esto se refleja en la supervivencia prolongada de los animales y el número de 'curas' (regresión de tumor completa sin que vuelva a crecer el tumor durante un seguimiento de 3 meses) (Tabla 1). En la dosis probada, la supervivencia es significativamente prolongada en el grupo de tratamiento G207 ($p < 0.05$ versus simulado, prueba Wilcoxon), y a un grado aún mayor en los animales tratados con G47Δ ($p < 0.05$ versus G207, prueba Wilcoxon).

Tabla 1. Terapia de tumor subcutáneo mediante G47Δ

Tumor (Ratón)	Número de curado/ total de tratados		
	simulado	G207	G47Δ
U87MG (Atímico)	0/13	3/12	8/12*†
Neuro2a (A/J)	0/10	1/10	3/10

* $p < 0.05$ versus G207, † $p < 0.001$ versus simulado, prueba de Fisher.

La eficacia de G47Δ se prueba adicionalmente en un modelo de tumor de ratón inmunocompetente, subcutáneo, tumores de neuroblastoma Neuro2a pobremente inmunogénicos en ratones singeneicos A/J. Los tumores establecidos de aproximadamente 6 mm en diámetro se inoculan con simulados, G207, o G47Δ (106 pfu) en los días 0 y 3. De nuevo, aunque G207 y G47Δ originan una reducción significativa en el crecimiento de Neuro2a ($p < 0.05$ y $p < 0.001$ versus control en el día 15, respectivamente; prueba t para datos independientes), la eficacia de G47Δ es mayor que la de G207 (Figura 7). El análisis Kaplan-Meier demuestra que el G207 en esta dosis no extiende significativamente la supervivencia de los ratones A/J que llevan el tumor Neuro2a, mientras que el G47Δ prolonga significativamente la supervivencia de los animales comparado con el simulado y G207 ($p < 0.01$ y $p < 0.05$, respectivamente, prueba Wilcoxon). En un periodo de seguimiento de 3.5 meses, existe un número incrementado de 'curas' entre los ratones tratados con G47Δ (no estadísticamente significativo, prueba de Fisher; Tabla 1).

40 Seguridad de G47Δ con inoculación intracerebral

Para evaluar la toxicidad de G47 Δ en el cerebro, se inoculan ratones A/J intracerebralmente con simulados, cepa F (2×10^3 pfu), G207 (2×10^6 pfu), o G47 (2×10^6 pfu). Esta dosis es la dosis mayor que se puede obtener para G207 en el volumen inyectado. Cada ratón se monitorea diariamente para manifestaciones clínicas durante 3 semanas. Todos los 8 ratones inoculados con el simulado sobreviven sin cualesquier manifestaciones anormales, mientras que todos los 10 ratones inoculados con la cepa F se deterioran rápidamente y llegan a estar moribundos 7 días de inoculación. Todos los 8 ratones inoculados con G207 y los 10 ratones inoculados con G47 Δ sobreviven. Dos de los ratones inoculados G207 y 1 ratón inoculado con G47 Δ manifiesta ligera curvatura temporalmente (3-6 días post-inoculación) o una respuesta ligeramente lenta al estímulo externo. Esto muestra que el G47 Δ es tan seguro como el G207 cuando se inocula en el cerebro de los ratones A/J en esta dosis.

Se obtienen los resultados descritos anteriormente utilizando los siguientes Materiales y Métodos.

Materiales y Métodos

Células

Se compran estirpes celulares vero (riñón de mono verde Africano), SK-N-SH (neuroblastoma humano), U87MG (glioma humano), U373MG (glioma humano), Neuro2a (neuroblastoma de murino), y Detroit 551 (fibroblasto humano diploide) del American Type Culture Collection (Rockville, MD). Las células SQ20B (carcinoma epidermoide de cabeza y cuello) proporcionadas por Dr. R. Weichselbaum (University of Chicago, Chicago, IL). Se proporcionan células de neuroblastoma de murino N18 por Dr. K. Ikeda (Tokyo Institute of Psychiatry, Tokio, Japón). Las estirpes de melanoma humanas 624, 888, 938, 1102, y 1383, y las estirpes de célula T humana TIL888 y TIL1413, se proporcionan por Dr. J. Wunderlich (NIH, Bethesda, MD). Se mantienen todas las células de tumor en medio Eagle modificado de Dulbecco complementado con 10% de suero de becerro fetal (FCS), 2 mM de glutamina, penicilina (100 U/ml), estreptomycin (100 μ g/ml), y 2.5 μ g/ml de Fungizona. Las células T humanas se mantienen en medio AIM-V (Gibco BRL, Life Technologies, Rockville, MD) complementado con 10% de suero humano (tipo AB, Rh+; Valley Biomedical Products, Winchester, VA), interleucina 2 (600 unidades internacionales (IU)/ml, Chiron Corporation, Emeryville, CA), penicilina (50 U/ml), y 1.25 μ g/ml de Fungizona.

Generación de G47 Δ

El plásmido pIE12 contiene un fragmento BamHI-EcoRI de 1818 pares base del fragmento BamHI x HSV-1, que abarca la región que codifica el ICP47 (Johnson et al., J. Virol. 68:6347-6362, 1994). Un fragmento de 312 pares base que contiene la región que codifica ICP47 entre los sitios BstEII y EcoNI se elimina de pIE12 para crear pIE12 Δ (Figura 2C). Se siembran células vero en platos de 6 pozos en una densidad de $1-2 \times 10^5$ células por pozo. Se desarrollan transfecciones utilizando un rango de concentraciones de ADN de 1 a 3 μ g, que incluyen una mezcla de 1:1:1 de ADN G207 (Mineta et al., Nat. Med. 1:938-943, 1995), pIE12 (intacto), y el pIE12 Δ se divide con BamHI y XhoI, con 8 μ l de LipofectAMINE™ (Life Technologies), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La progenie vírica de la transfección luego se pasa dos veces en células SK-N-SH enriquecidas recombinantes que contienen una eliminación en ICP47 como sigue. Las células SK-N-SH se siembran en una densidad de 5×10^6 células por plato de 10 cm, se infectan al siguiente día en un rango de MOI de 0.01 a 1 pfu por célula, y se cosechan a 48 horas post-infección. Este proceso luego se repite. La eliminación en pIE12 Δ se designa para generar una mutación supresora de segundo sitio de γ 34.5 en el virus, y que permite así el crecimiento de recombinantes exitosos en las células SK-N-SH (Mohr et al., EMBO J. 15:4759-4766, 1996). Las placas individuales de estirpes enriquecidas con SK-N-SH se purifican en placa en células Vero bajo superposiciones de agarosa y se detectan para la presencia de la eliminación en ICP47 mediante Southern blotting. Se prepara una estirpe desde una placa individual que es homogénea para la eliminación de ICP47 y se designa como G47 Δ , el R47 Δ se construye de forma similar, excepto R3616 (Chou et al., Science 250:1262-1266, 1990). Se utiliza ADN en lugar de ADN G207 (R3616 se proporciona por Dr. B. Roizman, University of Chicago, Chicago, IL). Se desarrolla titulación de virus como se describió previamente (Miyatake et al., J. Virol. 71:5124-5132, 1997).

Estudios de Producción de Virus

Se siembran células en placas de 6 pozos a 5×10^5 , 8×10^5 , o 1.6×10^6 células por pozo. Se infectan pozos en duplicado y en triplicado con los virus 6-8 horas después de siembra en un MOI de 0.01. En 24 o 48 horas post-infección, se pelan las células en el medio y se lisan mediante tres ciclos de congelamiento-descongelamiento. El virus de progenie se titula como de describió previamente con una modificación (Miyatake et al., J. Virol. 71:5124-5132, 1997). En resumen, se ponen en placas células vero en placas de 6 pozos a 8×10^5 células/pozo. Después de 4-8 horas de incubación a 37°C, las células se infectan en 1 ml de medio de crecimiento a 37°C durante la noche, después de lo cual se agrega 1 ml de medio que contiene 0.4% de IgG humano (ICN Pharmaceuticals). Se incuban pozos a 37°C durante otros 2 días, y el número de placas se cuenta después de teñido con azul de metileno (0.5% p/v en 70% de metanol).

Estudios de Citotoxicidad In Vitro

- 5 Se desarrollan estudios de citotoxicidad In vitro como se describió previamente (Todo et al., Hum. Gene Ther. 10:2741-2755, 1999), con una modificación de las células de melanoma humano, que se hacen crecer en medio que contiene 10% de FCS. Se cuenta el número de células que sobreviven diariamente con un contador Coulter (Beckman Coulter, Fullerton, CA) y se expresa como un porcentaje de los controles infectados con simulados.

Análisis Citométrico de Flujo

- 10 Se colocan en placas las células en placas de 6 pozos a 1×10^6 células/pozo y se infectan con el virus (MOI = 3) 24 horas después de siembra. Las células se incuban en la presencia de ganciclovir (200 ng/ml) a 39.5°C durante 6, 24, o 48 horas, se cosechan mediante tripsinización, y se lavan una vez con 2 ml de PBS. El G207 y G47 Δ contiene mutaciones sensibles a temperatura e ICP4, ya que ellos pueden replicar a 37°C, pero no a 39.5°C (Mineta et al., Nat. Med. 1:938-943, 1995. Aproximadamente luego se incuban 5×10^5 células para análisis citométricos de flujo utilizando el antígeno HLA clase U anti-humano conjugado con FITC (clon W6/32, Sigma, St. Louis, MO) y se desarrolla como se describió previamente.

Ensayos de Estimulación de Célula T Humana

- 15 Se colocan en placas células de melanoma humano (888, 938, o 1102) en placas de 6 pozos a 5×10^5 células/pozo, y se infectan con G207 o G47 Δ (MOI = 3), o sin virus (simulados) 24 horas después de siembra. Las células se incuban en medio de crecimiento que contiene 10% de FCS y ganciclovir (200 ng/ml) a 39.5°C durante 3 horas (888) o 6 horas (938 y 1102). Las células luego se cosechan mediante pelado, y se utiliza una porción para conteo celular.
- 20 Las células de melanoma infectadas (1×10^5) luego se co-cultivan con un número igual de células T humanas que responden en 200 μ l de medio AIM-V que contiene ganciclovir (200 ng/ml) en una placa de fondo plano de 96 pozos. Se co-cultivan los melanomas 888 y 1102 con células TIL888, y el melanoma 938 se cultiva con células TIL1413. Las líneas TIL 888 y 1413 reconocen la tirosinasa, un antígeno de melanoma, en una forma restringida HLA-A24 (Robbins et al., Cáncer Res. 54:3124-3126, 1994; Kang et al., J. Immunol. 155:1343-1348, 1995). Después de 18 horas de incubación a 37°C, la placa se centrifuga a 800 g durante 10 minutos, y se recolecta el medio acondicionado.
- 25 Se miden las concentraciones de IFN- γ mediante ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima utilizando un equipo ELISA IFN- γ humano (Endogen, Woburn, MA). Las mediciones IFN- γ en células TIL sin las células estimuladoras se considera los niveles de liberación base y se utilizan para calcular el incremento de la secreción de IFN- γ estimulada por células TIL.

Estudios de Animal

- 30 Se compran ratones A/J hembra y ratones atímicos de seis semanas de edad (BALB/c nu/ nu) del Instituto Nacional de Cáncer (Frederick, MD), y se colocan en jaulas en grupos de cuatro o menos. Se desarrolla terapia de tumor subcutánea como se describió previamente (Todo et al., Hum. Gene Ther. 10:2741-2755, 1999; Todo et al., Cáncer Res. 61:153-161, 2001).

Estudios de Toxicidad de Inoculación Intracerebral

- 35 Se inyecta simulados (PBS que contiene 10% de glicerol), cepa F (2×10^3 pfu), G207 (2×10^6 pfu), o G47 Δ (2×10^6 pfu) en un volumen de 5 μ l durante 5 minutos en el hemisferio derecho de los cerebros de ratones A/J hembra de 6 semanas de edad (n=8, 10, 8, y 10, respectivamente) utilizando un marco estereotáctico KOPF. Las jaulas luego se blindan y los ratones se monitorean diariamente para manifestaciones clínicas durante 3 semanas.

REIVINDICACIONES

1. Un virus del herpes simple que comprende una mutación de inactivación en el locus ICP47 del virus, en donde dicha mutación ocurre entre el sitio BstEII y el sitio EcoNI del fragmento BamH1 que abarca la región ICP47, en donde la mutación coloca el US11 bajo el control del promotor temprano inmediato ICP47.
- 5 2. El virus de la reivindicación 1, en donde la mutación es una eliminación.
3. El virus de las reivindicaciones 1 y 2, que comprende adicionalmente mutaciones adicionales, preferiblemente seleccionadas de una mutación de inactivación en el locus de determinación de neurovirulencia γ 34.5 y el locus ICP6.
- 10 4. El virus de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende adicionalmente una mutación de inactivación en el locus de neurovirulencia γ 34.5 de dicho virus y una mutación de inactivación en el locus ICP6 de dicho virus.
5. Un virus del herpes simple que comprende una mutación de inactivación en el gen γ 34.5 y una mutación que resulta en la expresión temprana de US11 en la ausencia de una mutación de inactivación ICP47 en el fragmento BamH1 que abarca la región ICP47.
- 15 6. El virus de la reivindicación 5, en donde la expresión temprana de US11 se logra al insertar un promotor que actúa temprano en la dirección 5' del gen US11.
7. El virus de la reivindicación 6, en donde el promotor que actúa temprano se selecciona de un promotor heterólogo que es activo antes del inicio de la replicación de ADN en el genoma HSV-1, preferiblemente el promotor CMV IE, promotor HSV-1 IE y promotor HSV- 1 E.
- 20 8. El virus de la reivindicación 5 a 7, en donde dicho virus comprende una mutación que resulta en la regulación por disminución de la expresión ICP47, en la ausencia de una mutación en dicho fragmento BamHI.
9. El virus de la reivindicación 8, en donde dicha regulación por disminución de la expresión ICP47 se debe a una eliminación en, o inactivación de, el promotor ICP47.
10. El virus de la reivindicación 9, en donde dicho virus codifica ICP47 que se fusiona con un péptido que evita la expresión funcional de ICP47.
- 25 11. El virus de acuerdo con la reivindicación 6, en donde un promotor que actúa temprano se inserta en la dirección 5' del gen US11 y ICP47 que codifica las secuencias se fusionan con las secuencias que codifican una secuencia veneno, preferiblemente una secuencia PEST.
- 30 12. El virus de acuerdo con la reivindicación 11, en donde el promotor que actúa temprano se selecciona de un promotor heterólogo que se activa antes del inicio de la replicación de ADN en el genoma HSV-1, preferiblemente el promotor CMV IE, promotor HSV-1 IE y promotor HSV-1 E.
13. El virus de las reivindicaciones 8 a 12, en donde dicha regulación por disminución de la expresión ICP47 se debe a una eliminación en, o inactivación de, el promotor ICP47.
14. El virus de las reivindicaciones 5 a 13, en donde dicho virus codifica ICP47 que se fusiona con un péptido que evita la expresión funcional de ICP47.
- 35 15. El virus de la reivindicación 5 a 14, que comprende adicionalmente una mutación adicional para evitar la reversión tipo natural.
16. El virus de las reivindicaciones 5 a 15, en donde dicha mutación adicional está en el locus ICP6.
17. El virus de las reivindicaciones 1 a 16, que comprende adicionalmente las secuencias que codifican un producto de gen heterólogo.
- 40 18. El virus de la reivindicación 17, en donde dicho producto de gen heterólogo comprende un antígeno de vacuna o una proteína inmunomoduladora, preferiblemente citoquinas.

19. El virus de las reivindicaciones 1 a 18, en donde dicho virus del herpes simple es un virus del herpes simple-1.
20. Una composición farmacéutica que comprende el virus de las reivindicaciones 1 a 19 y un portador, adyuvante o diluyente farmacéuticamente aceptable.
21. El virus de las reivindicaciones 1 a 19 para uso en un método para tratar el cáncer en un paciente.
- 5 22. El virus de las reivindicaciones 1 a 19 para uso en un método para inmunizar un paciente contra una enfermedad infecciosa, cáncer, o una enfermedad autoinmune.
23. El virus de las reivindicaciones 1 a 19 para uso en un método para inducir una respuesta inmune sistémica al cáncer en un paciente, dicho método comprende administrar a dicho paciente tal virus.
- 10 24. El virus para uso en un método de la reivindicación 21 a 23, en donde dicho virus de herpes se administra a un tumor de dicho paciente.
25. El virus para uso en un método de la reivindicación 21 a 23, en donde dicho paciente tiene o está en riesgo de desarrollar cáncer metastásico.

FIG. 1A

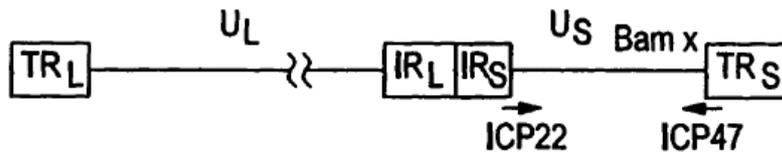


FIG. 1B

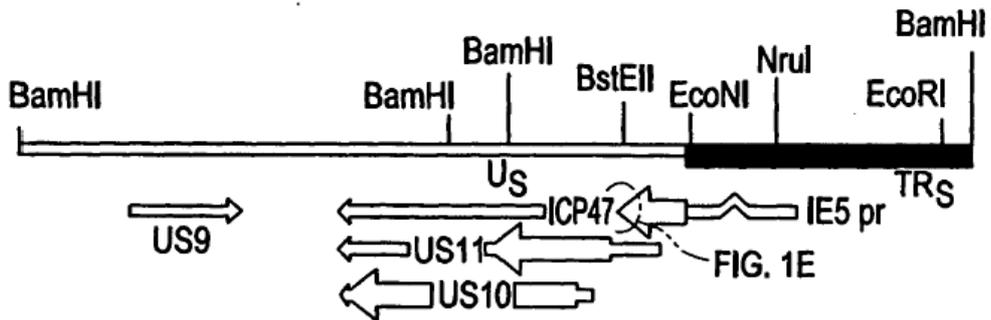


FIG. 1C

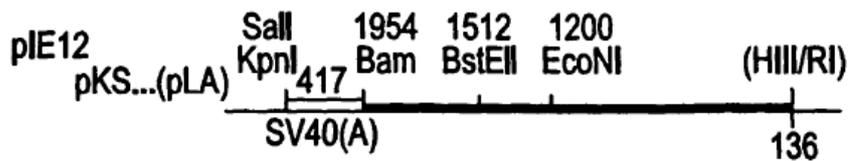


FIG. 1D

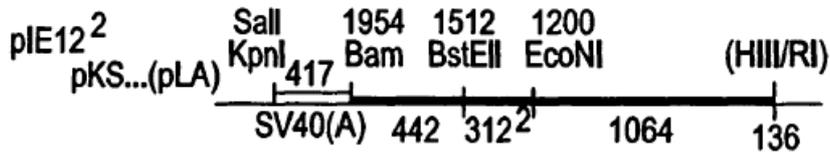


FIG. 1E

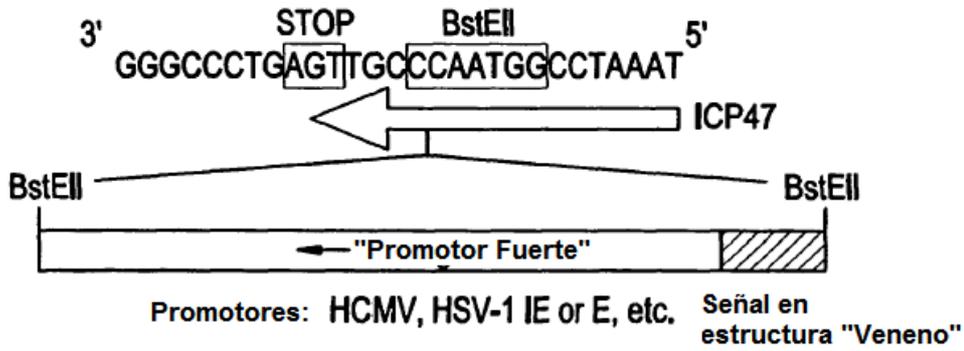


FIG. 2A

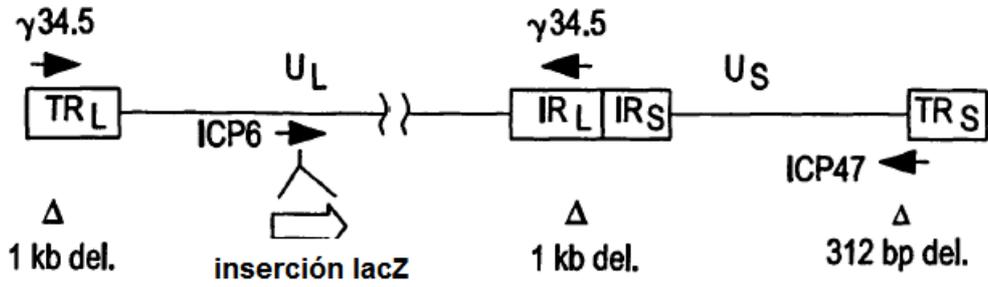


FIG. 2B

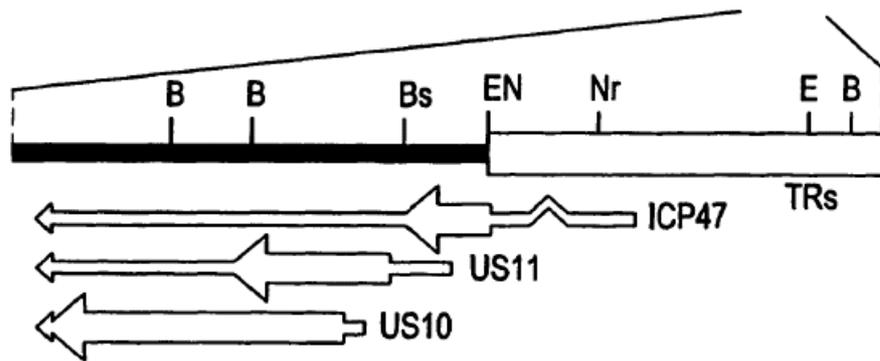


FIG. 2C

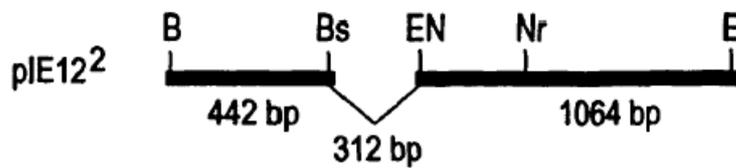


FIG. 3

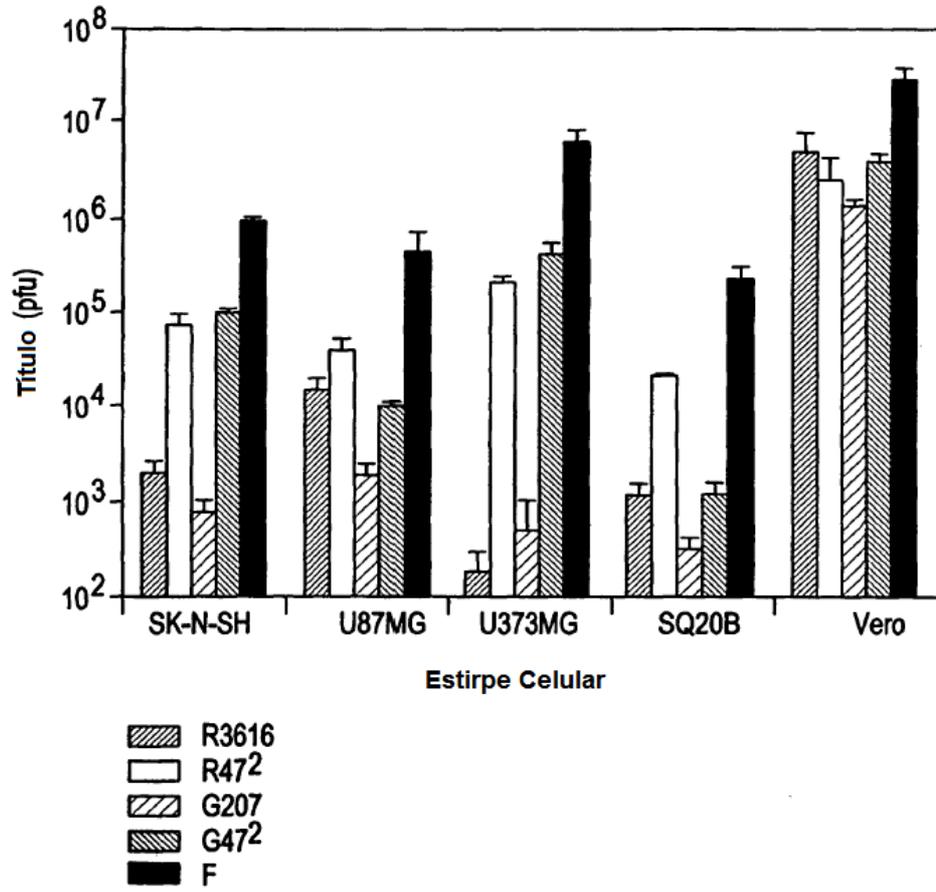


FIG. 4

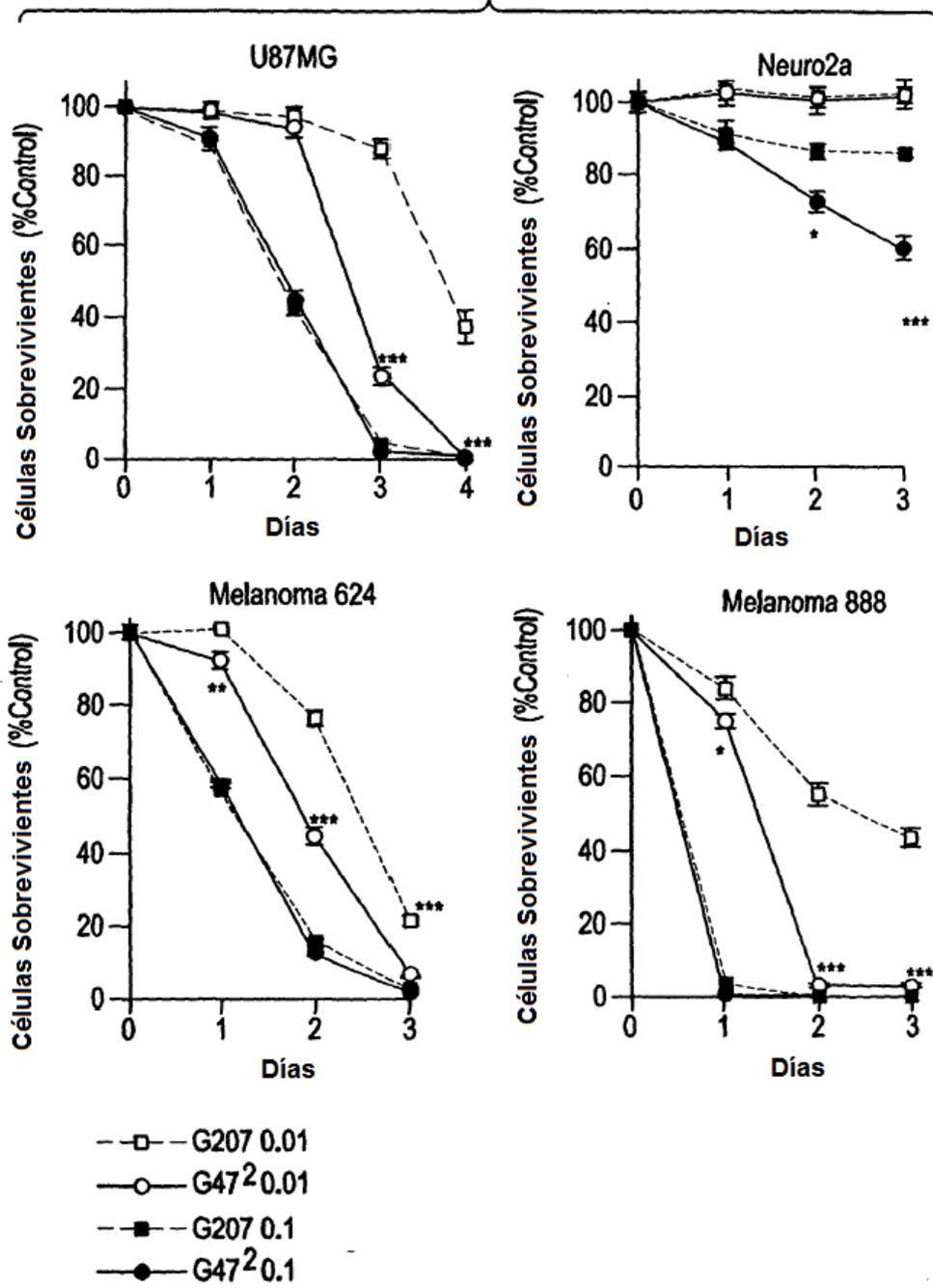


FIG. 5A

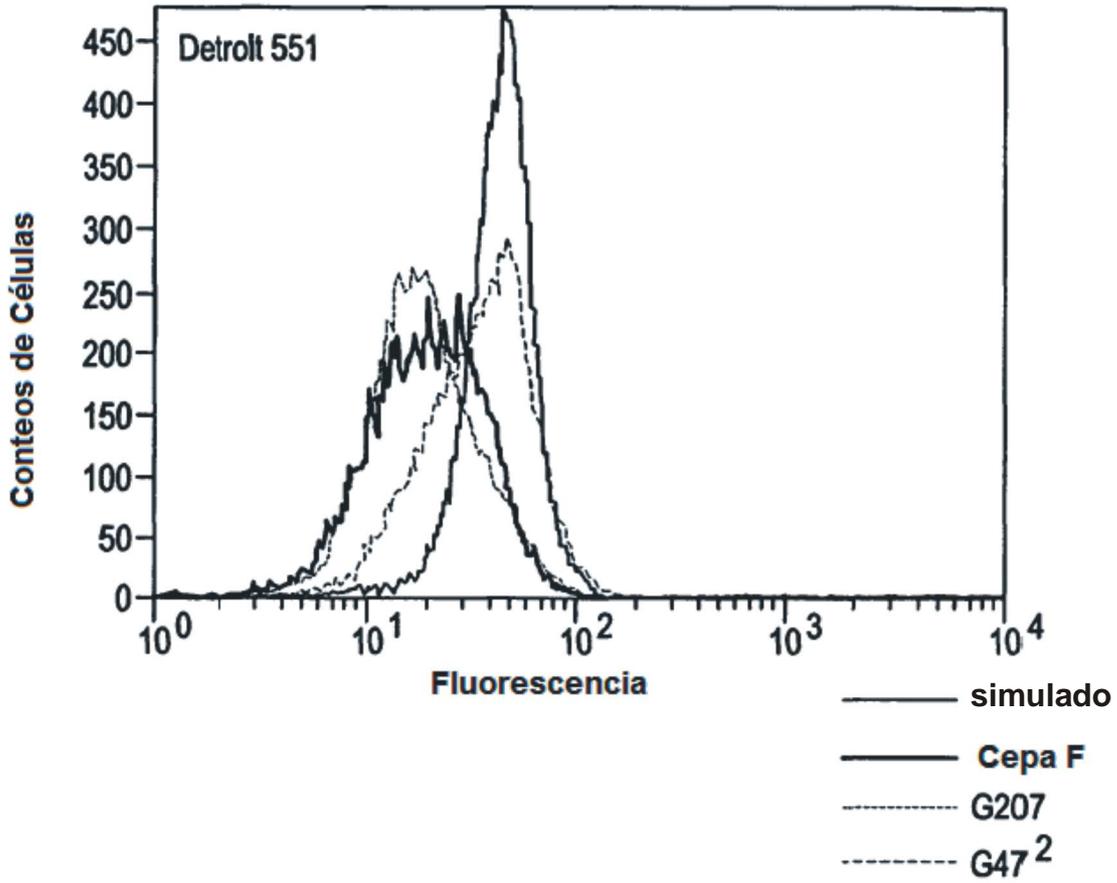


FIG. 5B

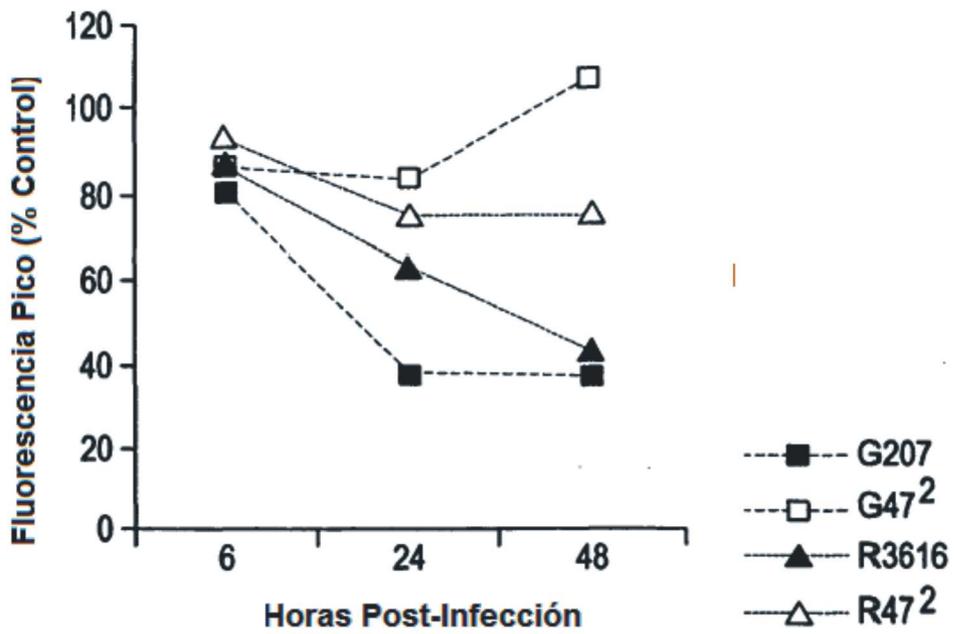


FIG. 5C

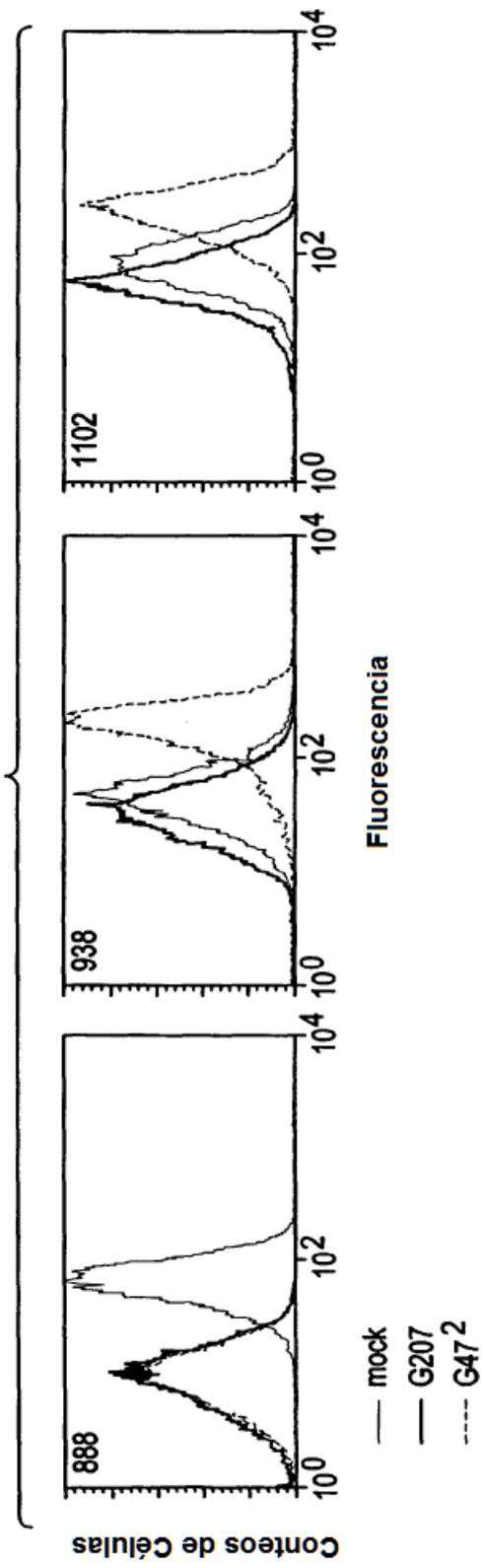


FIG. 6

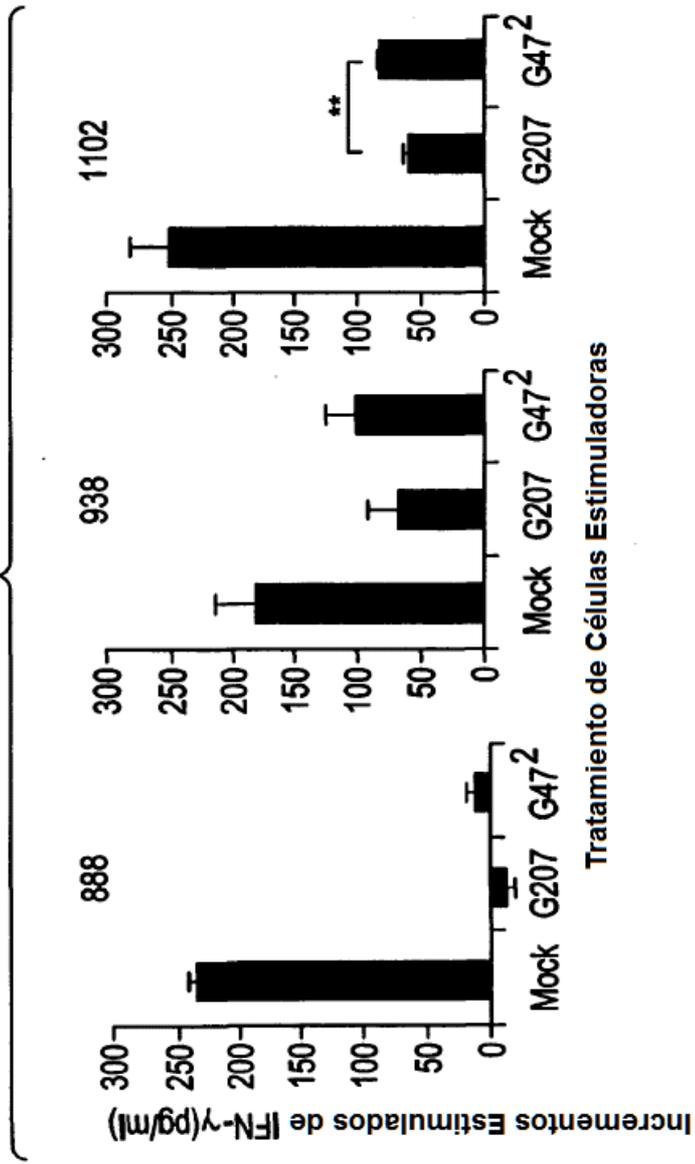


FIG. 7

