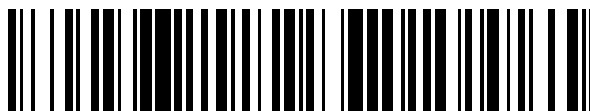


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 444 699**

51 Int. Cl.:

A61K 35/76 (2006.01)

C12N 7/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.08.2003 E 08167984 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.10.2013 EP 2044948**

54 Título: **Virus vaccinia para uso en el tratamiento del cáncer**

30 Prioridad:

12.08.2002 US 402857

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

26.02.2014

73 Titular/es:

**JENNEREX, INC. (100.0%)
One Market Street Spear Tower Suite 2260
San Francisco, CA 94105, US**

72 Inventor/es:

**KIRN, DAVID y
THORNE, STEVE H.**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 444 699 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Virus vaccinia para uso en el tratamiento del cáncer

5 **1. Campo de la invención**

La presente invención se refiere generalmente a los campos de la oncología y la virología. De forma más concreta, se refiere a los poxvirus, que incluyen de manera específica los virus vaccinia, que comprenden una o más mutaciones que los vuelven particularmente adecuados para el tratamiento del cáncer

10

2. Descripción de la técnica relacionada

La homeostasia del tejido normal es un proceso muy regulado de proliferación celular y de muerte celular. Puede aparecer un desequilibrio tanto de la proliferación celular como de la muerte celular en un estado canceroso (Solyanik y col., 1995; Stokke y col., 1997; Mumby y Walter, 1991; Natoli y col., 1998; Magi-Galluzzi y col., 1998). *Por ejemplo*, el cáncer de cuello de útero, de riñón, de pulmón, de páncreas colorrectal y de cerebro son unos pocos ejemplos de los muchos cánceres que pueden aparecer (Erlandsson, 1998; Kolmel, 1998; Mangray y King, 1998; Gertig y Hunter, 1997; Mougín y col., 1998). De hecho, la incidencia del cáncer es tan elevada que se pueden atribuir al cáncer 500.000 muertes cada año solo en los Estados Unidos.

20

El mantenimiento de la proliferación celular y de la muerte celular está regulado al menos parcialmente por protooncogenes y supresores tumorales. Un protooncogén o supresor tumoral puede codificar proteínas que inducen la proliferación celular (*por ejemplo*, sis, erbB, src, ras y myc), proteínas que inhiben la proliferación celular (*por ejemplo*, Rb, p16, p19, p21, p53, NF1 y WT1) o proteínas que regulan la muerte celular programada (*por ejemplo*, bcl-2) (Ochi y col., 1998; Johnson y Hamdy, 1998; Liebermann y col., 1998). Sin embargo, las redistribuciones o mutaciones genéticas de estos protooncogenes y supresores tumorales dan como resultado la conversión de un protooncogén en un potente oncogén productor de cáncer o convertir un supresor tumoral en un polipéptido inactivo. A menudo, una única mutación puntual es suficiente para conseguir la transformación. *Por ejemplo*, una mutación puntual en la proteína p53 supresora del tumor da como resultado la pérdida completa de la función de p53 natural (Vogelstein y Kinzler, 1992).

25

30

Actualmente, existen pocas opciones eficaces para el tratamiento de muchos tipos de cánceres. El curso de tratamiento para un individuo dado depende del diagnóstico, la etapa hasta la cual se ha desarrollado la enfermedad y factores tales como la edad, sexo, y salud general del paciente. Las opciones más convencionales de tratamiento del cáncer son la cirugía, radioterapia y quimioterapia. La cirugía juega un papel central en el diagnóstico y el tratamiento del cáncer. Normalmente, se requiere una solución quirúrgica para la biopsia y para eliminar el crecimiento del cáncer. Sin embargo, si el cáncer ha metastatizado y se ha diseminado, es poco probable que dé como resultado una cura y debe tomarse una solución alternativa (Mayer, 1998; Ohara, 1998; Ho y col., 1998). La radioterapia implica una puntería precisa de radiación de alta energía para destruir las células cancerosas y muy probablemente cirugía, que es principalmente eficaz en el tratamiento de células cancerosas localizadas no metastásicas. Los efectos secundarios de la radioterapia incluyen la irritación de la piel, dificultades para tragar, sequedad de boca, náuseas, pérdida de pelo y pérdida de energía (Curran, 1998; Brizel, 1998).

35

40

La quimioterapia, el tratamiento del cáncer con fármacos anticancerosos, es otro modo de tratamiento del cáncer. La eficacia de un tratamiento farmacológico anticanceroso dado está a menudo limitada por la dificultad de conseguir la liberación del fármaco a través de tumores sólidos (el-Kareh y Secomb, 1997). Las estrategias quimioterapéuticas se basan en el crecimiento del tejido tumoral, donde el fármaco anticanceroso se dirige a las células cancerosas en rápida división. La mayoría de soluciones de quimioterapia incluyen la combinación de más de un fármaco anticanceroso, lo que ha demostrado aumentar la velocidad de respuesta de una amplia variedad de cánceres (Patente de los Estados Unidos 5. 824. 348; Patente de los Estados Unidos 5. 633. 016 y Patente de los Estados Unidos 5. 798. 339). Un efecto secundario importante mayor de los fármacos en quimioterapia es que afectan células de tejido normal, siendo las células más posiblemente afectadas aquellas que se dividen rápidamente en algunos casos (*por ejemplo*, médula ósea, tracto gastrointestinal, sistema reproductor y folículos pilosos). Otros efectos secundarios tóxicos de los fármacos en quimioterapia pueden incluir aftas en la boca, dificultad al tragar, sequedad de boca, náuseas, diarrea, vómitos, fatiga, sangrado, pérdida de pelo e infección.

45

50

55

La inmunoterapia, un área en rápida evolución en la investigación del cáncer, es otra opción más para el tratamiento de determinados tipos de cáncer. Teóricamente, el sistema inmune puede ser estimulado para identificar células tumorales como dianas y dirigirlas hacia la destrucción. Desafortunadamente, la respuesta no es normalmente suficiente para evitar el crecimiento de la mayoría de los tumores. Sin embargo, recientemente ha aumentado el interés en el área de la inmunoterapia por desarrollar métodos que aumenten o suplementen el mecanismo de defensa natural del sistema inmune. Los ejemplos de inmunoterapias actualmente en investigación o en uso son adyuvantes inmunes (*por ejemplo*, *Mycobacterium bovis*, *Plasmodium falciparum*, dinitroclorobenceno y compuestos aromáticos) (Patente de los Estados Unidos 5. 801. 005; Patente de los Estados Unidos 5. 739. 169; Hui y Hashimoto, 1998; Christodoulides y col., 1998), tratamiento de citoquinas (*por ejemplo*, interferones (IL-1, GM-CSF y TNF) (Bukowski y col., 1998; Davidson y col., 1998; Hellstrand y col., 1998), y terapia génica (*por ejemplo*, TNF, IL-1,

60

65

IL-2, p53) (Qin y col., 1998; Austin-Ward y Villaseca, 1998; Patente de los Estados Unidos 5. 830. 880 y Patente de los Estados Unidos 5. 846. 945) y anticuerpos monoclonales (*por ejemplo*, antigangliósidos GM2, anti-HER-2, anti-p185) (Pietras y col., 1998; Hanibuchi y col., 1998; Patente de los Estados Unidos 5. 824. 311). Dichos métodos, aunque se muestran prometedores, han demostrado un éxito limitado.

5 Los virus oncolíticos selectivos para la replicación se muestran prometedores para el tratamiento del cáncer (Kirn y col., 2001). Estos virus pueden producir la muerte de las células tumorales a través de efectos oncolíticos directos dependientes de la replicación y/o efectos oncolíticos dependientes de la expresión del gen vírico (Kim y col., 2001). Además, los virus son capaces de aumentar la inducción de la inmunidad antitumoral mediada por células en el interior del hospedador (Todo y col., 2001; Sinkovics y col., 2000). Estos virus se pueden también diseñar mediante ingeniería genética para expresar transgenes terapéuticos en el interior del tumor con el fin de aumentar la eficacia antitumoral (Hermiston, 2000)

15 Sin embargo, existen limitaciones importantes a esta solución terapéutica. Aunque se puede demostrar un grado de selectividad tumoral natural para alguna especie de virus, se siguen necesitando nuevas soluciones para diseñar mediante ingeniería genética y/o aumentar la selectividad tumoral de los virus oncolíticos a fin de maximizar la seguridad. Esta selectividad resultará particularmente importante cuando se utiliza la administración intravenosa, y cuando se añaden a estos virus genes terapéuticos potencialmente tóxicos para aumentar la potencia antitumoral; la expresión génica en tejidos normales deberá limitarse en gran medida. Además, el aumento de la potencia antitumoral a través de mecanismos adicionales tales como la inducción de la inmunidad antitumoral o dirigida a la vasculatura asociada al tumor es muy deseable.

20 Por tanto, se necesitan tratamientos más eficaces y menos tóxicos para el tratamiento del cáncer. El uso de virus oncolíticos presenta un área que se puede desarrollar; sin embargo, necesita superarse la limitación discutida anteriormente. Por tanto, la presente invención se dirige a dichas limitaciones.

Sumario de la invención

30 La presente invención se basa en el descubrimiento de que los virus vaccinia (de cualquier cepa) se pueden alterar 1) para generar un agente que afecte diferencialmente las poblaciones de células o los tipos de tejidos y/o 2) para generar una forma de virus vaccinia que sea más infecciosa y capaz de infectar otras células en virtud de la liberación mejorada desde una célula infectada. Los virus vaccinia de la invención, *por ejemplo*, la cepa Copenhagen, puede actuar de forma sinérgica con otras terapias (*por ejemplo*, quimioterapia) y proporcionar efectos beneficiosos tomando como objetivo la vasculatura tumoral, aunque sin oponerse o inhibir TNF y/o las rutas de INF. 35 En determinadas realizaciones, se contempla la cepa Copenhagen del virus vaccinia, o de uno de sus derivados.

40 En algunas realizaciones, el virus vaccinia puede ser más tóxico o terapéuticamente eficaz con respecto a las células diana, a la vez que es relativamente inocuo para otras células no diana, ya que se clarifican desde las células no diana a través de una respuesta antivírica. Este agente se puede usar para expresar un virus vaccinia o un péptido o polipéptido heterólogo en las células diana y/o para infectar letalmente dichas células. Se contempla particularmente que el virus vaccinia está "atenuado" con respecto a las células o tejidos no diana, lo que significa que el virus tiene una virulencia reducida, disminuida, perdida, inhibida, o eliminada, incluyendo su capacidad para modular una respuesta antivírica endógena del hospedador, incluyendo su capacidad para modular una respuesta antivírica endógena del hospedador. De esta manera, la presente invención se refiere a virus vaccinia para el uso en 45 unos métodos de tratamiento del cáncer, tal como se define con más detalle en la reivindicación 1 y en las reivindicaciones dependientes de la anterior. Los virus vaccinia se han alterado para volverlos útiles para tratar células o tejidos que tienen una capacidad disminuida para llevar a cabo una respuesta antivírica, además de ser ineficaces con respecto a las células o tejidos normal que pueden inducir una respuesta antivírica eficaz.

50 El mecanismo por el cual los virus de la invención se pueden considerar oncolíticos y tienen una mayor seguridad y/o una eliminación acelerada a partir de tejidos normales implica la extensión en la cual las células normales, en oposición a las células no normales (tales como células o tejidos cancerosos), son capaces de presentar una respuesta antivírica (*es decir*, montar, responder y/o inducir una respuesta inmune). Las células o tejidos normales tienen dicha capacidad, mientras que las células o tejidos cancerosos a menudo no expresan o tienen niveles reducidos de proteínas celulares que inducen o están implicadas en la respuesta antivírica. Dichas proteínas celulares incluyen interferones, TNF, quimioquinas, citoquinas, y otros factores. En las células o tejidos normales, los virus que se atenuaron y son menos capaces de mostrar una respuesta antivírica se eliminaron fácilmente; sin embargo, en células y/o tejidos no normales, se redujo la respuesta antivírica y, de esta manera, incluso el virus atenuado no se eliminó eficazmente. La base de algunas realizaciones de la invención es que los virus descritos en 60 el presente documento son una forma mejorada del tratamiento, tal como mediante un aumento de la seguridad y una reducción de la toxicidad para las células normales, ya que pueden tener menos efecto sobre células normales, en contraste con las células no normales. De esta manera, el virus atenuado se replicará preferentemente y expresará genes en células cancerosas en las que la inducción o la respuesta al interferón, *por ejemplo*, es reducida o está ausente.

65

La presente invención se refiere al virus vaccinia alterado que comprende una o más mutaciones en su genoma vírico. Las mutaciones se pueden introducir en el virus mediante ingeniería genética recombinante, mediante mutagénesis aleatoria, o pasando el virus repetidamente. Un virus cuyo genoma vírico se ha manipulado utilizando ingeniería genética recombinante (o el genoma vírico de cualquier antecedente) se denomina virus "recombinante".

5 La mutación es una sustitución de uno o más restos de ácidos nucleicos. La mutación se realiza en el gen A34R y específicamente en la posición del aminoácido 151.

10 Un polipéptido vírico que actúa para inhibir el virus infeccioso de las células, el polipéptido de la forma antiinfecciosa de EEV, se refiere a un polipéptido vírico que tiene una función que contribuye directamente a la ausencia del virus vaccinia en una forma infecciosa de EEV. *Por ejemplo*, el polipéptido que sujeta o evita la liberación de la forma de EEV procedente de la membrana celular es un polipéptido de la forma antiinfecciosa de EEV. Los polipéptidos implicados en la modulación de la forma de EEV de un virus incluyen, pero no se limitan a, A34R y B5R del virus vaccinia, y diversas proteínas diferentes que influyen la producción de la forma de EEV de los poxvirus. Una mutación en el codón 151 de A34R de una lisina a un ácido aspártico (mutación K151D) convierte la proteína A34R en menos capaz de sujetar la forma de EEV a la membrana celular.

15 Se contempla que los virus vaccinia de la invención puedan tener, además de la mutación de A34R en la posición 151, una mutación en más de un gen de las siguientes clases de polipéptidos; 1) polipéptidos moduladores de interferón, 2) polipéptidos control del complemento, 3) polipéptidos moduladores de TNF o de la quimioquina, 4 inhibidores de la serina proteasa, 5) polipéptidos moduladores de IL-1 β ; 6) polipéptidos de la forma no infecciosa de EEV; y, 7) polipéptidos víricos que actúan para inhibir la liberación del virus infeccioso a partir de células (polipéptido de la forma antiinfecciosa del virus). De esta manera,

20 Los polipéptidos específicos de los virus vaccinia que pueden, además de A34R, mutarse o volverse no funcionales con respecto a al menos una función incluyen, pero no se limitan a: A41 L, A53R, B5R, B7R, B8R, B13R, B15R, B18R, B22R, B28R, B29R, C11R, E3L, K2L, N1L, vC12L, y vCKBP. De esta manera, los virus vaccinia de la invención pueden tener mutaciones en uno o más de estos genes que codifican estos polipéptidos correspondientes a los virus vaccinia.

30 En los virus vaccinia de la invención, un virus vaccinia puede tener la mutación A34R que se define en la reivindicación 1 en combinación con mutación(ones) que eliminan al menos una función de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, o 17 de los siguientes polipéptidos: A41L, A53R, B5R, B7R, B8R, B13R, B15R, B18R, B22R, B28R, B29R, C11R, E3L, K2L, N1L, vC12L, y/o vCKBP.

35 En algunas realizaciones de la invención, la cepa Copenhagen o la cepa Western Reserve se muta para generar virus vaccinia de la invención. Estas cepas pueden mutarse adicionalmente en una o más de las siete clases de polipéptidos descritos anteriormente.

40 Las composiciones farmacéuticas que comprenden los virus vaccinia de la invención pueden incluir también interferón (α , β , y/o γ) y/o un agente anticanceroso, tal como un anticuerpo, un agente quimioterapéutico, o un ácido nucleico que codifica un polipéptido terapéutico contra el cáncer.

45 Las células del cáncer que se va a tratar con el virus vaccinia pueden ser células tumorales. El tratamiento de la célula puede ser *in vitro*, *in vivo*, o *ex vivo*. De esta manera, la célula cancerosa puede estar en un paciente. El paciente puede tener un tumor sólido. En tales casos, las realizaciones pueden implicar además llevar a cabo cirugía en el paciente, tal como realizar una resección en todo o parte del tumor. El tratamiento con el virus vaccinia puede ser antes, después, o al mismo tiempo que la cirugía, la administración puede ser también directa, endoscópica, intratraqueal, intratumoral, intravenosa, intralesional, intramuscular, intraperitoneal, regional, percutánea, tópica, intraarterial, intravesical, o subcutánea. Esta puede ser 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más veces, y puede ser cada 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 horas, o 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 días, o 1, 2, 3, 4, 5 semanas, o 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 meses.

50 Los métodos para tratar el cáncer pueden incluir además administrar al paciente quimioterapia o radioterapia, que se puede administrar más de una vez. La quimioterapia incluye, pero no se limita a, cisplatino (CDDP), carboplatino, procarbazona, mecloretamina, ciclofosfamida, camptotecina, ifosfamida, melfalan, clorambucilo, bisulfan, nitrosurea, dactinomcina, daunorubicina, doxorubicina, bleomicina, plicomicina, mitomicina, etopósido (VP16), tamoxifeno, taxotere, taxol, transplatino, 5-fluorouracilo, vincristina, vinblastina, metotrexato, gemcitabina, oxaliplatino, irinotecan, topotecan, o cualquier análogo o variante derivada de los mismos. El tratamiento de radiación incluye, pero no se limita a, irradiación de rayos X, irradiación UV, irradiación γ , radiación de haz de electrones, o microondas. Además, se puede administrar una proteasa o peptidasa a una célula o paciente para aumentar la producción de la forma infecciosa de EEV del virus a partir de células. La peptidasa o proteasa puede estar incluida en composiciones farmacéuticas que incluyen también virus. Además, se puede administrar un agente estabilizador de microtúbulos a una célula o un paciente, incluyendo, pero sin limitarse a, taxano, como parte de los métodos de la invención. De forma específica, se puede emplear una cepa Western reverse o Copenhagen del virus vaccinia junto con taxol para conseguir un efecto terapéutico sobre una célula cancerosa o en un paciente con cáncer.

65

En algunas realizaciones, el cáncer que se va a tratar es cáncer de vejiga, hematológico, de hueso, de médula ósea, de cerebro, de mama, colorrectal, de esófago, gastrointestinal, de cabeza, de riñón, de hígado, de pulmón, nasofaríngeo, de cuello, de ovario, de páncreas, de próstata, de piel, de estómago, de testículo, de lengua, o de útero.

5 En otras realizaciones de la invención, el virus vaccinia atenuado incluye además una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido terapéutico heterólogo. El polipéptido terapéutico heterólogo es un supresor tumoral, inmunomodulador, inhibidor de la angiogénesis, polipéptido antivascular, polipéptido citotóxico, inductor de la apoptosis, enzima activadora de profármaco, o un polipéptido citostático en diferentes realizaciones de la invención.

10 El virus vaccinia atenuado puede ser de la cepa IHD-J o comprender una mutación K151 en A34R. Tal como se menciona, el virus vaccinia comprende una mutación en el gen que codifica una proteína A34R. En algunos casos, la mutación da como resultado una mutación K151D. De manera similar, son útiles las líneas celulares humanas para la producción de la forma reforzada de EEV del virus vaccinia. Dichas líneas celulares se pueden infectar con el virus vaccinia, tienen virus vaccinia, o construcciones de expresión del virus vaccinia, y pueden expresar en exceso al menos un polipéptido inhibidor del complemento. El polipéptido inhibidor del complemento puede ser CD55, CD46, o CD59.

15 El virus vaccinia atenuado tal como se describe en el presente documento es adecuado para tratar el cáncer residual microscópico tras la resección del tumor.

20 Se pueden usar también los virus en otros métodos, *por ejemplo*, los métodos que incluyen tratar a un sujeto que tiene un tumor que comprende: (i) desvelar quirúrgicamente el tumor; y (ii) poner en contacto dicho tumor con el virus vaccinia atenuado.

25 Los métodos adicionales para tratar a un sujeto que tiene un tumor incluyen la perfusión del tumor, durante un periodo extendido de tiempo, con un virus vaccinia atenuado. Aunque en otras realizaciones, existen métodos para inhibir la enfermedad metastásica en un sujeto que tiene cáncer que comprende administrar al sujeto un virus vaccinia atenuado, confiriendo de este modo un beneficio terapéutico al sujeto. El término "beneficio terapéutico" utilizado a lo largo de esta solicitud se refiere a cualquier cosa que promueva o aumente el bienestar del sujeto con respecto al tratamiento médico de su dolencia, que incluye el tratamiento previo del cáncer y el cáncer. Una lista de ejemplos no exhaustivos de estos incluye el alargamiento de la vida del sujeto en cualquier lapso de tiempo, la disminución o el retraso en el desarrollo neoplásico de la enfermedad, la disminución en la hiperproliferación, la reducción en el crecimiento del tumor, el retraso de la metástasis, la reducción en la velocidad de proliferación de células cancerosas o células tumorales, y la disminución del dolor en el sujeto que se puede atribuir a la dolencia del sujeto.

30 Se pueden también concebir métodos para tratar un tumor resistente a multifármacos en un paciente que comprenden i) administrar al paciente un virus vaccinia atenuado y ii) administrar quimioterapia o radioterapia al paciente, confiriendo de este modo un beneficio terapéutico al sujeto. Además, existen métodos para volver un tumor no extirpable en un paciente en apto para extirpación que comprenden administrar al paciente una cantidad eficaz de un virus vaccinia atenuado y extirpar todo o parte del tumor. De forma alternativa, se puede concebir un método para tratar un paciente de cáncer cuyo cáncer es resistente a quimioterapia o radioterapia que comprende administrar al paciente un virus vaccinia atenuado y administrar quimioterapia o radioterapia al paciente.

35 El uso de la palabra "un" o "uno" cuando se usa junto con el término "que comprende" en las reivindicaciones y/o en la memoria descriptiva puede significar "una unidad", pero es también consistente con el significado de "uno o más" "al menos uno" y "uno o más de uno".

50 Breve descripción de las figuras

Las **FIG. 1A y 1B** ilustran un ejemplo de replicación de la cepa de virus Vaccinia de la línea de células A2780 de carcinoma de ovario humano (FIG. 1A) y en la línea de células HCT116 de carcinoma de colon humano (FIG. 1B). (El eje x es la cepa y el eje y son las unidades formadoras de placa por ml +/- S.E.)

55 La **FIG. 2** ilustra un ejemplo de replicación de virus vaccinia en células bronquioepiteliales humanas normales (NHBE). (El eje x es la cepa y el eje y son las unidades formadoras de placas por ml +/- S.E.)

La **FIG. 3** ilustra un ejemplo de la relación de rotura en células cancerosas (A2780) a células normales (NHBE) (relación de rotura) para cepas de virus vaccinia (el eje x es la cepa y el eje y es la relación de rotura).

60 La **FIG. 4** ilustra un ejemplo de la relación de rotura en células cancerosas (HCT116) a células normales (NHBE) (relación de rotura) para cepas de virus vaccinia (el eje x es la cepa y el eje y es la relación de rotura). La relación de rotura es la relación entre las UFP de una célula tumoral en comparación con las UFP de una célula normal o no tumoral.

Las **FIG. 5A y 5B** ilustran el análisis del isoblograma a modo de ejemplo derivado de los datos presentados en las FIG 6, 7, 8 y 9 que ejemplifican la sinergia entre el virus vaccinia (cepa Copenhagen) y paclitaxel en las líneas de células HCT116 (FIG. 5B) y LNCaP (FIG. 5A).

La **FIG. 6** ilustra los datos de proliferación de células HCT116 a modo de ejemplo derivados de un ensayo MTS a

modo de ejemplo utilizando combinaciones de paclitaxel y virus vaccinia.

La **FIG. 7** ilustra los datos de proliferación de células HCT116 a modo de ejemplo derivados de un ensayo MTS a modo de ejemplo utilizando combinaciones de paclitaxel y virus vaccinia.

La **FIG. 8** ilustra los datos de proliferación de células LNCaP a modo de ejemplo derivados de un ensayo MTS a modo de ejemplo utilizando combinaciones de paclitaxel y virus vaccinia.

La **FIG. 9** ilustra los datos de proliferación de células LNCaP a modo de ejemplo derivados de un ensayo MTS a modo de ejemplo utilizando combinaciones de paclitaxel y virus vaccinia.

La **FIG. 10** ilustra un estudio a modo de ejemplo donde se infectaron células resistentes a IFN y sensibles a IFN con un tratamiento de WR o WR-B18R(-) +/- IFN (tratadas 5 horas después de la infección con IFN-alfa).

Descripción de realizaciones ilustrativas

La presente invención se refiere a virus vaccinia oncolíticos para el tratamiento del cáncer. Se pueden diseñar mediante ingeniería genética virus vaccinia para ser más eficaces o más eficientes en las células destructoras de cánceres y/o ser menos tóxicos o dañinos a las células no cancerosas. De forma más específica, los virus vaccinia pueden mutarse para modificar productos génicos de tal manera que las modificaciones vuelven a los virus más capaces de infectar al hospedador, más capaces de infectar células cancerosas.

A. Virus vaccinia

Los virus son inactivados, inhibidos o eliminados frecuentemente por moléculas inmunomoduladoras tales como interferones (α , β , γ) y el factor α de necrosis tumoral (TNF) (Moss, 1996). Los tejidos del hospedador y las células inflamatorias / inmunes secretan con frecuencia estas moléculas en respuesta a la infección vírica. Estas moléculas pueden tener efectos antivíricos directos y/o efectos indirectos a través del reclutamiento y/o la activación de las células inflamatorias y los linfocitos. Dada la importancia de estos mecanismos de eliminación inmunológicos, los virus han evolucionado para expresar productos génicos que inhiben la inducción y/o la función de estas citoquinas/quimioquinas e interferones. *Por ejemplo*, el virus vaccinia (VV) codifica la proteína vCKBP (B29R) secretada que se une e inhibe las quimioquinas CC (*por ejemplo*, RANTES, eotaxina, MIP-1 alfa) (Alcami y col., 1998). Algunas cepas VV expresan también una proteína vírica secretada que se une e inactiva TNF (*por ejemplo*, Lister A53R) (Alcami y col., 1999). La mayoría de las cepas de poxvirus tienen genes que codifican las proteínas secretadas que se unen e inhiben la función de los interferones α/β (*por ejemplo*, B18R) o interferón γ (B8R). vC12L es una proteína de unión a IL-18 que evita que iL-18 induzca la activación de IFN- γ y células NK/linfocitos T citotóxicos

La mayor parte de la investigación sobre la virulencia de los poxvirus se ha llevado a cabo en ratones. Muchas, pero no todas de estas proteínas son activas en ratones (B18R, *por ejemplo*, no lo es). En situaciones en las que estas proteínas son activas contra las versiones de la citoquina diana en ratón, la delección de estos genes conduce a una reducción de la virulencia y a un aumento de la seguridad en mutantes VV con delecciones o mutaciones funcionales en estos genes. Además, la respuesta inflamatoria/inmune contra, y la eliminación vírica de estos mutantes está aumentada a menudo en comparación con la cepa del virus parental que expresa la proteína inhibidora. *Por ejemplo*, la delección de la familia de proteínas T1 de 35 kDa secretadas por poxvirus (proteínas de unión / inhibidoras de quimioquinas) puede conducir a un marcado aumento en la infiltración de leucocitos en los tejidos infectados con virus (Graham y col., 1997). La delección del gen vC12L en VV conduce a una reducción en los títulos víricos / toxicidad tras la administración intranasal en ratones; además, la actividad de las células NK y los linfocitos T citotóxicos aumenta junto con la inducción de IFN- γ (Smith y col., 2000). En resumen, los productos génicos víricos funcionan para disminuir la respuesta inmune antivírica y la infiltración de las células inflamatorias en los tejidos infectados con virus. La pérdida de la función de la proteína a través de la delección/mutación conduce a una disminución de la virulencia y/o a un aumento de las propiedades proinflamatorias del virus en el interior de los tejidos hospedadores.

Las citoquinas y quimioquinas pueden tener potentes efectos antitumorales (Vicari y col., 2002; Homey y col., 2002). Estos efectos pueden ser directamente sobre las propias células tumorales (*por ejemplo*, TNF) o pueden ser indirectamente a través de los efectos sobre células no cancerosas. Un ejemplo de lo último es TNF, que puede tener efectos antitumorales produciendo toxicidad en vasos sanguíneos asociados a tumores, esto conduce a una pérdida del flujo sanguíneo en el tumor seguida por necrosis tumoral. Además, las quimioquinas pueden actuar para reclutar (y en algunos casos activar) las células inmunoefectoras tales como neutrófilos, eosinófilos, macrófagos y/o linfocitos. Estas células inmunoefectoras pueden producir la destrucción del tumor mediante numerosos mecanismos. Estos mecanismos incluyen la expresión de citoquinas antitumorales (*por ejemplo*, TNF), la expresión del ligando de fas, la expresión de la perforina y la granzima, el reclutamiento, de linfocitos citolíticos naturales, etc. La respuesta inflamatoria puede conducir eventualmente a la inducción de una inmunidad sistémica específica de tumor. Finalmente, muchas de estas citoquinas (*por ejemplo*, TNF) o quimioquinas pueden actuar de forma sinérgica con la quimioterapia y el tratamiento de radiación para destruir los tumores.

La administración sistémica clínicamente eficaz de las versiones recombinantes de estas proteínas inmunoestimuladoras no es factible debido a 1) se induce una grave toxicidad con la administración sistémica y 2) se necesita la expresión local en el interior del tejido tumoral para estimular la infiltración local y los efectos

antitumorales. Se necesitan soluciones para alcanzar altas concentraciones locales de estas moléculas en el interior de las masas tumorales minimizando a la vez los niveles en la circulación sistémica. Se pueden diseñar virus mediante ingeniería genética para expresar genes de citoquinas o quimioquinas en un intento de aumentar su eficacia. La expresión de estos genes a partir de vectores selectivos para la replicación tiene potenciales ventajas sobre la expresión a partir de vectores sin replicación. La expresión de virus con replicación puede dar como resultado concentraciones locales mayores en el interior de las masas tumorales. Además, los virus con replicación pueden ayudar a inducir la actividad antitumoral a través de la destrucción/oncolisis de las células tumorales y la liberación de antígenos tumorales en un entorno proinflamatorio. Sin embargo, existen algunas limitaciones a esta solución. Surgen graves riesgos para la seguridad derivados del potencial para la liberación en el entorno de un virus competente para la replicación de un gen que puede ser tóxico si se expresa en concentraciones locales altas. Los virus que expresan potentes genes proinflamatorios procedentes de su genoma pueden de este modo suponer un riesgo para la seguridad en el paciente tratado y en el público general. Incluso con virus selectivos para la replicación que expresan estos genes dirigidos hacia el tumor puede producirse la expresión génica en tejidos normales que da como resultado toxicidad. Además, las limitaciones de tamaño evitan la expresión de genes múltiples y/o grandes a partir de virus, tales como adenovirus; estas moléculas actuarán definitivamente de forma más eficaz en combinación. Finalmente, muchos de los virus oncolíticos en uso expresan proteínas antiinflamatorias y por tanto estos virus contrarrestarán la inducción de un medio proinflamatorio en el interior de la masa tumoral infectada. El resultado será inhibir la inducción de la inmunidad antitumoral, los efectos antivascuales y la sensibilización a la quimioterapia/radioterapia.

1. Polipéptidos moduladores del interferón

El interferón α/β bloquea la replicación vírica a través de algunos mecanismos. El interferón γ tiene efectos inhibidores víricos directos más débiles, pero es un potente inductor de la inmunidad mediada por células a través de diversos mecanismos. Los virus han evolucionado para expresar productos génicos secretados que son capaces de contrarrestar los efectos antivíricos de los interferones. *Por ejemplo*, el virus vaccinia (y otros poxvirus) codifican las proteínas B8R y B18R secretadas que se unen al interferón γ y α/β , respectivamente.

(Smith y col., 1997; Symons y col., 1995; Alcami y col., 2000). Un ejemplo adicional del producto génico de vaccinia que reduce la inducción del interferón es el inhibidor B13R de la caspasa 1 que inhibe la activación del factor IL-18 inductor del interferón- γ . Los polipéptidos moduladores del interferón incluyen, pero no se limitan a, B18R, que se puede denominar B19R en otras cepas víricas, tal como la cepa Copenhagen del virus Vaccinia; B8R; B13R; vC12L; A53R; E3L y otros polipéptidos víricos con actividades o propiedades similares. Los polipéptidos moduladores de IFN pueden dividirse en las categorías no exclusivas de aquellos que modulan preferentemente IFN α y/o las rutas β (tales como B18R, B8R, B13R, o vC12L) y aquellos que modulan las rutas de IFN γ (*por ejemplo*, B8R, B13R, o vC12L).

Las células cancerosas son frecuentemente resistentes a los efectos de los interferones. Están implicados numerosos mecanismos. Estos incluyen el hecho de que la activación de la ruta de transducción de la señal de ras (*por ejemplo*, mediante la mutación de ras, la expresión en exceso/mutación del receptor del factor de crecimiento en la dirección 5', etc.), una característica común de las células cancerosas, conduce a la inhibición de PKR. Además, los linfocitos están inhibidos a menudo en las masas tumorales por varios mecanismos que incluyen la producción de IL-10 y la expresión de fas-L por las células tumorales. Debido a que los linfocitos son una fuente principal de producción de interferón- γ , la inhibición de los linfocitos conduce a una inhibición en la producción de interferón- γ en los tumores. Por tanto, las masas tumorales tienden a ser reducidos con respecto a los efectos de los interferones. Además, los propios interferones pueden tener efectos antitumorales. *Por ejemplo*, IFN- γ puede aumentar la presentación del antígeno asociada a MHC de clase I. Esto permitirá una destrucción más eficaz de las células tumorales mediada por LTC. IFN α/β , *por ejemplo*, puede bloquear la angiogénesis en el interior de las masas tumorales y bloquear por tanto el crecimiento del tumor.

2. Polipéptidos control del complemento

Un mecanismo principal para la eliminación de patógenos víricos es la destrucción de las células infectadas en el interior del hospedador o de los viriones en el interior de un organismo mediante mecanismos dependientes del complemento. Cuando la célula infectada muere es incapaz de continuar la producción del virus infeccioso. Además, durante la apoptosis, las enzimas intracelulares se liberan, lo que produce que el ADN se degrade. Estas enzimas pueden conducir a la degradación del ADN vírico y a la inactivación del virus. Se puede inducir la apoptosis mediante numerosos mecanismos que incluyen la unión del complemento activado y el complejo de ataque a la membrana del complemento. Los poxvirus tales como vaccinia han evolucionado para expresar productos génicos que son capaces de contrarrestar la eliminación del virus y/o de las células infectadas con el virus mediado por el complemento. Estos genes evitan por tanto la apoptosis e inhiben la eliminación vírica mediante mecanismos dependientes del complemento, permitiendo de esta manera que proceda la infección vírica y que aumente la virulencia vírica. *Por ejemplo*, las proteínas control del complemento del virus vaccinia (VCP, *por ejemplo*, C211) tienen papeles en la prevención de la muerte celular y/o la inactivación del virus mediada por el complemento (Isaac y col., 1992). VCP tiene también efectos antiinflamatorios debido a que su expresión disminuye la infiltración de

leucocitos en tejidos infectados víricamente. Los péptidos control del complemento incluyen, pero no se limitan a, VCP, conocido también como C3L o C21L.

5 Las células cancerosas expresan en exceso con frecuencia las proteínas anti-complemento celulares; esto permite a las células cancerosas sobrevivir al ataque del complemento por los anticuerpos +/- específicos del tumor (Caragine y col., 2002; Durrant y col., 2001; Andoh y col. 2002). Por tanto, los agentes que se dirigen preferentemente a las células tumorales debido a su resistencia inherente a la destrucción mediada por el complemento tienen selectividad y eficacia potencial en un amplio intervalo de cánceres humanos (Durrant y col., 2001). Además, uno de los hitos de las células cancerosas es una pérdida de los mecanismos apoptóticos normales (Gross y col, 1999). La resistencia a la apoptosis promueve la carcinogénesis así como la resistencia a los agentes antitumorales que incluyen los agentes inmunológicos, quimioterapéuticos y radioterapéuticos (Eliopoulos y col., 1995). La inhibición de la apoptosis puede estar mediada por una pérdida de función de la molécula pro-apoptótica (*por ejemplo*, bax), un aumento en los niveles de moléculas anti-apoptóticas (*por ejemplo*, bcl-2) y finalmente una pérdida de sensibilidad del complemento

15

3. Polipéptidos moduladores de TNF

Uno de los diversos mecanismos para la eliminación de patógenos víricos es la muerte de las células infectadas en el interior del hospedador mediante la inducción de la apoptosis, tal como se ha descrito anteriormente. Se puede inducir la apoptosis mediante numerosos mecanismos que incluyen la unión de TNF y la linfotóxina-alfa (LT α) a los receptores de TNF celulares, que estimulan las cascadas de señalización intracelulares. La activación de la función de los receptores de TNF en la regulación de las respuestas inmunes e inflamatorias, así como la inducción de la muerte células apoptótica (Wallach y col., 1999).

20

25 Diversas cepas de poxvirus, incluyendo algunas cepas de virus vaccinia, han evolucionado para expresar productos génicos que son capaces de contrarrestar la eliminación del virus y/o las células infectadas con virus mediado por TNF. Las proteínas codificadas por estos genes evitan las actividades proinflamatorias y de inducción de la apoptosis de TNF uniendo y secuestrando el TNF extracelular, dando como resultado la inhibición de la eliminación vírica. Como los virus no se eliminan, puede continuar la infección vírica, y, de esta manera, la virulencia vírica aumenta. Varios miembros de la familia de los poxvirus expresan los receptores de TNF víricos secretados (vTNFR). *Por ejemplo*, algunos poxvirus codifican los vTNFR, tales como mixoma (proteína T2), cepas de la viruela vacuna y del virus vaccinia, tales como Lister, pueden codificar una o más de las proteínas CrmB, CrmC (A53R), CrmD, CrmE, B28R y/o de sus equivalentes. Estos vTNFR tienen papeles en la prevención de la muerte celular y/o en la inactivación del virus mediadas por TNF (Saraiva y Alami, 2001). Los polipéptidos moduladores de TNF incluyen, pero no se limitan a, A53R, B28R (esta proteína está presente, pero puede estar inactiva en la cepa Copenhagen del virus vaccinia) y en otros polipéptidos con actividades o propiedades similares.

30

35

Uno de los hitos de las células cancerosas es la expresión génica anómala, que puede conducir a una pérdida de sensibilidad a numerosos mecanismos moleculares de la modulación del crecimiento, tales como sensibilidad a las actividades anticancerosas de TNF. De esta manera, puede que no se requieran mecanismos inmunomoduladores víricos para la propagación de un virus en el interior del microentorno del tumor.

40

4. Inhibidores de la serina proteasa

45 Un mecanismo principal para la eliminación de patógenos víricos es la inducción de la apoptosis en células infectadas en el interior del hospedador. Cuando la célula infectada muere es incapaz de continuar la producción del virus infeccioso. Además, durante la apoptosis, se liberan las enzimas intracelulares que degradan el ADN. Estas enzimas pueden conducir a la degradación del ADN vírico y a la inactivación del virus. Se puede inducir la apoptosis mediante numerosos mecanismos que incluyen la unión de citoquinas (*por ejemplo*, factor de necrosis tumoral), producción de granzima por linfocitos T citotóxicos o unión del ligando de fas; la activación de la caspasa es una parte crítica de la ruta final de la apoptosis común. Los virus han evolucionado para expresar los productos génicos que son capaces de contrarrestar la cascada de señalización intracelular inducida por dichas moléculas que incluyen el ligando de fas o el factor de necrosis tumoral (TNF) / moléculas relacionadas con TNF (*por ejemplo*, los genes E3 10.4/ 14.5, 14.7 de adenovirus Wold y col., 1994); E1B de 19kD de adenovirus (Boyd y col., 1994); crmA del virus de la viruela vacuna; B13R del virus vaccinia) (Dobbelstein y col., 1996; Kettle y col., 1997). Estos productos génicos evitan la apoptosis mediante moléculas inductoras de la apoptosis y de esta manera permiten que continúe la replicación vírica a pesar de la presencia de citoquinas antivíricas inductoras de la apoptosis, fas, granzima u otros simuladores de la apoptosis.

50

55

60 VV SPI-2/ B13R es fuertemente homólogo del virus de la viruela vacuna CrmA; SPI-1 (VV) es muy homólogo de CrmA (Dobbelstein y col., 1996). Estas proteínas son serpinas (inhibidores de la serina proteasa) y CrmA y SPI-2 tienen papeles en la prevención de diversas formas de la apoptosis. La inhibición de la enzima convertidora de interleuquina 1 β (ICE) y la granzima, *por ejemplo* puede evitar la apoptosis de la célula infectada. Estos productos génicos tienen también efectos antiinflamatorios. Son capaces de inhibir la activación de IL-18 que a la vez podría disminuir la inducción de IFN- γ mediada por IL-18: Se inhiben por tanto los efectos inmunostimuladores de IFN- γ sobre la inmunidad mediada por células (Kettle y col., 1997). Los SPI incluyen, pero no se limitan a B13R, B22R, y

65

otros polipéptidos con actividades o propiedades similares.

Uno de los hitos de las células cancerosas es la pérdida de mecanismos apoptóticos normales (Gross y *col.*, 1999). La resistencia a la apoptosis promueve la carcinogénesis así como la resistencia a los agentes antitumorales incluyen agentes inmunológicos, quimioterapéuticos y radioterapéuticos (Eliopoulos y *col.*, 1995). La inhibición de la apoptosis puede estar mediada por una pérdida de función de la molécula proapoptótica (*por ejemplo*, bax) o un aumento en los niveles/función de las moléculas antiapoptóticas (*por ejemplo*, bcl-2)

5. Polipéptidos moduladores de IL-1 β

IL-1 β es uno de los factores biológicamente activos que actúa localmente y también sistémicamente. Solo se han descrito unas pocas diferencias funcionales entre IL-1 β e IL-1 α . Las numerosas actividades biológicas de IL-1 β están ejemplificadas por los muchos acrónimos diferentes bajo los cuales se ha descrito IL-1. IL-1 no muestra especificidad de especie con la excepción de que IL-1 β está inactiva en células de porcino. Algunas de las actividades biológicas de IL-1 están indirectamente mediadas por la inducción de la síntesis de otros mediadores que incluyen ACTH (Corticotropina), PGE2 (prostaglandina E2), PF4 (factor-4 de plaquetas), CSF (factores estimuladores de colonias), IL-6, e IL-8. Se puede inducir la síntesis de IL-1 por otras citoquinas que incluyen TNF- α , IFN- α , IFN- β and IFN- γ y también por endotoxinas bacterianas, virus, mitógenos, y antígenos. La principal actividad biológica de IL-1 es la estimulación de los linfocitos T auxiliares, que están inducidos para secretar IL-2 y para expresar los receptores de IL-2. Los macrófagos infectados por virus producen grandes cantidades de un inhibidor de IL-1 que puede soportar infecciones oportunistas y la transformación de células en pacientes con defectos de maduración de los linfocitos T actúa directamente sobre los linfocitos B, promoviendo su proliferación y la síntesis de inmunoglobulinas. IL-1 funciona también como uno de los factores que hace que los linfocitos B sean sensibles a IL-5. IL-1 estimula la proliferación y la activación de células NK y fibroblastos, timocitos, células del glioblastoma.

El bloqueo de la síntesis de IL-1 β por la proteína vírica se considera una estrategia vírica que permite que se supriman o disminuyan las reacciones antivíricas sistémicas estimuladas por IL-1. Las proteínas de unión bloquean eficazmente las funciones de IL-1 con actividad similar a la que se ha encontrado en B15R que también está codificada por genes del virus de la viruela vacuna. El virus vaccinia codifica también otra proteína, designada B8R que se comporta de forma similar a un receptor de las citoquinas (Alcami y Smith, 1992; Spriggs y *col.*, 1992). Los péptidos moduladores de IL-1 incluyen, pero no se limitan a, B13R, B15R, y otros polipéptidos con actividades o propiedades similares.

Uno de los hitos de las células cancerosas es la expresión anómala del gen, que puede conducir a una pérdida de sensibilidad hacia numerosos mecanismos moleculares para la modulación del crecimiento, tales como sensibilidad a las actividades anticancerosas de IL-1. De esta manera, pueden no necesitarse mecanismos inmunomoduladores víricos para la propagación de un virus en el interior del microentorno del tumor.

6. Forma del EEV

La diseminación vírica hacia los sitios metastásicos del tumor, e incluso la diseminación en el interior de una masa tumoral sólida infectada, es generalmente poco eficaz (Heise y *col.*, 1999). La administración intravenosa da como resultado normalmente una eliminación o inactivación vírica por los anticuerpos (*por ejemplo*, adenovirus) (Kay y *col.*, 1997) y/o el sistema del complemento (*por ejemplo*, VHS) (Ikeda y *col.*, 1999). Además de estos mecanismos inmunomediados, la biodistribución de estos virus da como resultado una gran mayoría de virus intravenosos que se depositan en el interior de tejidos normales más bien que en las masas tumorales. Los adenovirus intravenosos, *por ejemplo*, terminan principalmente en el interior del hígado y el bazo; menos de un 0,1 % de los virus que entran se depositan en el interior de los tumores, incluso en ratones inmunodeficientes (Heise y *col.*, 1999). Por tanto, aunque se puede demostrar alguna modesta eficacia antitumoral con dosis relativas extremadamente altas, en modelos de tumores de ratones inmunodeficientes, la administración intravenosa es extremadamente poco eficaz y limita significativamente la eficacia.

El virus vaccinia tiene la capacidad de replicarse en el interior de tumores sólidos y produce necrosis. Además, los mutantes de delección de la timidina quinasa pueden infectar masas tumorales y tejido de ovario y expresar generalmente genes marcadores preferentemente en sistemas de modelos tumorales de ratón (Gnant y *col.*, 1999). Sin embargo, debido a que estos estudios determinaron generalmente el direccionamiento del tumor basándose en la expresión del gen marcador después ≥ 5 días, resulta poco claro si el virus se deposita preferentemente en, expresa genes en o se replica en el tejido tumoral/ovárico (Puhlmann y *col.*, 2000). Con respecto al mecanismo, la eficacia antitumoral del virus sin transgenes adicionales no fue estadísticamente significativa (Gnant y *col.*, 1999). En contraste, la inyección intratumoral del virus tuvo una significativa eficacia antitumoral (McCart y *col.*, 2000). Por tanto, podría mejorarse la eficacia i.v. si se mejorara la administración al tumor.

El virus vaccinia se replica en células y produce virus intracelulares (IMV, virus maduro intracelular; IEV virus de envoltura intracelular) y virus extracelulares (EEV, virus de envoltura extracelular; CEV, virus extracelular asociado a célula) (Smith y *col.*, 1998). IMV representa aproximadamente un 99 del rendimiento vírico tras la replicación de las cepas de virus vaccinia naturales. Esta forma de virus es relativamente estable en el entorno, y por tanto, es

principalmente responsable de la diseminación entre individuos; en contraste, este virus no se disemina eficazmente en el interior del hospedador infectado debido a la liberación poco eficaz de las células y la sensibilidad al complemento y/o la neutralización del anticuerpo. En contraste, el EEV se libera en el medio extracelular y representa normalmente aproximadamente un 1 % del rendimiento vírico (Smith y col., 1998). El EEV es responsable de la diseminación vírica en el interior del hospedador infectado y se degrada de forma relativamente fácil fuera del hospedador. De manera importante, el EEV ha desarrollado algunos mecanismos para inhibir su neutralización en el interior del torrente sanguíneo. En primer lugar, el EEV es relativamente resistente al complemento (Vanderplasschen y col., 1998); esta característica es debida a la incorporación de inhibidores del complemento de las células hospedadoras en su revestimiento de la membrana externa más la secreción de la proteína control del complemento del virus vaccinia (VCP) en el ambiente extracelular local. En segundo lugar, el EEV es relativamente resistente a la neutralización de los efectos de los anticuerpos en comparación con IMV (Smith y col., 1997). El EEV se libera también en puntos temporales tempranos tras la infección (*por ejemplo*, 4-6 horas que si fuera IMV (que se libera solo durante / después de la muerte celular), y por tanto la diseminación de la forma del EEV es más rápida (Blasco y col., 1993).

Desafortunadamente, sin embargo, las cepas de vaccinia naturales producen solo cantidades muy pequeñas del EEV, relativamente. Además, los procedimientos de fabricación y purificación normalizados de virus vaccinia (VV) conducen a la inactivación del EEV (Smith y col., 1998), y las líneas de células no humanas se usan frecuentemente para fabricar el virus; los EEV procedentes de células no humanas no estarán protegidos de la eliminación mediada por el complemento (las proteínas inhibitoras del complemento adquiridas de la células por el EEV tienen efectos restringidos para la especie). La eficacia del virus vaccinia queda de este modo limitada por la sensibilidad relativa de la forma del IMV hacia la neutralización y por su diseminación poco eficaz al interior de masas sólidas tumorales; esta diseminación se produce normalmente entre células adyacentes. La diseminación del IMV hacia masas tumorales distantes, tanto a través del torrente sanguíneo como a través de los ganglios linfáticos, es también poco eficaz.

Por tanto, la forma de EEV rara del virus vaccinia ha adquirido naturalmente características que la hacen superior a la forma del virus vaccinia utilizada en pacientes hasta la fecha (IMV); el EEV está optimizado para una rápida y eficaz diseminación a través de tumores sólidos localmente y a sitios del tumor regionales o distantes. Debido a que el EEV es relativamente resistente a los efectos del complemento, cuando crece en un tipo de célula procedente de la misma especie, esta forma del virus tendrá una estabilidad mejorada y retendrá la actividad más tiempo en la sangre tras la administración intravascular que las preparaciones normalizadas del virus vaccinia (que contienen exclusivamente el INV) (Smith y col., 1998). Debido a que el EEV es resistente a la neutralización mediada por anticuerpo, esta forma del virus retendrá la actividad más tiempo en la sangre tras la administración intravascular que las preparaciones normalizadas del virus vaccinia (que contienen casi exclusivamente el IMV) (Vanderplasschen y col., 1998). Esta característica será particularmente importante para repetir la administración una vez que han aumentado los niveles del anticuerpo neutralizante; todos los tratamientos anticancerosos homologados requieren repetir la administración. Por tanto, la forma del EEV del virus vaccinia dará como resultado una administración superior de los virus terapéuticos y de su carga genética útil a los tumores a través del torrente sanguíneo. Esto conducirá a una eficacia sistémica mejorada en comparación con las preparaciones de poxvirus normalizadas. Finalmente, el riesgo de transmisión a individuos del público en general debería reducirse significativamente debido a que el EEV es extremadamente inestable fuera del cuerpo. Los polipéptidos implicados en la modulación de la forma de EEV de un virus incluyen, pero no se limitan a, A34R, B5R, y otras proteínas diversas que influyen en la producción de la forma del EEV de los poxvirus. Una mutación en el codón 151 de una lisina a un ácido aspártico (mutación K151D) convierte la proteína A34R en menos capaz de sujetar la forma de EEV a la membrana celular, B5R es un polipéptido unido a la membrana del EEV que puede unirse al complemento. La delección total de A34R puede conducir a una liberación creciente del EEV, pero reducir marcadamente la infectividad de los virus, aunque la mutación K151D aumenta la liberación del EEV manteniendo a la vez la infectividad de los virus liberados. B5R tiene una homología de la secuencia para VCP (anti-complemento), pero no se ha demostrado una inhibición del complemento. De forma breve, un método para identificar una forma de EEV reforzada es como sigue. Se diluyeron EEV en MEM enfriado en hielo y se mezclaron (1.1 en volumen) con suero activo o inactivado térmicamente (56 °C, 30 min, control) diluido en MEM enfriado en hielo (dilución final del suero 1/10, 1/20, o 1/30). Tras la incubación o 75 minutos a 7 °C, se enfriaron las muestras en hielo y se añadió mAb 5B4/2F2 a las muestras de EEV recientes para neutralizar cualquier contaminación (IMV y EEV partidos). Los viriones se unen a continuación con células RK13 durante una hora en hielo, el complemento y los viriones no unidos se lavaron aparte, y el número de placas se contó dos días después. El número de placas fue mayor cuanto mayor fue la resistencia al complemento. Vanderplasschen et al. PNAS 1998; 95(13): 7544-7549. Los métodos a modo de ejemplo que describen el aislamiento de las formas de EEV del virus vaccinia se pueden encontrar en Blasco y col. 1992

7. Otros polipéptidos

Otros polipéptidos inmunomoduladores víricos pueden incluir polipéptidos que se unen a otros mediadores de la respuesta inmune y/o modulan las rutas moleculares asociadas con la respuesta inmune. *Por ejemplo*, los polipéptidos de unión a quimiocina tales como B29R (esta proteína está presente, pero puede estar inactiva en la cepa Copenhagen del virus Vaccinia). C23L, vCKBP, A41L y los polipéptidos con actividades o propiedades similares. Otras proteínas del virus vaccinia tales como el factor de crecimiento del virus vaccinia (*por ejemplo*,

C11L), que es un factor de crecimiento de tipo EGF, pueden ser también la diana para la alteración. Otros polipéptidos que se pueden clasificar como factores inmunomoduladores víricos incluyen, pero no se limitan a B7R, N1L u otros polipéptidos cuyas actividades o propiedades aumentan la virulencia de un poxvirus.

5 B Propagación del virus

El virus Vaccinia se puede propagar utilizando los métodos descritos por Earl y Moss en Ausbel y *col.*, Current Protocols in Molecular Biology, páginas 16.15.1 a 16.18.10.

10 C Composiciones proteínicas y de ácidos nucleicos

Tal como se usa en el presente documento, una "proteína" o "polipéptido" se refiere a una molécula que comprende al menos un resto de aminoácido. En algunas realizaciones, se emplea una versión natural de una proteína o polipéptido, sin embargo, en muchas realizaciones de la invención, la proteína o el polipéptido están ausentes o alterados con el fin de volver el virus más útil para el tratamiento de las células cancerosas o el cáncer en un paciente. Se pueden usar los términos descritos de forma indistinta en el presente documento. Una "proteína modificada" o "polipéptido modificado" se refiere a una proteína o polipéptido cuya estructura química está alterada con respecto a la proteína o polipéptido natural. En algunas realizaciones, la proteína o el polipéptido modificados tienen al menos una actividad o función modificada (que reconoce que estas proteínas o polipéptidos pueden tener múltiples actividades o funciones). La actividad o la función se pueden reducir, disminuir, eliminar, aumentar, mejorar, o alterar de alguna otra forma (tal como la especificidad) con respecto a la actividad o la función en una proteína o polipéptido natural. Se contempla de forma específica que la proteína o el polipéptido modificado puede estar alterado con respecto a una actividad o función que retiene todavía la actividad o función natural en otros aspectos. De forma alternativa, la proteína modificada puede ser completamente no funcional o su secuencia de ácido nucleico análoga puede haber sido alterada de tal manera que el polipéptido no se exprese ya de esa manera, esté truncado, o exprese una secuencia de aminoácidos diferente como resultado de un marco de lectura.

En determinadas realizaciones, el tamaño de una proteína o polipéptido mutado puede comprender, pero no se limita a, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 525, 550, 575, 600, 625, 650, 675, 700, 725, 750, 775, 800, 825, 850, 875, 900, 925, 950, 975, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1750, 2000, 2250, 2500 o más restos de moléculas de amino, y cualquier intervalo derivable del anterior. Se contempla que los polipéptidos pueden estar mutados mediante truncamiento, volviéndolos más cortos que su correspondiente forma natural.

Tal como se usa en el presente documento, una "molécula de amino" se refiere a cualquier aminoácido, derivado de aminoácido o mimético de aminoácido como conocería una persona normalmente experta en la materia. En determinadas realizaciones, los restos de la molécula proteínica son secuenciales, sin que ninguna molécula no de amino interrumpa la secuencia de restos de moléculas de amino. En otras realizaciones, la secuencia puede comprender uno o más restos de moléculas no de amino. En realizaciones concretas, la secuencia de restos de la molécula proteínica puede estar interrumpida por uno o más restos de moléculas no de amino.

De acuerdo con esto, el término "composición proteínica" abarca secuencias de moléculas de amino que comprenden al menos uno de los 20 aminoácidos comunes en proteínas sintetizadas naturalmente, o al menos un aminoácido modificado o no usual.

Se pueden preparar composiciones proteínicas mediante cualquier técnica conocida por los expertos en la materia, incluyendo la expresión de proteínas, polipéptidos o péptidos mediante técnicas de biología molecular normalizadas, se han descrito anteriormente las secuencias de nucleótidos y proteínas, polipéptidos y péptidos de diversos genes, y se pueden encontrar en las bases de datos informatizadas conocidas por las personas normalmente expertas en la técnica. Una de dichas bases de datos es la base de datos del National Center for Biotechnology Information's Genbank y la base de datos GenPept (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Las regiones de codificación de estos genes conocidos se pueden amplificar y/o expresarse utilizando las técnicas descritas en el presente documento o como conocerían las personas normalmente expertas en la técnica.

1. Aspectos funcionales

Cuando la presente solicitud se refiere a la función o a la actividad de proteínas o polipéptidos víricos, se entiende que se refiere a la actividad o a la función de la proteína o el polipéptido vírico en condiciones fisiológicas, a no ser que se especifique otra cosa. *Por ejemplo*, un polipéptido modulador del interferón se refiere a un polipéptido que afecta al menos un interferón y su actividad, tanto directa como indirectamente. El polipéptido puede inducir, potenciar, aumentar, disminuir, debilitar, reducir, inhibir, o enmascarar la actividad de un interferón, de forma directa o indirecta, un ejemplo de interferón que afecta directamente implica, en algunas realizaciones, un polipéptido modulador del interferón que se une de manera específica al interferón. La determinación de qué moléculas poseen

esta actividad se puede conseguir utilizando ensayos familiares para los expertos en la materia. *Por ejemplo*, la transferencia de genes que codifican productos que modulan el interferón, o sus variantes, en las células que se inducen para la actividad del interferón en comparación con las células con dicha transferencia de genes puede identificar, en virtud de diferentes niveles de una respuesta del interferón, aquellas moléculas que tienen una función moduladora del interferón.

Se contempla de forma específica que el modulador puede ser una molécula que afecta la expresión de las composiciones proteínicas implicadas en la ruta dirigida de la molécula, tal como la unión de un transcrito que codifica el interferón. La determinación de cuáles son las moléculas moduladoras del interferón adecuadas, IL-1 β , TNF, u otras moléculas de beneficio terapéutico se puede conseguir utilizando ensayos familiares para los expertos en la materia algunos de los cuales se describen en el presente documento – y pueden incluir, *por ejemplo*, el uso de proteínas víricas naturales y/o recombinantes.

2. Variantes de polipéptidos víricos

Las variantes de las secuencias de aminoácidos de los polipéptidos de la presente invención son variantes de sustitución. Una mutación en un gen que codifica un polipéptido vírico puede afectar 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 o más aminoácidos no contiguos o contiguos del polipéptido, en comparación con el natural. Se pueden identificar diversos polipéptidos codificados por el virus vaccinia por referencia a Rosel y *col.*, 1986, Goebel y *col.*, 1990 y el Número de Acceso al Genbank NC_001559.

Las variantes de sustitución incluyen normalmente el intercambio de un aminoácido por otro en uno o más sitios dentro de la proteína, y se pueden diseñar para modular una o más propiedades del polipéptido, con o sin la pérdida de otras funciones o propiedades. Las sustituciones pueden ser conservativas, esto es, un aminoácido se sustituye con uno de forma y carga similares. Las sustituciones conservativas son bien conocidas en la técnica e incluyen, *por ejemplo*, los cambios de: alanina a serina; arginina a lisina; asparagina a glutamina o histidina; aspartato a glutamato; cisteína a serina, glutamina a asparagina; glutamato a aspartato; glicina a prolina; histidina a asparagina o glutamina, isoleucina a leucina o leucina; leucina a valina o isoleucina; lisina a arginina; metionina a leucina o isoleucina; fenilalanina a tirosina, leucina o metionina; serina a treonina; treonina a serina; triptófano a tirosina, tiroxina a triptófano o fenilalanina; y valina a isoleucina o leucina. De forma alternativa, las sustituciones pueden ser no conservativas de tal manera que la función o actividad del polipéptido está afectada. Los cambios no conservativos implican normalmente sustituir un resto con uno que es químicamente disimilar, tal como un aminoácido polar o cargado para un aminoácido no polar o no cargado, y viceversa.

El término “codón funcionalmente equivalente” se usa en el presente documento para referirse a codones que codifican el mismo aminoácido, tal como los seis codones para la arginina o la serina, y se refiere también a los codones que codifican aminoácidos biológicamente equivalentes.

Lo siguientes es una discusión basada en el cambio de los aminoácidos de una proteína para crear un equivalente, o incluso una molécula de segunda generación mejorada. *Por ejemplo*, se pueden sustituir determinados aminoácidos por otros aminoácidos en una estructura de proteína sin una pérdida apreciable de capacidad de unión interactiva con estructuras tales como, *por ejemplo*, regiones de unión a antígeno de anticuerpos o sitios de unión sobre moléculas sustrato. Debido a que es la capacidad interactiva y la naturaleza de una proteína la que define la actividad funcional biológica de la proteína, se pueden llevar a cabo determinadas sustituciones de aminoácidos en una secuencia de proteínas, y en su secuencia de codificación de ADN subyacente, y sin embargo producir una proteína con propiedades similares. Los inventores contemplan de esta manera que se pueden realizar diversos cambios en las secuencias de ADN de los genes sin una pérdida apreciable de su utilidad o actividad biológica, tal como se discute a continuación.

Para realizar dichos cambios se puede tener en cuenta el índice hidropático de los aminoácidos. Es conocida en la técnica importancia del índice hidropático de los aminoácidos para conferir función biológica interactiva a una proteína (Kyte y Doolittle, 1982). Se acepta que el carácter hidropático relativo del aminoácido contribuye a la estructura secundaria de la proteína resultante, que a la vez define la interacción de la proteína con otras moléculas, *por ejemplo*, enzimas, sustratos, receptores, ADN, anticuerpos, antígenos, y similares.

Es también conocido en la técnica que la sustitución de aminoácidos similares se puede hacer eficazmente sobre la base de la hidrofiliidad. La patente de los Estados Unidos 4. 554. 101 indica que la mayor hidrofiliidad promedio local de una proteína, que está controlada por la hidrofiliidad de sus aminoácidos adyacentes, se correlaciona con una propiedad biológica de la proteína. Tal como se detalla en la patente de los Estados Unidos 4. 554. 101, los siguientes valores de hidrofiliidad se han asignado a los restos de aminoácidos: arginina (+3,0), lisina (+3,0); aspartato (+3,0 \pm 1); glutamato (+3,0 \pm 1); serina (+0,3), asparagina (+0,2); glutamina (+0,2); glicina (0); treonina (-0,4), prolina (-0,5 \pm 1), alanina (-0,5), histidina (-0,5), cisteína (-1,0), metionina (-1,3); valina (-1,5), leucina (-1,8);

isoleucina (-1,8), tirosina (-2,3); fenilalanina (-2,5), triptófano (3,4).

Se entiende que un aminoácido puede estar sustituido por otro que tiene un valor de hidrofiliidad similar y produce además una proteína biológicamente equivalente e inmunológicamente equivalente. En dichos cambios, se prefiere la sustitución de aminoácidos cuyos valores de hidrofiliidad están comprendidos en ± 2 , se prefieren particularmente aquellos que están comprendidos en ± 1 , e incluso se prefieren más particularmente aquellos comprendidos en $\pm 0,5$.

Tal como se ha reseñado anteriormente, las sustituciones de aminoácidos se basan generalmente en la similitud relativa de los sustituyentes de las cadenas secundarias de aminoácidos, *por ejemplo*, su hidrofobicidad, hidrofiliidad, carga, tamaño, y similares. Las sustituciones a modo de ejemplo que tienen en consideración las diversas características anteriores son bien conocidas por los expertos en la materia e incluyen: arginina y lisina; glutamato y aspartato; serina y treonina, glutamina y asparagina, y valina, leucina e isoleucina.

D. Moléculas de ácido nucleico

Polinucleótidos que codifican proteínas naturales o proteínas modificadas

Son útiles los polinucleótidos, que se pueden aislar a partir de células, que son capaces de expresar todo o parte de una proteína o un polipéptido y se refieren a un genoma vírico que se ha mutado de forma específica para generar un virus que carece de determinados polipéptidos víricos funcionales. Los polinucleótidos pueden codificar un péptido o polipéptido que contiene todo o parte de una secuencia de aminoácidos víricos o se pueden diseñar mediante ingeniería genética de tal manera que no codifiquen dicho polipéptido vírico o codifiquen un polipéptido vírico que tiene al menos una función o actividad reducida, disminuida, o ausente. Se pueden purificar las proteínas recombinantes a partir de células que las expresan para dar como resultado proteínas activas. El genoma, así como la definición de las regiones de codificación del virus vaccinia se pueden encontrar en Rosel y *col.*, 1986, Goebel y *col.*, 1990, y/o el número de Acceso al Genbank NC_00159.

Tal como se usa en el presente documento, el término "segmento de ADN" se refiere a una molécula de ADN que se ha aislado libre del ADN genómico total de una especie concreta. Por tanto, un segmento de ADN que codifica un polipéptido se refiere a un segmento de ADN que contienen secuencias de codificación de polipéptidos naturales, polimórficas, o mutantes. Incluidos en el término "segmento de ADN" están un polipéptido o polipéptidos, segmentos de ADN más pequeños que un polipéptido, y vectores recombinantes que incluyen, *por ejemplo*, plásmidos, cósmidos, fagos, virus, y similares.

Tal como se usa en esta solicitud, el término "polinucleótido de virus vaccinia" se refiere a una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido de virus vaccinia que se ha aislado libre de ácido nucleico genómico total. Un "genoma de virus vaccinia" se refiere a una molécula de ácido nucleico que se puede proporcionar a una célula hospedadora para dar como resultado una partícula vírica, en presencia o ausencia de un virus auxiliar puede que se haya mutado o no de forma recombinante en comparación con el virus natural.

Se pretende que el término "ADNc" se refiera a ADN preparado utilizando ARN mensajero (ARNm) como molde. La ventaja de usar un ADNc, en oposición a un ADN genómico o ADN polimerizado a partir de un molde de ARN genómico, sin procesar o parcialmente procesado, es que el ADNc contiene principalmente secuencias de codificación de la proteína correspondiente. Existen momentos, en los que se prefiere la secuencia genómica completa o parcial, tales como cuando se requieren regiones no codificantes para la expresión óptima, o cuando las regiones no codificantes tales como intrones son para dirigirse en una estrategia de sentido contrario.

Se contempla también que un polipéptido concreto de una especie dada pueda representarse por variantes naturales que tienen secuencias de ácido nucleico ligeramente diferentes, pero, no obstante, codifican la misma proteína.

De forma similar, un polipéptido que comprende un gen que codifica un polipéptido aislado o purificado natural o mutante se refiere a un segmento de ADN que incluye secuencias de codificación de polipéptidos naturales o mutantes y, en determinados aspectos, secuencias reguladoras aisladas sustancialmente separadas de otros genes presentes en la naturalezas o secuencias que codifican proteínas. A este respecto, el término "gen" se usa por simplicidad para referirse a una proteína, polipéptido, o unidad codificadora de péptido funcional (que incluye cualquier secuencia requerida para la transcripción adecuada, la modificación posterior a la traducción, o la localización). Como entenderán los expertos en la materia, este término funcional incluye secuencias genómicas, secuencias de ADNc, y segmentos génicos más pequeños diseñados mediante ingeniería genética que expresan, o se pueden adaptar para expresar, proteínas, polipéptidos, dominios, péptidos, proteínas de fusión, y mutantes. Un ácido nucleico que codifica todo o parte de un polipéptido natural o modificado puede contener una secuencia de ácido nucleico contigua que codifica todo o una porción de dicho polipéptido de las siguientes longitudes: 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 441, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 680, 690, 700, 710, 720,

730, 740, 750, 760, 770, 780, 790, 800, 810, 820, 830, 840, 850, 860, 870, 880, 890, 900, 910, 920, 930, 940, 950, 960, 970, 980, 990, 1000, 1010, 1020, 1030, 1040, 1050, 1060, 1070, 1080, 1090, 1095, 1100, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000, 5500, 6000, 6500, 7000, 7500, 8000, 9000, 10000, o más nucleótidos, nucleósido, o pares de bases.

5 Son útiles los segmentos de ADN aislados y los vectores recombinantes que incorporan secuencias de ADN que codifican un polipéptido o péptido de poxvirus natural o recombinante que incluye en su secuencia de aminoácidos una secuencia de aminoácidos contigua de acuerdo con, o que corresponde esencialmente a un polipéptido natural. De esta manera, un segmento o vector de ADN aislado que contiene un segmento de ADN puede codificar, *por ejemplo*, un modulador de TNF o polipéptido modulador de TNF que puede inhibir o reducir la actividad de TNF. El término “recombinante” puede utilizarse junto con un polipéptido o el nombre de un polipéptido específico, y esto se refiere generalmente a un polipéptido producido a partir de una molécula de ácido nucleico que se ha manipulado *in vitro* o que es un producto replicado de dicha molécula.

15 Son útiles también los segmentos de ADN aislados y los vectores recombinantes que incorporan secuencias de ADN que codifican un polipéptido o péptido que incluye en el interior de su secuencia de aminoácidos una secuencia de aminoácidos contigua de acuerdo con, o esencialmente correspondiente al polipéptido.

20 Los segmentos de ácido nucleico descritos en el presente documento, sin tener en cuenta la longitud de la propia secuencia de codificación, se pueden combinar con otras secuencias de ácidos nucleicos, tales como promotores, señales de poliadenilación, sitios de enzimas de restricción adicionales, sitios de clonación múltiples, otros segmentos de codificación, y similares, de tal manera que su longitud global puede variar considerablemente. Se contempla por tanto que se pueda emplear un fragmento de ácido nucleico de casi cualquier longitud, limitándose preferiblemente a la longitud total por la facilidad de preparación y uso en el protocolo de ADN recombinante previsto.

30 Se contempla que estas construcciones de ácidos nucleicos puedan codificar polipéptidos de longitud completa procedentes de cualquier fuente o codificar una versión truncada del polipéptido, *por ejemplo*, un polipéptido truncado del virus vaccinia, de tal manera que el transcrito de la región de codificación representa la versión truncada. El transcrito truncado puede a continuación traducirse a una proteína truncada. De forma alternativa, una secuencia de ácido nucleico puede codificar una secuencia de polipéptido de longitud completa con secuencias de codificación heterólogas adicionales, *por ejemplo*, para permitir la purificación del polipéptido, el transporte, la secreción, la modificación posterior a la traducción, o para los beneficios terapéuticos tales como el direccionamiento o la eficacia. Tal como se ha discutido anteriormente, una etiqueta u otro polipéptido heterólogo se puede añadir a la secuencia que codifica el polipéptido modificado, donde “heterólogo” se refiere a un polipéptido que no es el mismo que el polipéptido modificado.

40 En un ejemplo no limitante, se pueden preparar una o más construcciones de ácido nucleico que incluyan un tramo contiguo de nucleótidos idénticos a o complementarios del gen concreto, tal como el gen B18R. Una construcción de ácido nucleico puede ser al menos de 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1.000, 2.000, 3.000, 4.000, 5.000, 6.000, 7.000, 8.000, 9.000, 10.000, 15.000, 20.000, 30.000, 50.000, 100.000, 250.000, 500.000, 750.000, a al menos 1.000.000 de nucleótidos de longitud, así como construcciones de mayor tamaño hasta e incluyendo tamaños cromosómicos (que incluyen todas las longitudes intermedias e intervalos intermedios, dada la llegada de construcciones de ácidos nucleicos tales como cromosomas artificiales de levadura que conocen las personas normalmente expertas en la técnica. Se entenderá fácilmente que las “longitudes intermedias” y los “intervalos intermedios”, que se usan en el presente documento, significan cualquier longitud o intervalo que incluye o que se encuentra entre los valores citados (*es decir*, incluyendo y entre dichos valores).

50 Los segmentos de ADN descritos en el presente documento abarcan equivalentes biológicamente funcionales de polipéptidos y péptidos modificados, *por ejemplo*, una toxina gelonina modificada. Dichas secuencias pueden surgir como consecuencia de la redundancia del codón y la equivalencia funcional que son conocidas por producirse naturalmente en el interior de las secuencias de ácidos nucleicos y las proteínas codificadas de esta manera. De forma alternativa, las proteínas o péptidos funcionalmente equivalentes se pueden crear mediante la aplicación de tecnología de ADN recombinante, en la que los cambios en la estructura de la proteína se pueden diseñar mediante ingeniería genética. Basándose en las consideraciones de las propiedades de los aminoácidos que se están intercambiando. Se pueden introducir cambios diseñados por el ser humano mediante la aplicación de técnicas de mutagénesis dirigida al emplazamiento, *por ejemplo*, para introducir mejoras en la antigenicidad de la proteína, para reducir los efectos de toxicidad de la proteína *in vivo* a un sujeto al que se ha administrado la proteína, o para aumentar la eficacia de cualquier tratamiento que implica la proteína.

65 Son de nuevo útiles los segmentos de ADN aislados y los vectores recombinantes que incluyen dentro de su secuencia una secuencia de ácido nucleico contigua procedente de las que se muestran en las secuencias identificadas en el presente documento. Dichas secuencias, sin embargo, pueden mutarse para dar como resultado un producto de proteína cuya actividad está alterada con respecto a la natural.

Los segmentos de ADN descritos en el presente documento abarcan equivalentes biológicamente funcionales de proteínas y péptidos de poxvirus. Dichas secuencias pueden surgir como consecuencia de la redundancia del codón y la equivalencia funcional que se sabe presentes en la naturalezas con secuencias de ácidos nucleicos y las proteínas codificadas de esta manera. De forma alternativa, las proteínas o péptidos funcionalmente equivalentes pueden crearse mediante la aplicación de tecnología de ADN recombinante, donde se pueden diseñar mediante ingeniería genética cambios en la estructura de la proteína, basándose en las consideraciones de las propiedades de los aminoácidos que se están intercambiando. Se pueden introducir cambios diseñados por el hombre mediante la aplicación de técnicas de mutagénesis dirigida al emplazamiento, *por ejemplo*, para introducir mejoras en la antigenicidad de la proteína.

Mutagénesis de polinucleótidos de poxvirus

Se puede llevar a cabo la mutagénesis de un polinucleótido que codifica todo o parte de un virus vaccinia mediante varios procedimientos mutagénicos normalizados (Sambrook y *col.*, 1989). La mutagénesis es el procedimiento por el cual se producen cambios en la cantidad o en la estructura de un organismo. La mutación puede implicar la modificación de la secuencia de nucleótidos de un único gen, el bloqueo de genes o de cromosomas completos. Los cambios en genes individuales pueden ser la consecuencia de mutaciones puntuales que implican la eliminación, adición o sustitución de una única base de nucleótidos en el interior de una secuencia de ADN, o puede ser la consecuencia de cambios que implican la inserción o la delección de grandes cantidades de nucleótidos.

Se pueden inducir mutaciones tras la exposición a mutágenos químicos o físicos. Dichos agentes inductores de mutación incluyen la radiación ionizante, la luz ultravioleta y una matriz diversa de agentes químicos tales como agentes alquilantes e hidrocarburos aromáticos policíclicos todos los cuales son capaces de interactuar tanto de forma directa como indirecta (siguiendo generalmente alguna biotransformación metabólica) con ácidos nucleicos. El daño al ADN inducido por dichos agentes puede conducir a modificaciones de las secuencias de bases cuando el ADN afectado se replica o repara y de esta manera dar lugar a una mutación. La mutación puede también dirigirse al emplazamiento mediante el uso de métodos de direccionamiento concretos.

1. Mutagénesis aleatoria

a) Mutagénesis de inserción

La mutagénesis de inserción se basa en la inactivación de un gen mediante la inserción de un fragmento de ADN conocido. Debido a que esto implica la inserción de algún tipo de fragmento de ADN, las mutaciones generadas tienen generalmente una pérdida de función, en lugar de mutaciones con ganancia de función. Sin embargo, existen algunos ejemplos de inserciones que generan mutaciones con ganancias de función. Las mutaciones de inserción han sido muy satisfactorias en bacterias y *Drosophila* (Cooley y *col.* 1988) y recientemente se han convertido en una poderosa herramienta en el maíz (Marks y *col.*, 1991; Koncz y *col.* 1990); y *Antirrhinum* (Sommer y *col.* 1990). La mutagénesis de inserción se puede llevar a cabo utilizando técnicas de biología molecular normalizadas.

b) Mutagénesis química

La mutagénesis química ofrece determinadas ventajas, tales como la capacidad de encontrar un intervalo completo de mutaciones con grados de gravedad fenotípica, y es fácil y barata de llevar a cabo. La mayoría de carcinógenos químicos producen mutaciones en el ADN. Benzo [a] pireno, N-acetoxi-2-acetil aminofluoreno y aflotoxina B 1 producen transversiones de GC a TA en bacterias y células de mamíferos. Benzo [a] pireno produce sustituciones de bases tales como de AT a TA. Los compuestos N-nitrosos producen transiciones de GC a AT. La alquilación de la posición 04 de la timina inducida por exposición a n-nitrosoureas da como resultado transiciones de TA a CG.

c) Mutagénesis de radiación

Las moléculas biológicas se degradan debido a radiaciones ionizantes. La adsorción de la energía incidente conduce a la formación de iones y radicales libres, y a la rotura de algunos enlaces covalentes. La susceptibilidad a la radiación pares ser muy variable entre moléculas, y entre diferentes formas cristalinas de la misma molécula. Estos depende de la dosis total acumulada, y también de la tasa de dosis (si solo están presentes radicales libres, el daño molecular que producen depende de su velocidad de difusión natural y de esta manera en tiempo real).

En el presente documento, "radiación ionizante" significa radiación que comprende partículas o fotones que tienen suficiente energía o pueden producir una energía suficiente para producir ionización (ganancia o pérdida de electrones). Una radiación ionizante a modo de ejemplo y preferida es una radiación de rayos x. La cantidad de radiación ionizante necesaria en una célula dada o para una molécula concreta depende generalmente de la naturaleza de la célula o molécula y de la naturaleza de la mutación diana. Son bien conocidos en la técnica los medios para determinar una cantidad eficaz de radiación.

d) Mutagénesis de barrido *in vitro*

Se puede introducir también una mutagénesis aleatoria utilizando la PCR propensa a error. La velocidad de la mutagénesis puede aumentar llevando a cabo la PCR en múltiples tubos con diluciones de moldes.

Una técnica de mutación particularmente útil es la mutagénesis de barrido de alanina, en la que numerosos restos se sustituyen individualmente con el aminoácido alanina de tal manera que se pueden determinar los efectos de pérdida de las interacciones de las cadenas secundarias, minimizando a la vez el riesgo de perturbaciones a gran escala en la conformación de la proteína (Cunningham y *col.*, 1989).

La mutagénesis de saturación de barrido proporciona un método rápido para obtener una gran cantidad de información de función de la estructura que incluye: (i) identificación de restos que modulan la especificidad de unión al ligando, (ii) una mejor comprensión de la unión al ligando basada en la identificación de aquellos aminoácidos que retienen la actividad y aquellos que detienen la actividad en una localización dada, (iii) una evaluación de la plasticidad global de un sitio activo o subdominio de proteína, (iv) identificación de sustituciones de aminoácidos que dan como resultado un aumento de la unión.

2. Mutagénesis dirigida al emplazamiento

La mutagénesis específica del emplazamiento guiada por la estructura representa una herramienta poderosa para la disección y el diseño mediante ingeniería genética de las interacciones proteína-ligando (Wells, 1996; Braisted y *col.*, 1996). La técnica proporciona la preparación y el ensayo de variantes de secuencias introduciendo uno o más cambios en las secuencias de nucleótidos de un ADN seleccionado.

La mutagénesis dirigida al emplazamiento utiliza secuencias de oligonucleótidos específicos que codifican la secuencia de ADN de la mutación deseada, así como un número suficiente de nucleótidos adyacentes no modificados. De esta manera, se proporciona una secuencia de cebador con suficiente tamaño y complejidad para formar un duplete estable de ambos lados de la unión de delección que se está atravesando. Se prefiere un cebador de aproximadamente 17 a 25 nucleótidos de longitud, con aproximadamente 5 a 10 restos de ambos lados de la unión de la secuencia que se está alterando.

La técnica emplea normalmente un vector bacteriófago que existe en forma tanto monocatenaria como bicatenaria. Los vectores útiles en mutagénesis dirigida al emplazamiento incluyen vectores como el fago M13. Estos vectores fago están comercializados y su uso es generalmente bien conocido de los expertos en la materia. Los plásmidos bicatenarios también se emplean rutinariamente en la mutagénesis dirigida al emplazamiento, que elimina la etapa de transferir el gen de interés desde un fago a un plásmido.

En general, se obtiene en primer lugar un vector monocatenario, o se funden dos hebras de un vector bicatenario, que incluye en el interior de su secuencia una secuencia de ADN que codifica la proteína deseada o el elemento genético. Un cebador de oligonucleótido que soporta la secuencia mutada deseada, preparada de forma sintética, se hibrida a continuación con la preparación de ADN monocatenario, teniendo en cuenta el grado de emparejamiento incorrecto cuando se seleccionan las condiciones de hibridación. El producto hibridado se somete a enzimas de polimerización del ADN tales como la polimerasa I de *E. coli* (fragmento Klenow) a fin de completar la síntesis de la hebra que soporta la mutación. De esta manera, se forma un heteroduplete, donde una hebra codifica la secuencia no mutada original, y la segunda hebra soporta la mutación deseada. A continuación, el vector heteroduplete se usa para transformar las células hospedadoras adecuadas, tales como células de *E. coli*, y se seleccionan clones que incluyen vectores recombinantes que soportan la disposición de la secuencia mutada.

Puede obtenerse más información comprehensiva sobre la significancia funcional y el contenido de información de un resto dado de proteína mediante la mutagénesis de saturación en la que se examinan 19 sustituciones de aminoácidos. El inconveniente de esta solución es que la logística de la mutagénesis de saturación de restos múltiples es una tarea abrumadora (Warren y *col.*, 1996, Zeng y *col.*, 1996; Burton y Barbas, 1994; Yelton y *col.*, 1995; Hilton y *col.*, 1996). Deben estudiarse cientos, y posiblemente incluso miles de mutantes específicos del emplazamiento. Sin embargo, la mejora de las técnicas hace que la producción y el cribado rápido de mutantes sean mucho más directos. Véanse también, las patentes de los Estados Unidos 5. 798. 208 y 5. 830. 650, para la descripción de una mutagénesis de "paseo". Se divulgan otros métodos de mutagénesis dirigida al emplazamiento en las patentes de los Estados Unidos 5. 220. 007; 5. 284. 760; 5. 354. 670; 5. 366. 878; 5. 389. 514; 5. 635. 377; y 5. 789. 166.

60 Vectores

Para generar mutaciones en el genoma de los poxvirus se pueden codificar polipéptidos naturales y modificados por una molécula de ácido nucleico comprendida en un vector. El término "vector" se usa para referirse a una molécula de ácido nucleico portadora en la que se puede insertar una secuencia de ácido nucleico exógena para su introducción en una célula donde se puede replicar. Una secuencia de ácido nucleico puede ser "exógena", lo que significa que es extraña a la célula en la que se está introduciendo el vector o que la secuencia es homóloga a una

secuencia de la célula pero en una posición dentro del ácido nucleico de la célula hospedadora en la que la secuencia no se encuentra de forma ordinaria. Los vectores incluyen plásmidos, cósmidos, virus (bacteriófagos, virus animales, y virus vegetales), y cromosomas artificiales (*por ejemplo*, los YAC). Una persona experta en la materia tiene el conocimiento adecuado para construir un vector mediante técnicas recombinantes normalizadas, que se describen en Sambrook y *col.*, (1989) y Ausubel y *col.*, 1994. Además de codificar un polipéptido modificado tal como una gelonina modificada, un vector puede codificar secuencias polipeptídicas no modificadas tales como una etiqueta o una molécula de direccionamiento. Los vectores útiles que codifican dichas proteínas de fusión incluyen vectores pIN (Inouye y *col.*, 1985), vectores que codifican un tramo de histidinas, y vectores pGEX, para uso en la generación de proteínas de fusión solubles de la glutatión S-transferasa (GST) para su purificación y separación o escisión posteriores. Una molécula direccionadora es aquella que dirige el polipéptido modificado a un órgano, tejido, célula u otra localización concreta en el cuerpo de un sujeto.

El término “vector de expresión” se refiere a un vector que contiene una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos parte de un producto génico capaz de ser transcrito. En algunos casos, las moléculas de ARN se traducen a continuación en una proteína, polipéptido o péptido. En otros casos, estas secuencias no se traducen, *por ejemplo*, en la producción de moléculas de sentido contrario o ribozimas. Los vectores de expresión pueden contener varias “secuencias control”, que se refieren a secuencias de ácidos nucleicos necesarias para la transcripción y posiblemente la traducción de una secuencia de codificación unida de manera operativa en un organismo hospedador concreto. Además de las secuencias control que gobiernan la transcripción y la traducción, los vectores y los vectores de expresión pueden contener secuencias de ácidos nucleicos que sirven también para otras funciones y que se describen *más abajo*.

1. Promotores y potenciadores

Un “promotor” es una secuencia control que es una región de una secuencia de ácido nucleico en la que el inicio y la velocidad de transcripción están controlados. Puede contener elementos genéticos a los que pueden unirse las proteínas y moléculas reguladoras tales como la ARN polimerasa y otros factores de transcripción. Las expresiones “situado de manera operativa”, “unido de manera operativa”, “bajo control”, y “bajo control de la transcripción” significan que un promotor está en una localización y/u orientación funcional correcta en relación con una secuencia de ácido nucleico para controlar el inicio y/o la expresión de la transcripción de esta secuencia. Un promotor puede usarse o no junto con un “potenciador”, que se refiere a una secuencia reguladora que actúa en cis implicada en la activación de la transcripción de una secuencia de ácido nucleico.

Un promotor puede ser uno que se asocia naturalmente con un gen o secuencia, que se puede obtener aislando las secuencias 5' no codificantes, localizadas en la dirección 5' del segmento de codificación y/o el exón. Dicho promotor puede denominarse “endógeno”. De forma similar, un potenciador puede ser uno que se asocia naturalmente con una secuencia de ácido nucleico, localizada tanto en la dirección 3' como en la dirección 5' de esta secuencia. De forma alternativa, se conseguirán determinadas ventajas situando el segmento de ácido nucleico codificante bajo el control de un promotor recombinantes o heterólogo, que se refiere a un promotor que no se asocia normalmente con una secuencia de ácido nucleico en su ambiente natural. Un potenciador recombinante o heterólogo se refiere también a un potenciador que no se asocia normalmente con una secuencia de ácido nucleico en su ambiente natural. Dichos promotores o potenciadores pueden incluir promotores o potenciadores de otros genes, y promotores o potenciadores aislados de cualquier otra célula procarionota, vírica, o eucariota, y promotores o potenciadores que no “se producen naturalmente” *es decir*, que contienen elementos diferentes, de diferentes regiones reguladoras de la transcripción, y/o mutaciones que alteran la expresión. Además de las secuencias que producen ácidos nucleicos de promotores y potenciadores, se pueden producir secuencias sintéticamente utilizando tecnología de clonación recombinante y/o de amplificación de ácidos nucleicos, que incluye la PCR TM, junto con las composiciones descritas en el presente documento (véanse la patente de los Estados Unidos 4. 683. 202 y la patente de los estados Unidos 5. 928. 906. Además, se contempla que se puedan emplear también la transcripción y/o la expresión directa de las secuencias con orgánulos no nucleares tales como mitocondrias, cloroplastos, y similares

Naturalmente, puede ser importante emplear un promotor y/o potenciador que dirija eficazmente la expresión del segmento de ADN en el tipo de célula, orgánulo, y organismo escogido para la expresión. Los expertos en la materia de la biología molecular conocen generalmente el uso de promotores, potenciadores, y combinaciones de tipos celulares para la expresión de la proteína, *por ejemplo*, véase Sambrook y *col* (1989). Los promotores empleados pueden ser constitutivos, específicos de tejido, inducibles, y/o útiles en las condiciones adecuadas para dirigir la expresión de alto nivel del segmento de ADN introducido, de tal manera que sea ventajosa en la producción a gran escala de las proteínas y/o péptidos recombinantes. El promotor puede ser heterólogo o endógeno.

La Tabla 1 relaciona algunos elementos/promotores que se pueden emplear para regular la expresión de un gen. No se pretende que esta relación sea exhaustiva de todos los posibles elementos implicados en la promoción de la expresión, sino, meramente, que sea a modo de ejemplo de la misma. La Tabla 2 proporciona ejemplos de elementos inducibles, que son regiones de una secuencia de ácido nucleico que se puede activar en respuesta a un estímulo específico.

TABLA 1	
Promotor y/o potenciador	
Promotor/Potenciador	Referencias
Cadena pesada de inmunoglobulina	Banerji <i>y col.</i> , 1983; Gilles <i>y col.</i> , 1983; Grosschedl <i>y col.</i> , 1985; Atchinson <i>y col.</i> , 1986, 1987; Imler <i>y col.</i> , 1987; Weinberger <i>y col.</i> , 1984; Kiledjian <i>y col.</i> , 1988; Porton <i>y col.</i> ; 1990
Cadena ligera de inmunoglobulina	Queen <i>y col.</i> , 1983; Picard <i>y col.</i> , 1984
Receptor de linfocitos T	Luria <i>y col.</i> , 1987; Winoto <i>y col.</i> , 1989; Redondo <i>y col.</i> ; 1990
HLA DQ α y/o DQ β	Sullivan <i>y col.</i> , 1987
β -Interferón	Goodbourn <i>y col.</i> , 1986; Fujita <i>y col.</i> , 1987; Goodbourn <i>y col.</i> , 1988
Interleuquina-2	Greene <i>y col.</i> , 1989
Receptor de interleuquina-2	Greene <i>y col.</i> , 1989; Lin <i>y col.</i> , 1990
MHC Clase II 5	Koch <i>y col.</i> , 1989
MHC Clase II HLA-DR α	Sherman <i>y col.</i> , 1989
β -Actina	Kawamoto <i>y col.</i> , 1988; Ng <i>y col.</i> ; 1989
Creatina quinasa muscular (MCK)	Jaynes <i>y col.</i> , 1988; Horlick <i>y col.</i> , 1989; Johnson <i>y col.</i> , 1989
Prealbúmina (Transtiretina)	Costa <i>y col.</i> , 1988
Elastasa I	Omitz <i>y col.</i> , 1987
Metalotioneína (MTII)	Karin <i>y col.</i> , 1987; Culotta <i>y col.</i> , 1989
Colagenasa	Pinkert <i>y col.</i> , 1987; Angel <i>y col.</i> , 1987
Albúmina	Pinkert <i>y col.</i> , 1987; Tronche <i>y col.</i> , 1989, 1990
α -Fetoproteína	Godbout <i>y col.</i> , 1988; Campere <i>y col.</i> , 1989
γ -Globina	Bodine <i>y col.</i> , 1987; Perez-Stabla <i>y col.</i> , 1990
β -Globina	Trudel <i>y col.</i> , 1987
c-fos	Cohen <i>y col.</i> , 1987
c-HA-ras	Triesman, 1986; Deschamps <i>y col.</i> , 1985
Insulina	Edlund <i>y col.</i> , 1985
Molécula de adhesión a células neuronales (NCAM)	Hirsh <i>y col.</i> , 1990
α 1-Antitripaína	Latimer <i>y col.</i> , 1990
H2B (TH2B) Histonas	Hwang <i>y col.</i> , 1990
Ratón y/o Colágeno Tipo I	Ripe <i>y col.</i> , 1989
Proteínas reguladas por glucosa (GRP94 y GRP78)	Chang <i>y col.</i> , 1989
Hormona del crecimiento de rata	Larsen <i>y col.</i> , 1986
Amiloide A humano sérico (SAA)	Edbrooke <i>y col.</i> , 1989
Troponina I (TN I)	Yutzey <i>y col.</i> , 1989
Factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF)	Pech <i>y col.</i> , 1989
Distrofia muscular de Duchenne	Klamut <i>y col.</i> , 1990
SV40	Banerji <i>y col.</i> , 1981; Moreau <i>y col.</i> , 1981; Sleigh <i>y col.</i> , 1985; Firak <i>y col.</i> , 1986; Herr <i>y col.</i> , 1986; Imbra <i>y col.</i> , 1986; Kadesch <i>y col.</i> , 1986; Wang <i>y col.</i> , 1986; Ondek <i>y col.</i> , 1987; Kuhl <i>y col.</i> , 1987; Schaffner <i>y col.</i> , 1988
Polioma	Swartzendruber <i>y col.</i> , 1975; Vasseur <i>y col.</i> , 1980; Katinka <i>y col.</i> , 1980, 1981; Tyndell <i>y col.</i> , 1981; Dandolo <i>y col.</i> , 1983; de Villiers <i>y col.</i> , 1984; Hen <i>y col.</i> , 1986; Satake <i>y col.</i> , 1988; Campbell <i>y col.</i> , 1988
Retrovirus	Kriegler <i>y col.</i> , 1982, 1983; Levinson <i>y col.</i> , 1982; Kriegler <i>y col.</i> , 1983, 1984a, b, 1988; Bosze <i>y col.</i> , 1986; Miksicsek <i>y col.</i> , 1986; Celander <i>y col.</i> , 1987; Thiesen <i>y col.</i> , 1988; Celander <i>y col.</i> , 1988; Chol <i>y col.</i> , 1988; Reisman <i>y col.</i> , 1989

Virus del papiloma	Campo <i>y col.</i> , 1983; Lusky <i>y col.</i> , 1983; Spandidos y Wilkie, 1983; Spalholz <i>y col.</i> , 1985; Lusky <i>y col.</i> , 1986; Cripe <i>y col.</i> , 1987; Gloss <i>y col.</i> , 1987; Hirochika <i>y col.</i> , 1987; Stephens <i>y col.</i> , 1987
Virus de la hepatitis B	Bulla <i>y col.</i> , 1986; Jameel <i>y col.</i> , 1986; Shaul <i>y col.</i> , 1987; Spandau <i>y col.</i> , 1988; Vannice <i>y col.</i> , 1988
Virus de la inmunodeficiencia humana	Muesing <i>y col.</i> , 1987; Hauber <i>y col.</i> , 1988; Jakobovits <i>y col.</i> , 1988; Feng <i>y col.</i> , 1988; Takebe <i>y col.</i> , 1988; Rosen <i>y col.</i> , 1988; Berkhout <i>y col.</i> , 1989; Laspia <i>y col.</i> , 1989; Sharp <i>y col.</i> , 1989; Braddock <i>y col.</i> , 1989
Citomegalovirus (CMV)	Weber <i>y col.</i> , 1984; Boshart <i>y col.</i> , 1985; Foecking <i>y col.</i> , 1986
Virus de la leucemia del gibón	Holbrook <i>y col.</i> , 1987; Quinn <i>y col.</i> , 1989

TABLA 2
Elementos inducibles

Elemento	Inductor	Referencias
MT II	Éster de forbol (TFA) Metales pesados	Palmiter <i>y col.</i> , 1982; Haslinger <i>y col.</i> , 1985; Searle <i>y col.</i> , 1985; Stuart <i>y col.</i> , 1985; Imagawa <i>y col.</i> , 1987, Karin <i>y col.</i> , 1987; Angel <i>y col.</i> , 1987b; McNeill <i>y col.</i> , 1989
MMTV (virus del tumor mamario del ratón)	Glucocorticoides	Huang <i>y col.</i> , 1981; Lee <i>y col.</i> , 1981; Majors <i>y col.</i> , 1983; Chandler <i>y col.</i> , 1983; Lee <i>y col.</i> , 1984; Ponta <i>y col.</i> , 1985; Sakai <i>y col.</i> , 1988
β-Interferón	poli(rl)x poli(rc)	Tavernier <i>y col.</i> , 1983
Adenovirus 5 E2	E1A	Imperiale <i>y col.</i> , 1984
Colagenasa	Éster de forbol (TPA)	Angel <i>y col.</i> , 1987a
Estromelisinina	Éster de forbol (TPA)	Angel <i>y col.</i> , 1987b
SV40	Éster de forbol (TPA)	Angel <i>y col.</i> , 1987b
Gen MX murino	Interferón, Virus de la enfermedad de Newcastle	Hug <i>y col.</i> , 1988
Gen GRP78	A23187	Resendez <i>y col.</i> , 1988
α-2-Macroglobulina	IL-6	Kunz <i>y col.</i> , 1989
Vimentina	Suero	Rittling <i>y col.</i> , 1989
Gen H-2kb de MHC Clase I	Interferón	Blonar <i>y col.</i> , 1989
HSP70	E1A, Antígeno T grande SV40	Taylor <i>y col.</i> , 1989, 1990a, 1990b
Proliferina	Éster de forbol -TPA	Mordacq <i>y col.</i> , 1989
Factor de necrosis tumoral	PMA	Hensel <i>y col.</i> , 1989
Gen de la hormona α estimulante del tiroides	Hormona tiroidea	Chatterjee <i>y col.</i> , 1989

Los expertos en la materia conocen bien la identidad de los promotores o elementos específicos de tejido, así como los ensayos para caracterizar su actividad. Los ejemplos de dichas regiones incluyen el gen LIMK2 humano (Nomoto *y col.*, 1999) el gen del receptor 2 de la somatostatina (Kraus *y col.*, 1998), el gen de unión al ácido retinoico epididímico de murino (Lareyre *y col.*, 1999), CD4 humano (Zhao-Emonet *y col.*, 1998), colágeno alfa 2 (XI) de ratón (Tsumaki, *y col.*, 1998), el gen del receptor de la dopamina D1A (Lee, *y col.*, 1997), factor de crecimiento de tipo insulina (Wu *y col.*, 1997), molécula 1 de adhesión endotelial celular de plaquetas humanas (Almendo *y col.*, 1996), y promotor SM22α.

Se contemplan también como útiles los promotores de la dectina-1 y la dectina-2. En las Tablas 1 y 2 se relacionan promotores víricos adicionales, promotores/potenciadores celulares y promotores/potenciadores inducibles que podrían utilizarse. Adicionalmente, podría utilizarse cualquier combinación de promotor/potenciador (según la base de datos EPDB de promotores eucarióticos) para impulsar la expresión de los genes estructurales que codifican las enzimas procesadoras de oligosacáridos, las proteínas auxiliares del plegado de la proteína, las proteínas marcadoras seleccionables o una proteína heteróloga de interés. De forma alternativa, se puede emplear un promotor específico de tejido para la terapia génica del cáncer (Tabla 3) o el direccionamiento de tumores (Tabla 4).

TABLA 3:

Promotores específicos de tejido candidatos para tratamiento genético del cáncer		
Promotor específico de tejido	Cánceres en los que el promotor es activo	Células normales en las que el promotor es activo
Antígeno carcinoembrionario (CEA)*	Mayoría de carcinomas colorrectales; 50 % de carcinomas de pulmón; 40-50 % de carcinomas gástricos; mayoría de carcinomas pancreáticos; muchos carcinomas de mama	Mucosa colónica; mucosa gástrica; epitelios pulmonares; glándulas sudoríparas; células testiculares
Antígeno específico de la próstata (PSA)	Mayoría de carcinomas de próstata	Epitelio prostático
Péptido vasoactivo intestinal (VIP)	Mayoría de cánceres de pulmón no microcíticos	Neuronas; linfocitos, mastocitos; eosinófilos
Tensioactivo proteína A (SP-A)	Muchos adenocarcinomas de pulmón	Neumocitos de tipo II; Clara
Homólogo de achaete-scute humano (hASH)	Mayoría de cánceres de pulmón no microcíticos	Células neuroendocrinas del pulmón
Mucina-1 (MUC1)**	Mayoría de adenocarcinomas (originados en cualquier tejido)	Células epiteliales glandulares en la mama y en los tractos respiratorio, gastrointestinal, y genitourinarios
Alfa-fetoproteína	Mayoría de carcinomas hepatocelulares; posiblemente muchos cánceres testiculares	Hepatocitos (en algunas condiciones); testículos
Albúmina	Mayoría de carcinomas hepatocelulares	Hepatocitos
Tirosinasa	Mayoría de melanomas	Melanocitos; astrocitos; células de Schwann; algunas neuronas
Proteína de unión a tirosina (TRP)	Mayoría de melanomas	Melanocitos; astrocitos; células de Schwann; algunas neuronas
Queratina 14	Supuestamente muchos carcinomas espinocelulares (<i>por ejemplo</i> , cánceres de cabeza y cuello)	Queratinocitos
EBV LD-2	Muchos carcinomas espinocelulares de cabeza y cuello	Queratinocitos del digestivo superior Queratinocitos del tracto digestivo superior
Proteína ácida fibrilar glial (GFAP)	Muchos astrocitomas	Astrocitos
Proteína mielina básica (MBP)	Muchos gliomas	Oligodendrocitos
Angiotensina específica de testículo – Enzima convertidora de la angiotensina específica de testículo (ACE específica de testículo)	Posiblemente muchos cánceres testiculares	Espermatozoides
Osteocalcina	Posiblemente muchos osteosarcomas	Osteoblastos

TABLA 4:

Promotores candidatos para su uso en direccionamiento específico de tejido tumoral		
Promotor específico de tejido	Cánceres en los que el promotor es activo	Células normales en las que el promotor es activo
Promotor regulado por E2F	Casi todos los cánceres	Células en proliferación
HLA-G	Muchos carcinomas colorrectales; muchos melanomas; posiblemente muchos otros cánceres	Linfocitos; monocitos; espermatozoides; trofoblastos

FasL	Mayoría de melanomas; muchos carcinomas pancreáticos; mayoría de astrocitoma posiblemente muchos otros cánceres	Leucocitos activados: neuronas; células endoteliales; queratinocitos; células de tejidos inmunoprivilegiados; algunas células en pulmones, ovarios, hígado, y próstata
Promotor regulado por Myc	Mayoría de carcinomas de pulmón (tanto microcítico como no microcítico); mayoría de carcinomas rectales	Células en proliferación (solamente algunos tipos de células), células epiteliales de mama (incluyendo no en proliferación)
MAGE-1	Muchos melanomas; algunos carcinomas de pulmón no microcíticos ; algunos carcinomas de mama	Testículos
VEGF	70 % de todos los cánceres (expresión en exceso constitutiva en muchos cánceres)	Células en lugares de neovascularización (pero poco probable en tumores, la expresión es transitoria, menos intensa y nunca constitutiva)
bFGF	Supuestamente muchos cánceres diferentes, ya que la expresión de bFGF se induce por condiciones isquémicas	Células en lugares de isquemia (pero poco probable en tumores, la expresión es transitoria, menos intensa y nunca constitutiva)
COX-2	Mayoría de carcinomas colorrectales; muchos carcinomas de pulmón; posiblemente muchos otros cánceres	Células en lugares de inflamación
IL-10	Mayoría de carcinomas colorrectales; muchos carcinomas de pulmón; muchos carcinomas espinocelulares de cabeza y cuello; posiblemente muchos otros cánceres	Leucocitos
GRP78/BiP	Posiblemente muchos cánceres diferentes, ya que la expresión de GRP78 se induce por condiciones específicas del tumor	Células en lugares de isquemia
Elementos CarG de Egr-1	Inducido por radiación ionizante, por lo que se puede pensar en la mayoría de tumores producidos por radiación	Células expuestas a radiación ionizante; leucocitos

2. Señales de inicio y sitios internos de unión a ribosoma

5 Puede necesitarse también una señal de inicio específica para una traducción eficaz de las secuencias de codificación. Estas señales incluyen el codón de inicio ATG o las secuencias adyacentes. Puede ser necesario proporcionar señales exógenas para el control de la traducción que incluyan el codón de inicio ATG. Una persona normalmente experta en la materia será capaz de determinar fácilmente estas y proporcionar las señales necesarias. Es bien sabido que el codón de inicio debe estar “en marco” respecto al marco de lectura de la secuencia de codificación deseada para asegurar la traducción de la inserción completa. Las señales exógenas para el control de la traducción y los codones de inicio pueden ser tanto naturales como sintéticos. La eficacia de la expresión puede estar potenciada por la inclusión de elementos potenciadores de la transcripción adecuados.

10 Se pueden usar elementos de los sitios internos de entrada al ribosoma para crear mensajes multigénicos o policistrónicos. Los elementos IRES son capaces de derivatizar el modelo de barrido del ribosoma de la traducción dependiente de Cap 5' metilado y comenzar la traducción en sitios internos (Pelletier y Sonenberg, 1988). Se han descrito elementos IRES procedentes de dos miembros de la familia picornavirus (polio y encefalomiocarditis) (Pelletier y Sonenberg, 1988), así como IRES procedente de un mensaje de mamífero (Macejak y Sarnow, 1991). Se pueden unir elementos IRES a marcos de lectura abiertos heterólogos. Se pueden transcribir múltiples marcos de lectura abiertos juntos, separados cada uno por un IRES, creando mensajes policistrónicos. En virtud del elemento IRES, cada marco de lectura abierto es accesible a ribosomas para una traducción eficaz. . Se pueden expresar eficazmente múltiples genes utilizando un único promotor/potenciador para transcribir un único mensaje (véase las Patentes de los Estados Unidos 5. 925, 565 y 5. 935. 819

3. Sitios de clonación múltiple

25 Los vectores pueden incluir un sitio de clonación múltiple (MCS), que es una región del ácido nucleico que contiene múltiples sitios de enzimas de restricción, cualquiera de los cuales se puede usar junto con la tecnología recombinante normalizada para digerir el vector. (Véanse Carbonelli y col., 1999, Levenson y col., 1998, y Cocea,

1997). “Digestión con enzima de restricción” se refiere a la escisión catalítica de una molécula de ácido nucleico con una enzima que funciona solamente en ubicaciones específicas de una molécula de ácido nucleico. Están comercialmente disponibles muchas de estas enzimas de restricción. El uso de dichas enzimas es ampliamente conocido por los expertos en la materia. Frecuentemente, se linealiza o fragmenta un vector utilizando una enzima de restricción que corta en el interior del MCS para permitir que una secuencias exógenas al vector. “Ligadura” se refiere al procedimiento para formar enlaces de fosfodiéster entre dos fragmentos de ácidos nucleicos, que pueden ser o no contiguos entre sí. Las técnicas que implican las enzimas de restricción y las enzimas de ligadura son bien conocidas por los expertos en la materia de la tecnología recombinante.

10 4. Sitios de corte y empalme

La mayoría de las moléculas de ARN transcritas experimentan el corte y empalme del ARN para eliminar intrones procedentes de los transcritos primarios. Los vectores que contienen secuencias eucarióticas genómicas pueden requerir sitios de corte y empalmen donantes y/o aceptores para asegurar un procesamiento adecuado del transcrito para la expresión de la proteína. (Véase Chandler y col., 1997).

15 5. Señales de terminación

Los vectores o construcciones comprenderán generalmente al menos una señal de terminación. Una “señal de terminación” o “terminador” está comprendida por secuencias de ADN implicadas en la terminación específica de un transcrito de ARN por una ARN polimerasa. De esta manera, en determinadas realizaciones, se contempla una señal de terminación que finalice la producción de un transcrito de ARN. Puede ser necesario un terminador para conseguir *in vivo* niveles de mensaje deseables

En sistemas eucarióticos, la región terminadora puede comprender también secuencias de ADN específicas que permiten la escisión específica del emplazamiento del nuevo transcrito con el fin de exponerlo a un sitio de poliadenilación. Estas señales añaden una polimerasa endógena especializada a un tramo de aproximadamente 200 restos A (poli A) en el extremo 3' del transcrito. Las moléculas de ARN modificadas con esta cola poliA parecen ser más estables y se transfieren con más eficacia. De esta manera, en otras realizaciones que implican eucariotas, se prefiere que el terminador comprenda una señal para la escisión del ARN, y se prefiere más que la señal del terminador promueva la poliadenilación del mensaje. El terminador y los elementos del sitio de poliadenilación pueden servir para potenciar los niveles del mensaje y/o para minimizar la lectura a través del casete en otras secuencias.

Los terminadores que son útiles incluyen cualquier terminador de la transcripción conocido descrito en el presente documento o conocido por la persona normalmente experta en la materia, incluyendo, pero sin limitarse a, *por ejemplo*, las secuencias de terminación de genes, tal como el terminador de la hormona del crecimiento bovina o las secuencias de terminación vírica, tales como el terminador del SV40. En determinadas realizaciones, la señal de terminación puede ser una ausencia de secuencias que se puedan transcribir o traducir, tal como la debida a un truncamiento de la secuencia.

40 6 Señales de poliadenilación

En la expresión, particularmente la expresión en eucariotas, se incluirá normalmente una señal de poliadenilación para efectuar la poliadenilación adecuada del transcrito. No se cree que la naturaleza de la señal de poliadenilación sea crucial, y/o se puede emplear cualquiera de dichas secuencias. Las realizaciones preferidas incluyen la señal de poliadenilación del SV40 y/o la señal de poliadenilación de la hormona del crecimiento bovina, cómoda y/o conocida por funcionar bien en diversas células diana. La poliadenilación puede aumentar la estabilidad del transcrito o puede facilitar el transporte citoplasmático.

50 7. Orígenes de la replicación

Para propagar un vector en una célula hospedadora, este puede contener uno o más orígenes de sitios de replicación (denominados a menudo “ori”, que es una secuencia de ácidos nucleicos específica en la que se inicia la replicación). De forma alternativa, si la célula hospedadora es una levadura, se puede emplear una secuencia que se replica de manera autónoma (ARS).

8. Marcadores que se pueden seleccionar y cribar

Las células que contienen una construcción de ácido nucleico se pueden identificar *in vitro* o *in vivo* incluyendo un marcador en el vector de expresión. Dichos marcadores conferirían un cambio identificable en la célula permitiendo una fácil identificación de las células que contienen el vector de expresión. Generalmente, un marcador seleccionable es uno que contiene una propiedad que permite la selección. Un marcador seleccionable positivo es uno en el que la presencia del marcador permite su selección, mientras que un marcador seleccionable negativo es uno en el que su presencia evita su selección. Un ejemplo de marcador seleccionable positivo es un marcador de resistencia a fármacos.

Usualmente, la inclusión de un marcador de selección de fármacos ayuda en la clonación e identificación de transformantes, *por ejemplo*, genes que confieren resistencia a la neomicina, puromicina, higromicina, DHFR, GPT, zeocina e histidinol son marcadores seleccionables útiles. Además de los marcadores que confieren un fenotipo que permite la discriminación de transformantes basada en la implementación de condiciones, se contemplan también otros tipos de marcadores que incluyen marcadores que se pueden cribar tales como GFP cuya base es el análisis colorimétrico. De forma alternativa, se pueden utilizar enzimas que se pueden cribar tales como la timidina quinasa (tk) del virus del herpes simple o la cloranfenicol acetiltransferasa (CAT). Un experto en la materia conocerá como emplear los marcadores inmunógenos, posiblemente junto con el análisis FACS. El marcador utilizado no se cree que sea importante, siempre que sea capaz de expresarse de forma simultánea con el ácido nucleico que codifica un producto génico. Los expertos en la materia conocen bien los ejemplos de marcadores seleccionables y que se pueden cribar.

Células hospedadoras

Tal como se usa en el presente documento, los términos “célula”, “línea de células”, y “cultivo de células” se pueden usar de forma indistinta. Todos estos términos incluyen también su progenie, que es cualquiera y todas las generaciones posteriores. Se entiende que toda la progenie puede no ser idéntica debido a mutaciones deliberadas o inadvertidas. En el contexto de la expresión de una secuencia de ácido nucleico heteróloga, “célula hospedadora” se refiere a una célula procariota o eucariota, y esta incluye cualquier organismo transformable que sea capaz de replicar un vector y/o expresar un gen heterólogo codificado por un vector. Una célula hospedadora puede ser, y se ha utilizado como, un receptor de vectores o virus (que no se califica como un vector si no expresa polipéptidos exógenos). Una célula hospedadora puede “transfectarse” o “transformarse”, lo que se refiere a un procedimiento por el cual el ácido nucleico exógeno, tal como una secuencia de codificación de proteína modificada, se transfiere o introduce en la célula hospedadora una célula transformada incluye la célula sujeto primaria y su progenie.

Se pueden derivar células hospedadoras, de células de procariotas o eucariotas, que incluyen células de levaduras, células de insectos, y células de mamíferos, dependiendo de si el resultado deseado es la replicación del vector o la expresión de una parte o todas las secuencias de ácidos nucleicos que codifican el vector. Están disponibles numerosas líneas de células y cultivos para el uso como una célula hospedadora, y se pueden obtener a través de la American Type Culture Collection (ATCC), que es una organización que sirve como archivo de cultivos vivos y de materiales genéticos (www.atcc.org). Un experto en la materia puede determinar un hospedador adecuado basándose en la estructura del vector y en el resultado deseado. Se puede introducir un plásmido o cósmido *por ejemplo* en una célula hospedadora procariota para la replicación de muchos vectores. Las células bacterianas utilizadas como células hospedadoras para la replicación y/o la expresión del vector incluyen DH5 α , JM109, y KC8 así como numerosos hospedadores bacterianos comercialmente disponibles tales como SURE $\text{\textcircled{R}}$ Competent Cells y SOLOPACK TM Gold Cells (STRATAGENE $\text{\textcircled{R}}$, La Jolla, CA). De forma alternativa, podrían utilizarse células bacterianas tales como *E. coli* LE392 para los virus de fagos. Las células de levaduras adecuadas incluyen *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces pombe*, y *Pichia pastoris*.

Los ejemplos de células hospedadoras eucariotas para la replicación y/o la expresión de un vector incluyen HeLa, NIH3T3, Jurkat, 293, Cos, CHO, Saos, y PC 12. Están disponibles muchas células hospedadoras procedentes de diversos tipos de células y organismos y los expertos en la materia podrían reconocerlas. De forma similar, se puede usar un vector vírico junto tanto con una célula hospedadora eucariota como procariota, particularmente una que sea permisiva para la replicación o la expresión del vector.

Algunos vectores pueden emplear secuencias control que les permita replicarse y/o expresarse en células procariotas y eucariotas.

50 Sistemas de expresión

Existen numerosos sistemas de expresión que comprenden al menos una parte o todas las composiciones descritas anteriormente. Se pueden emplear sistemas basados en procariotas y/o eucariotas para producir secuencias de ácidos nucleico, o sus polipéptidos, proteínas y péptidos análogos. Muchos de dichos sistemas están comercial y ampliamente disponibles.

El sistema de células de insecto/baculovirus puede producir un nivel elevado de expresión de la proteína de un segmento de ácido nucleico heterólogo, tal como se describe en las Patentes de los Estados Unidos N os 5. 871. 986, 4. 879. 326 y que se pueden comprar, *por ejemplo*, con el nombre MAXBAC $\text{\textcircled{R}}$ 2.0 de INVITROGEN $\text{\textcircled{R}}$ y BACPACK TM BACULOVIRUS EXPRESSION SYSTEM de CLONTECH $\text{\textcircled{R}}$.

Además de los sistemas de expresión descritos, otros ejemplos de sistemas de expresión incluyen los sistemas inducibles de expresión en mamíferos COMPLETE CONTROL TM de STRATAGENE $\text{\textcircled{R}}$ que implican un receptor sintético inducible por ecdisoma, o su sistema de expresión pET, un sistema de expresión en *E. coli*. Otro ejemplo de un sistema de expresión inducible está disponible de INVITROGEN $\text{\textcircled{R}}$ que incluye el sistema T-REX TM (expresión regulada por tetraciclina), un sistema inducible de expresión en mamíferos que utiliza el promotor de CMV de

longitud completa. INVITROGEN® proporciona también un sistema de expresión en levadura denominado el Sistema de Expresión en *Pichia methanolica*, que está diseñado para la producción a alto nivel de proteínas recombinantes en la levadura metilotrófica *Pichia methanolica*

5 Detección del ácido nucleico

Además de su uso para dirigir la expresión de las proteínas, polipéptidos y/o péptidos del virus vaccinia, las secuencias de ácidos nucleicos descritas en el presente documento tienen varios usos diferentes. *Por ejemplo*, tienen utilidad como sondas o cebadores para las realizaciones que implican la hibridación del ácido nucleico. Se pueden usar en métodos diagnósticos o de cribado.

1. Hibridación

El uso de una sonda o cebador de entre 13 y 100 nucleótidos, preferentemente 17 y 100 nucleótidos de longitud, o hasta 1-2 kilobases o más de longitud, permite la formación de una molécula duplete que es a la vez estable y selectiva. Se prefieren generalmente las moléculas que tienen secuencias complementarias sobre tramos mayores de 20 bases de longitud, para aumentar la estabilidad y/o la selectividad de las moléculas híbridadas obtenidas. Se preferirá diseñar generalmente moléculas de ácido nucleico para la hibridación que tengan una o más secuencias complementarias de 20 a 30 nucleótidos o incluso más longitud cuando se desea. Dichos fragmentos pueden prepararse fácilmente, *por ejemplo*, sintetizando directamente el fragmento por medios químicos o introduciendo secuencias seleccionadas en los vectores recombinantes para la producción recombinante.

De acuerdo con esto, se pueden usar secuencias de nucleótidos por su capacidad de formar selectivamente moléculas duplete con tramos complementarios de ADN y/o ARN o para proporcionar cebadores para la amplificación del ADN o del ARN de las muestras. Dependiendo de la aplicación prevista, se podría desear emplear diversas condiciones de hibridación para conseguir grados variables de la sonda o los cebadores para la secuencia diana.

En aplicaciones que requieren una elevada selectividad, se desearía normalmente emplear condiciones de rigor relativamente elevadas para formar los híbridos. *Por ejemplo*, condiciones de concentración salina relativamente bajas y/o de elevada temperatura, tales como las proporcionadas por NaCl aproximadamente 0,02 M a aproximadamente 0,10 M a temperaturas de aproximadamente 50 °C a aproximadamente 70 °C. Dichas condiciones de elevado rigor toleran pocos emparejamientos incorrectos, de tolerar alguno, entre la sonda o los cebadores y el molde o la hebra diana, y serían particularmente adecuados para aislar genes específicos o para detectar transcritos de ARNm específicos. Se aprecia generalmente que las condiciones se pueden volver más rigurosas mediante la adición de cantidades crecientes de formamida.

En determinadas aplicaciones, *por ejemplo*, mutagénesis dirigida al emplazamiento, se aprecia que se prefieren condiciones de rigor más bajas. Bajo estas condiciones, se puede producir la hibridación incluso aunque las secuencias de las hebras que se hibridan no sean perfectamente complementarias, sino que estén emparejadas de manera incorrecta en una o más posiciones. Las condiciones se pueden volver menos rigurosas aumentando la concentración salina y/o disminuyendo la temperatura, *Por ejemplo*, podría proporcionarse una condición de rigor medio por NaCl aproximadamente 0,1 a 0,25 M a temperaturas de aproximadamente 37 °C a aproximadamente 55 °C, mientras que podría proporcionarse una condición de rigor bajo por una sal aproximadamente 0,15 M a aproximadamente 0,9 M, a temperaturas que varían desde aproximadamente 20 °C a aproximadamente 55 °C. Las condiciones de hibridación pueden manipularse fácilmente dependiendo de los resultados deseados.

En otras realizaciones, se puede conseguir la hibridación en condiciones de, *por ejemplo*, Tris-HCl 50 mM (pH 8,3), KCl 75 mM, MgCl₂ 3 mM, ditiotreitól 1,0 mM, a temperaturas entre aproximadamente 20 °C a aproximadamente 37 °C. Otras condiciones de hibridación utilizadas podrían incluir Tris-HCl aproximadamente 10 mM (pH 8,3), KCl 50 mM, MgCl₂ 1,5 mM, a temperaturas que varían desde aproximadamente 40 °C a aproximadamente 72 °C.

En determinadas realizaciones, será ventajoso emplear ácidos nucleicos de secuencias definidas en combinación con medios adecuados, tales como una marca, para determinar la hibridación. Se conocen en la técnica una amplia variedad de medios indicadores adecuados, que incluyen ligandos fluorescentes, radioactivos, enzimáticos u otros ligandos, tales como avidina/biotina, que se pueden detectar. En las realizaciones preferidas, se puede desear emplear una marca o una etiqueta de enzima fluorescente tal como ureasa, fosfatasa o peroxidasa alcalina, en vez de radioactiva u otros reactivos ambientalmente no deseables. En el caso de las etiquetas de enzimas, se sabe que se pueden emplear sustratos indicadores colorimétricos para proporcionar un medio de detección que sea visible o espectrofotométricamente detectable, para identificar la hibridación específica con las muestras que contienen ácidos nucleicos complementarios.

En general, se prevé que las sondas o cebadores descritos en el presente documento sean útiles como reactivos para hibridación en disolución, como en la PCR™, para la detección de la expresión de los genes correspondientes, así como en las realizaciones que emplean una fase sólida. En las realizaciones que implican una fase sólida, el ADN (o el ARN) de prueba se adsorbe o se fija de otra manera a una matriz o superficie seleccionada. Este ácido

nucleico monocatenario fijo se somete a hibridación con las sondas seleccionadas en las condiciones deseadas las condiciones seleccionadas dependerán de las circunstancias concretas (dependiendo, *por ejemplo* del contenido de G + C, el tipo de ácido nucleico diana, la fuente de ácido nucleico, el tamaño de la sonda de hibridación, etc.). Los expertos en la materia conocen bien la optimización de las condiciones de hibridación de la aplicación concreta de interés. Tras lavar las moléculas hibridadas para eliminar las moléculas de la sonda no específicamente unidas, se detecta y/o se cuantifica la hibridación, determinando la cantidad de la marca unida. Los métodos representativos de hibridación en fase sólida se describen en las patentes de los Estados Unidos 5. 843. 663, 5. 900. 481 y 5. 919. 626. Otros métodos de hibridación que se pueden usar se describen en las patentes de los Estados Unidos 5. 849. 481, 5. 849. 486 y 5. 851. 772.

2. Amplificación de ácidos nucleicos

Los ácidos nucleicos usados como molde para la amplificación se pueden aislar de células, tejidos u otras muestras de acuerdo con las metodologías normalizadas (Sambrook y *col.*, 1989). En determinadas realizaciones, se lleva a cabo el análisis sobre la célula completa o los homogenados de tejidos o las muestras de fluidos biológicos sin purificación sustancial del molde de ácido nucleico. El ácido nucleico puede ser ADN genómico o fraccionado o ARN celular completo. Cuando se usa ARN, se puede desear convertir en primer lugar el ARN a un ADN complementario.

Se entiende que el término "cebador", tal como se usa en el presente documento, abarca cualquier ácido nucleico que sea capaz de cebar la síntesis de un ácido nucleico nascente en el procedimiento dependiente del molde. Normalmente, los cebadores son oligonucleótidos procedentes de 10 a veinte y/o treinta pares de bases de longitud, pero se pueden emplear secuencias más largas. Se pueden proporcionar cebadores en forma bicatenaria y/o monocatenaria, aunque se prefiere la forma monocatenaria.

Las parejas de cebadores diseñadas para hibridarse selectivamente con los ácidos nucleicos que corresponden a las secuencias de genes identificadas en el presente documento se ponen en contacto con el molde de ácido nucleico en condiciones que permiten la hibridación selectiva. Dependiendo de la aplicación deseada, se pueden seleccionar condiciones de rigor elevado que solo permitan la hibridación con secuencias que son completamente complementarias con los cebadores. En otras realizaciones, se puede producir la hibridación en condiciones de rigor reducido para permitir la amplificación de los ácidos nucleicos que contienen uno o más emparejamientos incorrectos con las secuencias del cebador. Una vez hibridados, el complejo del molde-cebador se pone en contacto con una o más enzimas que faciliten la síntesis del ácido nucleico dependiente del molde. Se llevan a cabo múltiples ciclos de amplificación, denominados también como "ciclos", hasta que se produce una cantidad suficiente del producto de la amplificación.

El producto de la amplificación se puede detectar o cuantificar. En determinadas aplicaciones, la detección se puede llevar a cabo por medios visuales. De forma alternativa, la detección puede implicar la identificación indirecta del producto mediante quimioluminiscencia, gammagrafía radioactiva de una radiomarca o marca fluorescente incorporada o incluso mediante un sistema que utiliza señales de impulsos eléctricos y/o térmicos

Están disponibles numerosos procedimientos dependientes de moldes para amplificar las secuencias de oligonucleótidos presentes en una muestra de molde dada. Uno de los métodos de amplificación mejor conocidos es la reacción en cadena de la polimerasa (denominada PCRTM) que se describe en detalle en las patentes de los Estados Unidos 4. 683. 195, 4. 683. 202 y 4. 800,159, y en Innis y *col.*, 1988

Se puede llevar a cabo un procedimiento de amplificación de la PCRTM mediante la transcriptasa inversa para cuantificar la cantidad de ARNm amplificado. Son bien conocidos los métodos de transcribir de manera inversa ARN en ADNc (véase Sambrook y *col.*, 1989). Los métodos alternativos para la transcripción inversa utilizan ADN polimerasas termoestables. Se describen estos métodos en el documento WO 90/07641. Son bien conocidas en la técnica las metodologías de la reacción en cadena de la polimerasa. Los métodos representativos de la RT-PCR se describen en la patente de los Estados Unidos 5. 882. 864.

Otro método de amplificación es la reacción en cadena de la ligasa ("LCR"), descrita en la solicitud europea N° 320.308. La PATENTE de los Estados Unidos 4. 883. 750 describe un método similar a la LCR para la unión de parejas de sondas con una secuencia diana. Se puede usar también el método basado en la PCRTM y el ensayo de la oligonucleótido ligasa (OLA), descrito en la patente de los Estados Unidos 5. 912. 148.

Los métodos alternativos para la amplificación de secuencias de ácidos nucleicos diana que se pueden usar en las patentes de los Estados Unidos 5. 843. 650, 5. 846. 709, 5. 846. 783, 5. 849. 546, 5. 849. 497, 5. 849. 547, 5. 858, 652, 5. 866. 366, 5. 916. 776, 5. 922. 574, 5. 928. 905, 5. 928. 906, 5. 932. 451, 5. 935. 825, 5. 939. 291 y 942, 391, Solicitud GB N° 2 202 328, y en la Solicitud PCT N° PCT/US89/01025.

Se puede usar también como método de amplificación la Qbeta Replicasa descrita en la Solicitud PCT N° PCT/US87/00880. En este método, se añade a una muestra una secuencia replicativa de ARN que tiene una región complementaria de la región diana en presencia de una ARN polimerasa La polimerasa copiará la secuencia replicativa que puede detectarse a continuación.

Un método de amplificación isotérmica, en el que se utilizan las endonucleasas de restricción y las ligasas para conseguir la amplificación de las moléculas dianas que contienen el nucleótido 5'-[alfa-tio] -trifosfatos en una hebra de un sitio de restricción puede ser también útil en la amplificación de ácidos nucleicos (Walker y *col.*, 1992). La amplificación por desplazamiento de hebra (SDA) descrita en la patente de los Estados Unidos 5. 916. 799 es otro método para llevar a cabo la amplificación isotérmica de ácidos nucleicos que implica múltiples ciclos de desplazamiento y síntesis de hebras, es decir, traducción de hendidura.

Otros procedimientos de amplificación de ácido nucleico incluyen los sistemas de amplificación basados en la transcripción (TAS) que incluyen la amplificación basada en la secuencia del ácido nucleico (NASBA) y 3SR (Kwoh y *col.*, 1989; solicitud PCT WO 88/10315. La solicitud Europea N° 329 822 describe un procedimiento de amplificación del ácido nucleico que implica sintetizar cíclicamente ARN monocatenario ("ARNss"), ADNss, y ADN bicatenario (ADNds), que se puede usar.

La solicitud PCT WO 89/06700 describe un esquema de amplificación de la secuencia de ácido nucleico basado en la hibridación de la secuencia de la región promotora/cebador de un ADN monocatenario ("ADNss") diana seguido por la transcripción de muchas copias de ARN de la secuencia. Este esquema no es cíclico, es decir, no se producen nuevos moldes a partir de los transcritos de ARN resultantes. Otros métodos de amplificación incluyen "RACE" y una "PCR monolateral" (Frohman, 1990; Ohara y *col.*, 1989).

3. Detección de ácidos nucleicos

Tras cualquier amplificación, puede ser deseable separar el producto de la amplificación a partir del molde y/o el cebador en exceso. En una realización, los productos de la amplificación se separan mediante electroforesis en gel de agarosa, agarosa-acrilamida, o poliacrilamida utilizando métodos normalizados (Sambrook y *col.*, 1989). Los productos de la amplificación separados pueden cortarse y eluirse a partir del gel para la manipulación adicional. Utilizando geles de agarosa de bajo punto de fusión, se puede eliminar la banda separada calentando el gel, seguido por la extracción del ácido nucleico.

Puede efectuarse también la separación de los ácidos nucleicos mediante técnicas de cromatografía conocidas en la materia. Existen muchos tipos de cromatografías que se pueden usar, que incluyen la cromatografía de adsorción, de partición, de intercambio iónico, de hidroxapatito, de tamiz molecular, de fase inversa, en columna, en capa fina, y la cromatografía gaseosa así como la HPLC.

En determinadas realizaciones, se visualizan los productos de la amplificación. Un método de visualización típico implica la tinción de un gel con bromuro de etidio y la visualización de las bandas con luz UV. De forma alternativa, si los productos de la amplificación se marcan íntegramente con nucleótidos radiomarcados o marcados fluorométricamente, los productos de la amplificación separados se pueden exponer a película de rayos x o visualizarse en los espectros excitatorios adecuados.

En una realización, tras la separación de los productos de la amplificación, una sonda de ácido nucleico marcada se pone en contacto con la secuencia marcadora amplificada. La sonda se conjuga preferiblemente con un cromóforo, pero puede radiomarcarse. En otra realización, la sonda se conjuga con un ligando, tal como un anticuerpo o biotina, u otro ligando que transporta un resto detectable

En las realizaciones concretas, la detección es mediante la transferencia Southern, y la hibridación con una sonda marcada. Los expertos en la materia conocen bien las técnicas implicadas en la transferencia Southern (véase Sambrook y *col.*, 1989). Un ejemplo de lo anterior se describe en la patente de los Estados Unidos 5. 279. 721, que describe un aparato y un método para la electroforesis automatizada y la transferencia de ácidos nucleicos. El aparato permite la electroforesis y la inmunotransferencia sin manipulación externa del gel. Otros métodos de detección de ácidos nucleicos que se pueden usar se describen en las patentes de los Estados Unidos 5. 840. 873, 5. 843. 640, 5. 843. 651, 5. 846. 708, 5. 846. 717, 5. 846. 726, 5. 846. 729, 5. 849. 487, 5. 853. 990, 5. 853. 992, 5. 853. 993, 5. 856. 092, 5. 861. 244, 5. 863. 732, 5. 863. 753, 5. 866. 331, 5. 905. 024, 5. 910. 407, 5. 912. 124, 5. 912. 145, 5. 919. 630, 5. 925. 517, 5. 928. 862, 5. 928. 869, 5. 929. 227, 5. 932. 413 y 5. 935. 791.

4. Otros ensayos

Se pueden usar otros métodos para el cribado genético, *por ejemplo*, para detectar mutaciones en muestras de ADN genómico, ADNc y/o muestras de ARN. Los métodos usados para detectar mutaciones puntuales incluyen la electroforesis en gel de gradiente desnaturizante ("DGGE"), el análisis del polimorfismo de longitud del fragmento de restricción ("RFLP"), los métodos de escisión químicos o enzimáticos, la secuenciación directa de las regiones diana amplificadas mediante la PCRTM (véase anteriormente), el análisis del polimorfismo de conformación monocatenario ("SSCP") y otros métodos bien conocidos en la técnica.

Un método de cribado de las mutaciones puntuales se basa en la escisión de la ARNasa de pares de bases emparejados de manera incorrecta en heterodupletes de ARN/ADN o ARN/ARN. Tal como se usa en el presente documento, el término "emparejado de manera incorrecta" se define como una región de uno o más nucleótidos no

emparejados o emparejados de manera incorrecta en una molécula de ARN/ARN, ARN/ADN o ADN/ADN bicatenaria: Esta definición incluye de esta manera emparejamientos incorrectos debidos a mutaciones de inserción/delección, así como mutaciones puntuales de bases únicas o múltiples.

5 La patente de los Estados Unidos 4. 946. 773 describe un ensayo de escisión con emparejamiento incorrecto mediante ARNasa que implica hibridar muestras de ensayo de ADN o ARN monocatenario a una sonda de ARN, y un tratamiento posterior de los dupletes de ácido nucleico con ARNasa A. Para la detección de los emparejamientos, los productos monocatenarios del tratamiento con la ARNasa A, separados electroforéticamente de acuerdo con el tamaño, se comparan con dupletes control tratados de forma similar. Las muestras que contienen fragmentos más pequeños (productos de escisión) no se observan en el duplete control y se puntúan como positivas.

10 Otros investigadores han descrito el uso de ARNasa I en ensayos de emparejamiento incorrecto. Se describe el uso de la ARNasa I para la detección del emparejamiento incorrecto en la bibliografía de Promega Biotech. Promega comercializa un kit que contiene ARNasa I que se informa que escinde tres de cuatro emparejamientos incorrectos conocidos. Otros han descrito la utilización de la proteína MutS u otra enzima reparadora del ADN para la detección de emparejamientos incorrectos de bases individuales.

15 Los métodos alternativos para la detección de la delección, de mutaciones de inserción o sustitución que se pueden usar se describen en las patentes de los Estados Unidos 5. 849. 483, 5. 851. 770, 5. 866. 337, 5. 925. 525 y 5. 928. 870.

Métodos de transferencia génica

25 Se cree que los métodos adecuados para la administración de ácidos nucleicos para efectuar la expresión de las composiciones incluyen virtualmente cualquier método por el cual se puede introducir un ácido nucleico (*por ejemplo* ADN, incluyendo vectores víricos y no víricos) en un orgánulo, una célula, un tejido o un organismo, tal como se describe en el presente documento o como los conocería una persona normalmente experta en la materia. Dichos métodos incluyen, pero no se limitan a, administración directa del ADN tal como mediante inyección (patentes de los Estados Unidos 5. 994. 624, 5. 981. 274, 5. 945. 100, 5. 780. 448, 5. 736. 524, 5. 702. 932, 5. 656. 610, 5. 589. 466 y 5. 580. 859, incluyendo la microinyección (Harlan y Weintraub, 1985; patente de los Estados Unidos 5. 789. 215; mediante electroporación (patente de los Estados Unidos Nº 5. 384. 253), mediante precipitación con fosfato de calcio (Graham y Van Der Eb, 1973; Chen y Okayama, 1987; Rippe y *col.*, 1990); utilizando DEAE-dextrano seguidos por polietilenglicol (Gopal, 1985); mediante carga sónica directa (Fechheimer y *col.*, 1987); mediante transfección mediada por liposomas (Nicolau y Sene, 1982; Fraley y *col.*, 1979; Nicolau y *col.*, 1987; Wong y *col.*, 1980; Kaneda y *col.*, 1989; Kato y *col.*, 1991); mediante bombardeo de microproyectiles (solicitudes PCT N^{os}. WO 94/09699 y 95/06128; patentes de los Estados Unidos 5. 610. 042; 5. 322. 783, 5. 563. 055, 5. 550. 318, 5. 538. 877 y 5. 538. 880); mediante fibras de carburo de silicio con agitación (Kaeppeler y *col.*, 1990; patentes de los Estados Unidos 5. 302. 523 y 5. 464. 765); mediante transformación mediada por *Agrobacterium* (patentes de los Estados Unidos 5. 591. 616 y 5. 563. 055); o mediante transformación de protoplastos mediada por PEG (Omirulleh y *col.*, 1993; patentes de los Estados Unidos 4. 684. 611 y 4. 952. 500); mediante captación de ADN mediada por desecación/inhibición (Potrykus y *col.*, 1985). Mediante la aplicación de técnicas como estas se pueden transformar de manera estable o transitoria orgánulo(s), célula(s), tejido(s) u organismo(s).

Componentes y restos lípidos

45 Son útiles composiciones que comprenden uno o más lípidos asociados a un ácido nucleico, una molécula de aminoácidos, tal como un péptido, u otro compuesto de molécula pequeña. En algunas de las realizaciones descritas en el presente documento, la molécula puede ser tanto un polipéptido de poxvirus como un modulador de polipéptido de poxvirus, *por ejemplo*, un ácido nucleico que codifica todo o parte tanto de un polipéptido de poxvirus, como alternativamente, una molécula de aminoácidos que codifica todo o parte de un polipéptido de poxvirus. Un lípido es una sustancia que es característicamente insoluble en agua y extraíble con un disolvente orgánico. Los compuestos que describen específicamente aquello en el presente documento se entiende que lo son por un experto en la materia de los lípidos. Un componente lípido y un componente no lípido pueden unirse entre sí, tanto de forma covalente como de forma no covalente.

50 Un lípido puede producirse de manera natural o sintética (es decir, diseñarse o producirse por el hombre). Sin embargo, un lípido es usualmente una sustancia biológica. Son bien conocidos en la técnica los lípidos biológicos, e incluyen, *por ejemplo*, grasas neutras, fosfolípidos, fosfoglicéridos, esteroides, terpenos, lisolípidos, glicoesfingolípidos, glucolípidos, sulfátidos, lípidos con éter y ácidos grasos unidos a éster y lípidos polimerizables, y sus combinaciones.

60 Una molécula de ácido nucleico o una molécula de aminoácidos, tal como un péptido, asociado con un lípido puede dispersarse en una disolución que contiene un lípido, disolverse con un lípido, emulsionarse con un lípido, mezclarse con un lípido, combinarse con un lípido, unirse covalentemente a un lípido, contenida como una suspensión en un lípido o asociada de otra manera con un lípido. Las composiciones lípidas o asociadas a lípidos/poxvirus no se limitan a cualquier estructura particular. *Por ejemplo*, pueden simplemente entremezclarse en una disolución,

formando posiblemente agregados que no son uniformes ya sea en tamaño como en forma. En otro ejemplo, pueden estar presentes en una estructura de tipo bicapa, como micelas, o con una estructura "colapsada". En otro ejemplo no limitante, se contempla también un complejo de lipofectamina (Gibco BRL -poxvirus o Superfect (Qiagen) -poxvirus

5 En determinadas realizaciones, una composición lipídica puede comprender aproximadamente 1 %, aproximadamente 2 %, aproximadamente 3 %, aproximadamente 4 %, aproximadamente 5 %, aproximadamente 6 %, aproximadamente 7 %, aproximadamente 8 %, aproximadamente 9 %, aproximadamente 10 %, aproximadamente 11 %, aproximadamente 12 %, aproximadamente 13 %, aproximadamente 14 %, aproximadamente 15 %, aproximadamente 16 %, aproximadamente 17 %, aproximadamente 18 %, aproximadamente 19 %, aproximadamente 20 %, aproximadamente 21 %, aproximadamente 22 %, aproximadamente 23 %, aproximadamente 24 %, aproximadamente 25 %, aproximadamente 26 %, aproximadamente 27 %, aproximadamente 28 %, aproximadamente 29 %, aproximadamente 30 %, aproximadamente 31 %, aproximadamente 32 %, aproximadamente 33 %, aproximadamente 34 %, aproximadamente 35 %, aproximadamente 36 %, aproximadamente 37 %, aproximadamente 38 %, aproximadamente 39 %, aproximadamente 40 %, aproximadamente 41 %, aproximadamente 42 %, aproximadamente 43 %, aproximadamente 44 %, aproximadamente 45 %, aproximadamente 46 %, aproximadamente 47 %, aproximadamente 48 %, aproximadamente 49 %, aproximadamente 50 %, aproximadamente 51 %, aproximadamente 52 %, aproximadamente 53 %, aproximadamente 54 %, aproximadamente 55 %, aproximadamente 56 %, aproximadamente 57 %, aproximadamente 58 %, aproximadamente 59 %, aproximadamente 60 %, aproximadamente 61 %, aproximadamente 62 %, aproximadamente 63 %, aproximadamente 64 %, aproximadamente 65 %, aproximadamente 66 %, aproximadamente 67 %, aproximadamente 68 %, aproximadamente 69 %, aproximadamente 70 %, aproximadamente 71 %, aproximadamente 72 %, aproximadamente 73 %, aproximadamente 74 %, aproximadamente 75 %, aproximadamente 76 %, aproximadamente 77 %, aproximadamente 78 %, aproximadamente 79 %, aproximadamente 80 %, aproximadamente 81 %, aproximadamente 82 %, aproximadamente 83 %, aproximadamente 84 %, aproximadamente 85 %, aproximadamente 86 %, aproximadamente 87 %, aproximadamente 88 %, aproximadamente 89 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 91 %, aproximadamente 92 %, aproximadamente 93 %, aproximadamente 94 %, aproximadamente 95 %, aproximadamente 96 %, aproximadamente 97 %, aproximadamente 98 %, aproximadamente 99 %, aproximadamente 100 %, o cualquier intervalo derivable del anterior, de un lípido concreto, tipo de lípido o componente no lípido tal como un fármaco, proteína, azúcar, ácidos nucleicos u otro material descrito en el presente documento o que conocería una persona experta en la materia. En un ejemplo no limitante, una composición lipídica puede comprender aproximadamente 10 % a aproximadamente 20 % de lípidos neutros, y aproximadamente 33 % a aproximadamente 34 % de un cerebrosido, 1 aproximadamente un 1 % de colesterol. En otro ejemplo no limitante, un liposoma puede comprender aproximadamente 4 % a aproximadamente 12 % de terpenos, donde aproximadamente un 1 % de la micela es específicamente licopeno, dejando aproximadamente un 3 % a aproximadamente un 11 % del liposoma comprendiendo otros terpenos, y aproximadamente un 10 % a aproximadamente un 35 % de fosfatidilcolina, y aproximadamente un 1 % de un fármaco. De esta manera, se contempla que las composiciones lipídicas puedan comprender cualquiera de los lípidos, tipos de lípidos u otros componentes en cualquier combinación o intervalo de porcentaje.

E Formulaciones farmacéuticas, administración y regímenes de tratamiento

45 Es útil un método para tratar una enfermedad hiperproliferativa, tal como un cáncer, mediante la administración de un poxvirus alterado, tal como un virus vaccinia. Los ejemplos de cáncer contemplados por el tratamiento incluyen cáncer de pulmón y cáncer de cuello, cáncer de mama, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, cáncer renal, cáncer de hueso, cáncer de testículo, cáncer de cuello de útero, cáncer gastrointestinal, linfomas, lesiones preneoplásicas en el pulmón, cáncer de colon, melanoma, cáncer de vejiga y cualquier otro cáncer o tumor que se pueda tratar.

50 Una cantidad eficaz de la composición farmacéutica, por lo general, se define como la cantidad suficiente para mejorar, reducir, minimizar, o limitar de forma detectable y repetida la extensión de la enfermedad o sus síntomas. Pueden aplicarse definiciones más rigurosas, que incluyen la eliminación, erradicación o cura de la enfermedad.

55 De forma preferible, los pacientes tendrán una función adecuada de la médula ósea (definida como un recuento de granulocitos absolutos periféricos de $> 2.000 / \text{mm}^3$ y un recuento de plaquetas de $100.000 / \text{mm}^3$), función hepática adecuada (bilirrubina $< 1,5 \text{ mg / dl}$) y función renal adecuada (creatinina $< 1,5 \text{ mg / dl}$).

60 Administración

65 Para destruir células, inhibir el crecimiento celular, inhibir la metástasis, disminuir el tamaño del tumor o del tejido e invertir o reducir de otra manera el fenotipo maligno de las células tumorales, usando los métodos y composiciones descritos en el presente documento, se pondría generalmente en contacto una célula hiperproliferativa con el compuesto terapéutico tal como un polipéptido o una construcción de expresión que codifica un polipéptido. Las rutas de administración variarán, naturalmente, con la localización y la naturaleza de la lesión, e incluyen, *por*

ejemplo, administración y formulación intradérmica, transdérmica, parenteral, intravenosa, intramuscular, intranasal, subcutánea, regional, percutánea, intratraqueal, intraperitoneal, intraarterial, intravesical, intratumoral, por inhalación, perfusión, lavado, inyección directa, y administración y formulación oral.

5 Para conseguir un beneficio terapéutico con respecto a la dolencia o enfermedad vascular, se pondría en contacto una célula vascular con el compuesto terapéutico. Cualquiera de las formulaciones y rutas de administración descritas con respecto al tratamiento o al diagnóstico del cáncer puede emplearse también con respecto a las enfermedades y dolencias vasculares.

10 La inyección intratumoral, o inyección en la vasculatura tumoral se contempla de forma específica para tumores discretos, sólidos y accesibles. La administración local, regional, o sistémica puede ser también adecuada. Para tumores de > 4 cm, el volumen que se va a administrar será aproximadamente de 4-10 ml (preferiblemente 10 ml), aunque para tumores de < 4 cm, se utilizará un volumen de aproximadamente 1-3 ml (preferiblemente 3 ml). Inyecciones múltiples administradas como dosis únicas comprenden aproximadamente volúmenes de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 0,5 ml. Las partículas víricas pueden ponerse en contacto de forma
15 ventajosa administrando inyecciones múltiples, separadas a aproximadamente intervalos de 1 cm.

20 En el caso de intervención quirúrgica, el virus vaccinia que se reivindica se puede usar en una etapa prequirúrgica para convertir un tumor no operable en sujeto de resección. De forma alternativa, se puede usar en el momento de la cirugía, y/o posteriormente, para tratar una enfermedad residual o metastásica. *Por ejemplo*, un lecho tumoral extirpado puede inyectarse o perfundirse con una formulación que comprende un polipéptido de poxvirus o un poxvirus que comprende una mutación que vuelve el poxvirus ventajoso para el tratamiento del cáncer o las células cancerosas. La perfusión puede continuarse después de la resección, *por ejemplo*, dejando un catéter implantado en el sitio de la cirugía. Se prevé un tratamiento periódico posterior a la cirugía.

25 Puede aplicarse también la administración continua cuando sea adecuado, *por ejemplo*, cuando se extirpa un tumor y se trata el lecho del tumor para eliminar la enfermedad microscópica, residual. Se prefiere la administración mediante jeringuilla o cateterización. Dicha perfusión continua puede tener lugar durante un periodo de aproximadamente 1-2 horas, a aproximadamente 2-6 horas, a aproximadamente 6-12 horas, a aproximadamente 12-24 horas, a aproximadamente 1-2 días, a aproximadamente 1-2 semanas o más tras el inicio del tratamiento.
30 Generalmente, la dosis de composición terapéutica mediante perfusión continua será equivalente a la dada mediante inyecciones únicas o múltiples, ajustadas durante un periodo de tiempo durante el cual se produce la perfusión. Se contempla además que se pueda usar la perfusión límbica para administrar composiciones terapéuticas, particularmente en el tratamiento de melanomas y sarcomas.

35 También pueden variar los regímenes de tratamiento, y a menudo dependen del tipo de tumor, la localización del tumor, la progresión de la enfermedad, y la salud y edad del paciente. Obviamente, el tumor requerirá un tratamiento más agresivo, mientras que al mismo tiempo, determinados pacientes no pueden tolerar protocolos más duros. El médico probará el más adecuado a dichas decisiones basándose en la eficacia y toxicidad conocidas (si acaso) de las formulaciones terapéuticas.

40 En determinadas realizaciones, el tumor que se está tratando puede no ser, al menos inicialmente, extirpable. Los tratamientos con construcciones víricas terapéuticas pueden aumentar la extirpabilidad del tumor debido al acortamiento en los márgenes o mediante la eliminación de determinadas porciones particularmente invasivas. Tras los tratamientos, puede ser posible la resección. Los tratamientos adicionales posteriores a la resección servirán
45 para eliminar la enfermedad residual microscópica en el sitio del tumor.

50 Un curso típico de tratamiento de un tumor primario o de un lecho de tumor posterior a la resección, implicará múltiples dosis. El tratamiento del tumor primario típico implica la aplicación de 6 dosis durante un periodo de dos semanas. El régimen de dos semanas puede repetirse una, dos, tres, cuatro, cinco, seis o más veces. Durante un curso de tratamiento, se puede volver a evaluar la necesidad de completar las dosificaciones planificadas.

55 Los tratamientos pueden incluir diversas "dosis unitarias". La dosis unitaria se define como aquella que contiene una cantidad predeterminada de la composición terapéutica. La cantidad que se va a administrar, y la ruta y la formulación concretas, están comprendidas en los conocimientos de los expertos en las técnicas clínicas. Una dosis unitaria no necesita administrarse como una única inyección, pero puede comprender la infusión continua durante un periodo determinado de tiempo. La dosis unitaria puede describirse convenientemente en términos de unidades formadoras de placas (ufp) para una construcción vírica. Las dosis unitarias varían entre 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} , 10^{11} , 10^{12} , 10^{13} ufp y superiores. De forma alternativa, dependiendo del tipo de virus y de los títulos que se pueden alcanzar, se administrarán 1 a 100, 10 a 50, 100-100, o hasta aproximadamente 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 , 1×10^9 , 1×10^{10} , 1×10^{11} , 1×10^{12} , 1×10^{13} , 1×10^{14} , o 1×10^{15} o más partículas víricas infecciosas (pv) al paciente o a las células del paciente.
60

Composiciones y formulaciones inyectables

65 El método preferido para la administración de una construcción de expresión o virus que codifica todo o parte del genoma de un poxvirus para cáncer o células tumorales es mediante inyección intratumoral. Sin embargo, las

composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento pueden administrarse de forma alternativa por vía parenteral, intravenosa, intradérmica, intramuscular, transdérmica o incluso intraperitoneal tal como se describe en la patente de los Estados Unidos 5. 543. 158, patente de los Estados Unidos 5. 641. 515 y patente de los Estados Unidos 5. 399. 363.

5 Se puede administrar la inyección de construcciones de ácidos nucleicos mediante jeringuilla o cualquier otro método utilizado para la inyección de una disolución, siempre que la construcción de expresión pueda pasar a través del calibre concreto de la aguja requerida para la inyección. Se ha descrito recientemente un novedoso sistema de inyección sin aguja (patente de los Estados Unidos 5. 846. 233) que tiene una boquilla que define una cámara de
10 ampolla para mantener la disolución y un dispositivo de energía para impulsar la disolución fuera de la boquilla hacia el sitio de la administración. Se ha descrito también un sistema de jeringuilla para uso en terapia génica que permite múltiples inyecciones de cantidades predeterminadas de una disolución de forma precisa a cualquier profundidad (Patente de los Estados Unidos 5. 846. 225).

15 Se pueden preparar disoluciones de los compuestos activos como bases libres o sales farmacológicamente aceptables en agua mezcladas de manera adecuada con un tensioactivo, tal como hidroxipropilcelulosa. Se pueden preparar también dispersiones en glicerol, polietilenglicoles líquidos, y sus mezclas y en aceites. En condiciones normales de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para evitar el crecimiento de microorganismos. Las formas farmacéuticas adecuadas para el uso inyectable incluyen disoluciones o dispersiones
20 acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de disoluciones o dispersiones inyectables estériles (patente de los Estados Unidos 5. 466. 468). En todos los casos, la forma debe ser estéril y debe ser fluida en la extensión que exista una fácil capacidad de inyección. Debe ser estable en condiciones de fabricación y almacenamiento y debe preservarse frente a la acción de la contaminación de los microorganismos, tales como bacterias y hongos. El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contenga, *por ejemplo*, agua, etanol, poliol (*por ejemplo*, glicerol, propilenglicol, y polietilenglicol líquido, y similares), sus mezclas adecuadas, y/o los aceites vegetales. Se puede mantener una fluidez adecuada, *por ejemplo*, mediante el uso de un revestimiento, tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partículas requerido en el caso de la dispersión y mediante el uso de tensioactivos. Se puede lograr la prevención de la acción de los microorganismos mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, *por ejemplo*, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal, y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, *por ejemplo*, azúcares o cloruro de sodio. Se puede lograr la absorción prolongada de las composiciones inyectables mediante el uso en las composiciones de agentes que retrasan la absorción, *por ejemplo*, monoestearato de aluminio y gelatina.

35 Para la administración parenteral en una disolución acuosa, *por ejemplo*, la disolución debe tamponarse de manera adecuada si es necesario y el diluyente líquido hacerse en primer lugar isotónico con suficiente suero salino o glucosa. Estas disoluciones acuosas concretas son especialmente adecuadas para la administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, intratumoral e intraperitoneal. En lo que respecta a este punto, los expertos en la materia conocerán los medios acuosos estériles que se pueden emplear a la luz de la presente divulgación. *Por ejemplo*, se puede disolver una dosis en 1 ml de solución de NaCl isotónica y añadirse tanto a 1000 ml del fluido de hipodermoclastia como inyectarse en el sitio propuesto de la infusión (véase, *por ejemplo*, "Remington's Pharmaceutical Sciences" 15ª Edición, páginas 1035-1038 y 1570-1580). Se producirá necesariamente alguna variación en la dosificación dependiendo de la dolencia de la que se está tratando al sujeto. La persona responsable de la administración determinará, en todo momento, la dosis adecuada para el sujeto individual. Además, para la administración a un ser humano, las preparaciones deben cumplir los estándares de esterilidad, pirogenicidad,
45 seguridad general y pureza que requiere la Oficina de Estándares Biológicos de la FDA.

Las disoluciones inyectables estériles se preparan incorporando los compuestos activos en la cantidad requerida en el disolvente adecuado con diversos de los diferentes ingredientes enumerados anteriormente, según se requiere, seguido por la esterilización mediante filtro. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando los diversos principios activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los diferentes ingredientes requeridos de entre los anteriormente enumerados. En el caso de los polvos estériles para la preparación de disoluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son las técnicas de secado a vacío y de criocongelación que dan como resultado un polvo del principio activo más cualquier ingrediente deseado adicional procedente de una disolución del mismo filtrada en estéril.

55 Las composiciones descritas en el presente documento se pueden formular en una forma neutra o de sal. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de adición de ácido (formadas con los grupos amino libres de la proteína) y que se forman con ácidos inorgánicos tales como, *por ejemplo*, ácidos clorhídrico o fosfórico, de dichos ácidos orgánicos como acético, oxálico, tartárico, mandélico y similares. Las sales formadas con grupos carboxilo libres también pueden derivarse de bases inorgánicas tales como, *por ejemplo*, hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio, o férrico, y dichas bases orgánicas como isopropilamina, trimetilamina, histidina, procaína y similares. Tras la formulación, se administrarán las disoluciones de una manera compatible con la formulación de dosificación y en la mencionada cantidad que sea terapéuticamente eficaz. Las formulaciones se administran fácilmente en varias formas de dosificación tales como disoluciones inyectables, cápsulas de liberación de fármacos y similares.

65 Tal como se usa en el presente documento "portador" incluye cualquiera y todos los disolventes, medios de

dispersión, vehículos, revestimientos, diluyentes, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y de retraso de la absorción, tampones, disoluciones portadoras, suspensiones, coloides, y similares. El uso de dichos medios y agentes para las sustancias activas farmacéuticas es bien conocido en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el principio activo, se contempla su uso en las composiciones terapéuticas. Se pueden incorporar también principios activos suplementarios en las composiciones.

La frase “farmacéuticamente aceptable” o “farmacológicamente aceptable” se refiere a entidades y composiciones moleculares que no producen una reacción alérgica o perjudicial similar cuando se administran a un ser humano. Es bien conocida en la técnica la preparación de una composición acuosa que contiene una proteína como principio activo. Normalmente, dichas composiciones se preparan ya sea como disoluciones o suspensiones líquidas inyectables; se pueden preparar también formas sólidas adecuadas para disolución en, o suspensión en, líquido antes de la inyección.

Tratamientos de combinación

Se pueden usar los compuestos y métodos descritos en el presente documento en el contexto de enfermedades/dolencias hiperproliferativas que incluyen cáncer y aterosclerosis. Para aumentar la eficacia de un tratamiento con los virus vaccinia atenuados puede ser deseable combinarlos con otros agentes eficaces en el tratamiento de las enfermedades y dolencias. *Por ejemplo*, puede implementarse el tratamiento del cáncer con virus vaccinia atenuados y otros tratamientos anticancerosos, tales como agentes anticancerosos o cirugía.

Se pueden emplear diversas combinaciones, *por ejemplo*, un poxvirus atenuado, tal como virus vaccinia, es “A” y el tratamiento anticanceroso secundario es “B”.

A/B/A	B/A/B	B/B/A	A/A/B	A/B/B	B/A/A	A/B/B/B	B/A/B/B
B/B/B/A	B/B/A/B		A/AB/B	A/B/AB		A/B/B/A	B/B/A/A
B/AB/A	B/A/A/B		A/A/A/B	B/A/A/A		A/B/A/A	A/A/B/A

La administración de construcciones de expresión terapéuticas a un paciente seguirá los protocolos generales para la administración de este tratamiento secundario concreto, teniendo en cuenta, en su caso, la toxicidad del tratamiento con el poxvirus. Se espera que se repitan los ciclos de tratamiento según sea necesario. Se contempla que se pueden aplicar diversos tratamientos normalizados, así como la intervención quirúrgica, en combinación con el tratamiento contra el cáncer o contra las células tumorales descrito.

1. Tratamiento contra el cáncer

Un agente “anticanceroso” puede afectar negativamente el cáncer en un sujeto, *por ejemplo*, destruyendo las células cancerosas, induciendo la apoptosis en las células cancerosas, reduciendo la tasa de crecimiento de las células cancerosas, reduciendo la incidencia o el número de metástasis, reduciendo el tamaño del tumor, inhibiendo el crecimiento del tumor, reduciendo el aporte de sangre a un tumor o a las células cancerosas, promoviendo una respuesta inmune contra las células cancerosas o un tumor, evitando o inhibiendo la progresión del cáncer, o aumentando la duración de la vida de un sujeto con cáncer. Los agentes anticancerosos incluyen agentes biológicos (biotratamiento), agentes de quimioterapia y agentes de radioterapia. De forma más general, estas otras composiciones podrían proporcionarse en una cantidad eficaz combinada para destruir o inhibir la proliferación de las células. Este procedimiento puede implicar poner en contacto las células con la construcción de expresión y el(los) agente(s) o múltiple(s) factor(es) al mismo tiempo. Esto se puede conseguir poniendo en contacto la célula con una única composición o formulación farmacológica que incluya ambos agentes, o poniendo en contacto la célula con dos composiciones o formulaciones distintas, al mismo tiempo, donde una composición incluye la construcción de expresión y la otra incluye el(los) segundo(s) agente(s).

La resistencia de las células tumorales a los agentes de quimioterapia y radioterapia representa un problema principal en la oncología clínica. Una meta de las investigaciones actuales sobre el cáncer es encontrar maneras de mejorar la eficacia de la quimio y la radioterapia combinándolas con la terapia génica. *Por ejemplo*, el gen de la timidina quinasa del herpes simple (HS-tK), cuando se administró a tumores cerebrales mediante un sistema de vector retroviral, indujo la susceptibilidad de forma satisfactoria al agente antiviral ganciclovir (Culver y col., 1992). Se contempla que se podría usar de manera similar el tratamiento con poxvirus junto con la intervención quimioterapéutica, radioterapéutica, inmunoterapéutica u otra intervención biológica, además de otros agentes proapoptóticos o reguladores del ciclo celular.

De forma alternativa, la terapia génica puede preceder o seguir al tratamiento con otros agentes en intervalos que varían desde minutos a semanas. En realizaciones que las que se aplican a la célula por separado el otro agente y la construcción de expresión, se podría asegurar generalmente que un periodo significativo de tiempo no expira entre el tiempo de cada administración, de tal manera que el agente y la construcción de expresión serían todavía capaces de ejercer de forma ventajosa un efecto combinado sobre la célula. En dichos casos, se contempla que se pueda poner en contacto la célula con ambas modalidades en aproximadamente 12-24 h entre sí y, de forma más preferible, en aproximadamente 6-12 h entre sí. En algunas situaciones, puede ser deseable extender el periodo de

tiempo significativamente durante el tratamiento, sin embargo, un lapso entre varios días (2, 3, 4, 5, 6 o 7) a varias semanas (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8) entre las administraciones respectivas.

a. Quimioterapia

5 Los tratamientos contra el cáncer incluyen también varios tratamientos combinados con tratamientos químicos y basados en radiación. Las quimioterapias combinadas incluyen, *por ejemplo*, cisplatino (CDDP), carboplatino, procarbazona, mecloretamida, ciclofosfamida, camptotecina, ifosfamida, melfalan, clorambucilo, busulfan, nitrosurea, dactinomicina, daunorubicina, doxorubicina, bleomicina, plicomicina, mitomicina, etopósido (VP16), tamoxifeno, raloxifeno, agentes de unión al receptor del estrógeno, taxol, gemcitabina, navelbina, inhibidores de la farnesil-proteína transferasa, transplatino, 5-fluorouracilo, vincristina, vinblastina y metotrexato, Temazolomida (una forma acuosa de DTIC), o cualquier análogo o variante de derivado del anterior. La combinación de la quimioterapia con la terapia biológica es conocida como bioquimioterapia.

b. Radioterapia

15 Otros factores que producen daño en el ADN y que se han usado extensamente incluyen los que se conocen comúnmente como rayos γ , rayos X, y/o la administración dirigida de radioisótopos a las células tumorales. Se contemplan también otras formas de factores que dañan el ADN tales como microondas y la irradiación UV. Es más probable que todos estos factores efectúan una amplia gama de daños en el ADN, en los precursores del ADN, en la replicación y la reparación del ADN, y en el ensamblaje y mantenimiento de los cromosomas. Los intervalos de dosificación para los rayos X varían desde dosis diarias de 50 a 200 roentgen durante periodos prolongados de tiempo (3 a 4 semanas), a dosis únicas de 2000 a 6000 roentgen. Los intervalos de dosificación para los radioisótopos varían ampliamente, y dependen de la semivida del isótopo, la resistencia y el tipo de radiación emitida, y la captación por las células neoplásicas.

20 Los términos "puesta en contacto" y "expuesto", cuando se aplican a una célula, se usan en el presente documento para describir el procedimiento por el cual una construcción terapéutica y un agente quimioterapéutico o radioterapéutico se administran a una célula diana o se colocan en yuxtaposición directa con la célula diana. Para conseguir la destrucción o la estasia de la célula, ambos agentes se administran a una célula en una cantidad eficaz combinada para destruir la célula o evitar la división de la misma.

c. Inmunoterapia

35 Los agentes inmunoterapéuticos se basan generalmente en el uso de células inmunoefectoras y moléculas para dirigirse y destruir las células cancerosas. El inmunoelector puede ser, *por ejemplo*, un anticuerpo específico de algún marcador en la superficie de una célula tumoral. El anticuerpo solo puede servir como un efector del tratamiento o bien puede reclutar otras células para efectuar realmente la destrucción de la célula. El anticuerpo se puede conjugar también con un fármaco (un agente quimioterapéutico, un radionucleido, la cadena de la ricina A, la toxina del cólera, la toxina pertussis, *etc.*). De forma alternativa, el efector puede ser un linfocito que transporta una molécula superficial que interactúa, tanto directa como indirectamente, con una célula tumoral diana. Diversos efectores celulares incluyen linfocitos T citotóxicos y células NK. La combinación de modalidades terapéuticas, es decir, la actividad citotóxica directa y la inhibición o reducción de determinados polipéptidos de poxvirus podrían proporcionar un beneficio terapéutico en el tratamiento del cáncer.

45 La inmunoterapia también se podría utilizar como parte de un tratamiento combinado. La solución general para un tratamiento combinado se describe a continuación. En un aspecto de la inmunoterapia, las células tumorales deben soportar algún marcador que es responsable del direccionamiento, es decir, no está presente en la mayoría de células diferentes. Existen muchos marcadores tumorales y cualquiera de estos puede ser adecuado para el direccionamiento. Los marcadores tumorales comunes incluyen un antígeno carcinoembrionario, un antígeno específico de próstata, un antígeno asociado a tumor urinario, un antígeno fetal, tirosinasa (p97), gp68, TAG-72, HMFG, Antígeno Sialil Lewis, MucA, MucB, PLAP, receptor del estrógeno, receptor de la laminina, *erb B* y p155. Un aspecto alternativo de la inmunoterapia es el de los efectos anticancerosos con los efectos inmunoestimuladores. Existen también moléculas inmunoestimuladoras que incluyen: citoquinas tales como IL-2, IL-4, IL-12, GM-CSF, IFN γ , quimioquinas tales como MIP-1, MCP-1, IL-8 y factores de crecimiento tales como el ligando de FLT3. La combinación de moléculas inmunoestimuladoras, cualquiera de proteínas, o utilizando la administración génica en combinación con un supresor tumoral tal como mda-7 ha mostrado potenciar los efectos antitumorales (Ju y *col.*, 2000).

60 Tal como se ha descrito al principio, los ejemplos de inmunoterapias actualmente en investigación o en uso son los inmunoadyuvantes (*por ejemplo*, *Mycobacterium bovis*, *Plasmodium falciparum*, dinitroclorobenceno y compuestos aromáticos) (Patente de los Estados Unidos 5. 801. 005; Patente de los Estados Unidos 5. 739. 169; Hui y Hashimoto, 1998; Christodoulides y *col.*, 1998), tratamiento con citoquinas (*por ejemplo*, interferones α , β y γ ; IL-1, GM-CSF y TNF) (Bukowski y *col.*, 1998; Davidson y *col.*, 1998; Hellstrand y *col.*, 1998) terapia génica (*por ejemplo*, TNF, IL-1, IL-2, p53) (Qin y *col.*, 1998; Austin-Ward y Villaseca, 1998; Patente de los Estados Unidos 5. 830. 880 y Patente de los Estados Unidos 5. 846. 945) y anticuerpos monoclonales (*por ejemplo*, dirigidos contra el gangliósido

GM2, dirigidos contra HER-2, dirigidos contra p185) (Pietras *y col.*, 1998; Hanibuchi *y col.*, 1998; Patente de los Estados Unidos 5. 824. 311). Herceptina (trastuzumab) es un anticuerpo monoclonal quimérico (ratón-humano) que bloquea el receptor HER2-neu. Posee actividad antitumoral y ha sido homologado para el uso en el tratamiento de los tumores malignos (Dillman, 1999). El tratamiento combinado del cáncer con herceptina y quimioterapia ha mostrado ser más eficaz que los tratamientos individuales. De esta manera, se contempla que se pueden emplear uno o más tratamientos anticancerosos con los tratamientos relacionados con poxvirus descritos en el presente documento.

i) Inmunoterapia pasiva

Existen numerosas soluciones diferentes para la inmunoterapia pasiva del cáncer. Se pueden clasificar de manera amplia en las siguientes; inyección de anticuerpos solos, inyección de anticuerpos acoplados con toxinas o agentes quimioterapéuticos; inyección de anticuerpos acoplados con isótopos radioactivos; inyección de anticuerpos anti-idiotipo; y finalmente, purga de células tumorales en médula ósea.

Preferentemente, en la inmunoterapia pasiva se emplean anticuerpos monoclonales humanos, ya que producen pocos o ningún efecto secundario en el paciente. Sin embargo, su aplicación está algo limitada por su carestía y hasta el momento solo se administran intralesionalmente. Los anticuerpos monoclonales para antígenos de gangliósidos se han administrado intralesionalmente a pacientes que padecen de melanoma recurrente cutáneo (Irie y Morton, 1986). Se observó regresión en seis de diez pacientes, tras inyecciones intralesionales diaria o semanalmente. En otro estudio, se consiguió un éxito moderado a partir de inyecciones intralesionales de dos anticuerpos monoclonales humanos (Irie *y col.*, 1989).

Puede ser favorable administrar más de un anticuerpo monoclonal dirigido contra dos antígenos diferentes o anticuerpos con múltiple especificidad antigénica. Los protocolos de tratamiento pueden incluir también la administración de linfoquinas u otros inmunopotenciadores tal como se describe por Bajorin *y col.* (1988). Se describe el desarrollo de anticuerpos monoclonales humanos con más detalle en otra parte en la memoria descriptiva.

ii) Inmunoterapia activa

En la inmunoterapia activa se administra un péptido, polipéptido o proteína antigénica, o una composición de células tumorales autóloga o alogénica o "vacuna", generalmente con un adyuvante bacteriano distinto (Ravindranath y Morton, 1991; Morton *y col.*, 1992; Mitchell *y col.*, 1990; Mitchell *y col.*, 1993). En la inmunoterapia del melanoma, aquellos pacientes que desencadenan una respuesta de IgM elevada sobreviven a menudo mejor que los pacientes que no desencadenan o tienen una baja concentración de anticuerpos IgM (Morton *y col.*, 1992). Los anticuerpos IgM son a menudo anticuerpos transitorios y la excepción de la regla parecen ser los anticuerpos dirigidos contra gangliósidos o dirigidos contra hidratos de carbono.

iii) Inmunoterapia adoptiva

En la inmunoterapia adoptiva, los linfocitos en circulación del paciente, o los linfocitos infiltrados en el tumor, se aíslan *in vitro*, y se vuelven a administrar activados por linfoquinas tales como IL-2 o transducidas con genes para la necrosis del tumor (Rosenberg *y col.*, 1988; 1989). Para conseguir esto, se administraría a un animal o paciente humano una cantidad inmunológicamente eficaz de linfocitos activados con una composición de péptido antigénico incorporada como adyuvante tal como se describe en el presente documento. Los linfocitos activados serán lo más preferentemente las propias células del paciente que se aislaron al principio de una muestra de sangre o de tumor y se activaron (o "expandieron") *in vitro*. Esta forma de inmunoterapia ha producido algunos casos de regresión del melanoma y el carcinoma renal, pero el porcentaje de respondedores fue pequeño en comparación con los que no respondieron.

d. Genes

En otra realización más, el tratamiento secundario es una terapia génica en la que se administra un polipéptido terapéutico antes, después, o al mismo tiempo que se administra un poxvirus atenuado. La administración de un poxvirus junto con un vector que codifica uno de los siguientes productos génicos tendrá un efecto anticanceroso combinado sobre los tejidos diana. De forma alternativa, se puede diseñar mediante ingeniería genética el poxvirus como un vector vírico para incluir el polinucleótido terapéutico. Están abarcadas varias proteínas, alguna de las cuales se describen a continuación. La Tabla 6 relaciona diversos genes que se pueden dirigir para la terapia génica de alguna forma.

i) Inductores de la proliferación celular

Las proteínas que inducen la proliferación celular se clasifican adicionalmente en diversas categorías según su función. Es común a todas estas proteínas su capacidad para regular la proliferación celular. *Por ejemplo*, una forma de PDGF, el oncogén sis, es un factor de crecimiento secretado. Los oncogenes surgen raramente de genes que

codifican factores de crecimiento, y, actualmente, es el único factor de crecimiento oncogénico conocido presente en la naturaleza. En una realización, se contempla que el ARNm de sentido contrario dirigido hacia un inductor concreto de la proliferación celular se usa para evitar la expresión del inductor de la proliferación celular.

5 Las proteínas FMS, ErbA, ErbB y neu son receptores de los factores de crecimiento. Las mutaciones de estos receptores dan como resultado la pérdida de la función regulable. *Por ejemplo*, una mutación puntual que afecta al dominio transmembrana de la proteína del receptor Neu da como resultado el oncogén neu. El oncogén erbA se deriva del receptor intracelular de la hormona tiroidea. El receptor ErbA oncogénico modificado se cree que compete con el receptor endógeno de la hormona tiroidea, produciendo un crecimiento incontrolado.

10 La clase más grande de oncogenes incluye las proteínas transductoras de la señal (*por ejemplo*, Src, Abl y Ras). La proteína Src es una proteína tirosina quinasa citoplásmica, y su transformación desde protooncogén a oncogén, en algunos casos, se produce como el resultado de mutaciones en el resto de tirosina situado en la posición 527. En contraste, la transformación de la proteína ras de la GTPasa desde protooncogén a oncogén, en un ejemplo, es el resultado de una mutación de valina a glicina en el aminoácido 12 de la secuencia, reduciendo la actividad ras de la GTPasa.

Las proteínas Jun, Fos y Myc son proteínas que ejercen directamente sus efectos sobre funciones nucleares como los factores de la transcripción.

20 ii) Inhibidores de la proliferación celular

Los oncogenes supresores de tumor funcionan para inhibir la proliferación celular excesiva. La inactivación de estos genes destruye la actividad inhibidora, dando como resultado una proliferación no regulada. Se describen a continuación los supresores tumorales p53, p16 y C-CAM.

25 Además de p53, que se ha descrito anteriormente, otro inhibidor de la proliferación celular es p16. Las transiciones principales del ciclo celular eucariota están estimuladas por las quinasas dependientes de ciclina, o CDK. Una CDK, la quinasa 4 dependiente de ciclina (CDK4) regula la progresión a través de G₁. La actividad de esta enzima puede ser fosforilada por Rb en la última G₁. La actividad de CDK4 está controlada por una subunidad de activación, la ciclina de tipo D, y por una subunidad inhibidora, la p16^{INK4} se ha caracterizado bioquímicamente como una proteína que se une de manera específica a e inhibe CDK4, y de esta manera puede regular la fosforilación de Rb (Serrano y col., 1993; Serrano y col., 1995). Como la proteína p16^{INK4} es un inhibidor de CDK4 (Serrano, 1993), la delección de este gen puede aumentar la actividad de CDK4, dando como resultado la hiperfosforilación de la proteína Rb, p16 se sabe también que regula la función de CDK6.

30 p16^{INK4} pertenece a una clase descrita recientemente de proteínas inhibidoras de CDK que incluye también p16^B, p19, p21^{WAF1}, y p27^{KIP1}. El gen p16^{INK4} cartografía 9p21, una región cromosómica frecuentemente borrada en muchos tipos de tumor. Son frecuentes las delecciones y mutaciones homocigóticas del gen p16^{INK4} en las líneas de células tumorales humanas. Esta evidencia sugiere que el gen p16^{INK4} es un gen supresor del tumor. Esta hipótesis ha sido desafiada, sin embargo, por la observación que la frecuencia de alteraciones del gen es mucho menor en tumores no cultivados primarios que en líneas de células cultivadas (Caldas y col., 1994; Cheng y col., 1994; Hussussian y col., 1994; Kamb y col., 1994; Kamb y col., 1994; Mori y col., 1994; Okamoto y col., 1994; Nobori y col., 1994; Orlow y col., 1994; Arap y col., 1995). La restauración de la función de p16^{INK4} natural mediante transfección con un vector de expresión plásmido redujo la formación de colonias en algunas líneas de células cancerosas humanas (Okamoto, 1994; Arap, 1995).

Otros genes que se pueden emplear incluyen Rb, APC, DCC, NF-1, NF-2, WT-1, MEN-I, MEN-II, zac1, p73, VHL, MMAC1 / PTEN, DBCCR-1, FCC, rsk-3, p27, fusiones p27/p16, fusiones p21/p27, genes antitrombóticos (*por ejemplo*, COX-1, TFPI), PGS, Dp, E2F, ras, myc, neu, raf, erb, fms, trk, ret, gsp, hst, abl, E1A, p300, genes implicados en la angiogénesis (*por ejemplo*, VEGF, FGF, tromboespondina, BAI-1, GDAIF, o sus receptores) y MCC.

50 iii) Reguladores de la muerte celular programada

55 La apoptosis, o la muerte celular programada, es un proceso esencial para el desarrollo embrionario normal, manteniendo la homeostasia en tejidos adultos, y suprimiendo la carcinogénesis (Kerr y col., 1972). La familia de proteínas Bcl-2 y las proteasas análogas a ICE han demostrado ser importantes reguladores y efectores de la apoptosis en otros sistemas. La proteína Bcl-2, descubierta en asociación con el linfoma folicular, juega un prominente papel en el control de la apoptosis y la mejora de la supervivencia celular en respuesta a diversos estímulos apoptóticos (Bakhshi y col., 1985; Cleary y Sklar, 1985; Cleary y col., 1986; Tsujimoto y col., 1985; Tsujimoto y Croce, 1986). La proteína Bcl-2 evolutivamente conservada se reconoce ahora que es un miembro de proteínas relacionadas, que se puede clasificar como agonistas de la muerte o antagonistas de la muerte.

65 Posteriormente a su descubrimiento, se ha demostrado que Bcl-2 actúa para suprimir la muerte celular estimulada por varios estímulos. También, resulta ahora evidente que existe una familia de proteínas Bcl-2 reguladoras de la muerte celular que comparten una estructura común y homología de secuencias. Estos diferentes miembros de la familia han mostrado poseer funciones tanto similares a Bcl-2 (*por ejemplo* BclXL, Bclw, Bcls, Mcl-1, A1, Bfl-1) como

contrarrestar la función de Bcl-2 y promover la muerte celular (*por ejemplo*, Bax, Bak, Bik, Bim, Bid, Bad, Harakiri).

e. Cirugía

- 5 Aproximadamente un 60 % de las personas con cáncer se someten a cirugía de algún tipo, que incluye cirugía preventiva, de diagnóstico o de estadificación, curativa y paliativa. La cirugía curativa es un tratamiento del cáncer que se puede usar junto con otros tratamientos, tales como con los virus Vaccinia atenuados de la presente invención, quimioterapia, radioterapia, terapia hormonal, terapia génica, inmunoterapia y/o tratamientos alternativos.
- 10 La cirugía curativa incluye la resección, donde todo o parte del tejido canceroso se elimina, extirpa y/o se destruye físicamente. La resección tumoral se refiere a la eliminación física de al menos parte de un tumor. Además de la resección tumoral, el tratamiento por cirugía incluye la cirugía con láser, criocirugía, electrocirugía, y cirugía controlada microscópicamente (cirugía de Moh). Se contempla además que la presente invención se puede usar junto con la eliminación de cánceres superficiales, precánceres, o cantidades de menor importancia de tejido normal.
- 15 Tras la escisión de parte de todas las células, tejidos, o tumores cancerosos, se puede formar una cavidad en el cuerpo. El tratamiento se puede llevar a cabo mediante perfusión, inyección directa o aplicación local del área con tratamiento anticanceroso adicional. Se puede repetir dicho tratamiento, *por ejemplo*, cada 1, 2, 3, 4, 5, 6, o 7 días, o cada 1, 2, 3, 4, y 5 semanas o cada 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, o 12 meses. Estos tratamientos pueden ser también de dosificaciones variables.
- 20

f. Otros agentes

- 25 Se contempla que se pueden usar otros agentes en combinación con la presente invención para aumentar la eficacia terapéutica del tratamiento. Estos agentes adicionales incluyen agentes inmunomoduladores, agentes que afectan la regulación en exceso de los receptores superficiales celulares, y uniones GAP, agentes citostáticos y de diferenciación, inhibidores de la adhesión celular, agentes que aumentan la sensibilidad de las células hiperproliferativas a los inductores apoptóticos, u otros agentes biológicos. Los agentes inmunomoduladores incluyen el factor de necrosis tumoral, interferón α , β , y γ ; IL-2 y otras citoquinas; F42K y otros análogos de citoquinas; o MIP-1, MIP-1 β , MCP-1, RANTES, y otras quimioquinas. Se contempla además que la regulación en
- 30 exceso de los receptores superficiales celulares o sus ligandos, tales como el ligando de Fas / Fas, DR4 o DR5 / TRAIL (ligando de Apo-2) potenciaría las capacidades de inducción apoptótica de los virus atenuados de la presente invención mediante el establecimiento de un efecto autocrino o paracrino en las células hiperproliferativas. El aumento de la señalización intercelular elevando el número de uniones GAP podría aumentar los efectos antiproliferativos de la población de células hiperproliferativas adyacentes. En otras realizaciones, se pueden usar agentes citostáticos o de diferenciación para aumentar la eficacia antiproliferativa de los tratamientos. Se contemplan inhibidores de la adhesión celular para aumentar la eficacia. Los ejemplos de inhibidores de la adhesión celular son inhibidores de la quinasa de adhesión focal (FAK) y lovastatina. Se contempla además que se podrían usar otros agentes que aumentan la sensibilidad de una célula hiperproliferativa a la apoptosis, tales como el anticuerpo c225, para aumentar la eficacia del tratamiento.
- 35
- 40

- El ligando de Apo2 (Apo2l, denominado también TRAIL) es un miembro de la familia de las citoquinas del factor de necrosis tumoral (TNF). TRAIL activa una apoptosis rápida en muchos tipos de células cancerosas, además, no es tóxico para las células normales. El ARNm de TRAIL se produce en una amplia variedad de tejidos. La mayoría de
- 45 las células normales parecen ser resistentes a la acción citotóxica de TRAIL, sugiriendo la existencia de mecanismos que las protegen frente a la inducción de la apoptosis por TRAIL. El primer receptor descrito para TRAIL, denominado receptor 4 de muerte celular (DR4), contiene un "dominio de muerte" citoplásmico; DR4 transmite la señal de la apoptosis transportada por TRAIL. Se han identificado receptores adicionales que se unen a TRAIL. Un receptor, denominado DR5, contiene un dominio de muerte citoplásmico y señales de apoptosis muy similares a DR4. Los ARNm de DR4 y DR5 se expresan en muchos tejidos normales y en líneas de células tumorales. Recientemente, se han identificado receptores señuelos tales como DcR1 y DcR2 que evitan que TRAIL induzca la apoptosis a través de DR4 y DR5, estos receptores señuelos representan de esta manera un novedoso mecanismo para regular la sensibilidad a una citoquina pro-apoptótica directamente en la superficie de la célula. La expresión preferente de estos receptores inhibidores en tejidos normales sugiere que TRAIL puede ser útil como un
- 50 agente anticanceroso que induce la apoptosis en células cancerosas moderándose a la vez en células normales. (Marsters y *col.*, 1999).
- 55

- Se han hecho muchos avances en el tratamiento del cáncer tras la introducción de los fármacos quimioterapéuticos citotóxicos. Sin embargo, una de las consecuencias de la quimioterapia es el desarrollo/adquisición de fenotipos resistentes al fármaco y del desarrollo de resistencia a múltiples fármacos. El desarrollo de resistencia al fármaco sigue siendo un obstáculo principal en el tratamiento de dichos tumores y por tanto, existe una necesidad obvia de soluciones alternativas tales como la terapia génica.
- 60

- Otra forma de tratamiento para uso junto con la quimioterapia, la radioterapia o la terapia biológica incluye la hipertermia, que es un procedimiento en el que el tejido del paciente se expone a temperaturas elevadas (hasta de 106° F (41,11 °C)). Dispositivos de calentamiento externos o internos pueden estar implicados en la aplicación de
- 65

5 hipertermia local, regional, o de cuerpo completo. La hipertermia local implica la aplicación de calor a un área pequeña, tal como un tumor. El calor puede generarse externamente con ondas de alta frecuencia que se dirigen a un tumor procedentes de un dispositivo externo al cuerpo. El calor interno puede implicar una sonda estéril, incluyendo alambres finos calentados o tubos huecos rellenos con agua caliente, antenas de microondas implantadas, o electrodos de radiofrecuencia.

10 Un órgano o una extremidad del paciente se calienta para un tratamiento regional, que se lleva a cabo utilizando dispositivos que producen una energía elevada, tales como imanes. De forma alternativa, se puede extraer algo de sangre del paciente y calentarse antes de perfundirse en un área que se calentará internamente. Se puede implementar también el calentamiento de cuerpo completo en casos en los que el cáncer se ha diseminado a través del cuerpo. Se pueden usar mantas de agua caliente, cera caliente, bobinas de inducción, y cámaras térmicas para este fin.

15 Se puede usar un tratamiento hormonal junto con la presente invención o en combinación con cualquier otro tratamiento contra el cáncer anteriormente descrito. Se puede emplear el uso de hormonas en el tratamiento de determinados cánceres tales como el cáncer de mama, de próstata, de ovario, o de cuello de útero para disminuir el nivel o el bloque de efectos de determinadas hormonas tales como la testosterona o el estrógeno. Este tratamiento se usa a menudo en combinación con al menos otro tratamiento contra el cáncer como una opción de tratamiento o para reducir el riesgo de metástasis.

20

TABLA 5
Oncogenes

<i>Gen</i>	<i>Fuente</i>	<i>Enfermedad humana</i>	<i>Función</i>
Factores del crecimiento	Transfección		Miembro de la familia FGF
<i>HST/KS</i>	Inserción del promotor MMTV		Miembro de la familia FGF
<i>INT-2</i>			
<i>INT1/WNT1</i>	Inserción del promotor MMTV		Tipo Factor
<i>SIS</i>	Virus del sarcoma simio		PDGF B
Receptor de tirosina quinasas			
<i>ERBB/HER</i>	Virus de la eritroblastosis aviar; inserción del promotor ALV; tumores amplificados humanos	Cáncer epinocelular amplificado borrado; glioblastoma	EGF/TGF- α /Anfirregulina/receptor de hetacelulina
<i>ERBB-2/NEU/HER-2</i>	Transfectado desde glioblastomas de rata	Cánceres ampliados de mama, de ovario y gástrico	Regulado por factores relacionados con NDF/
<i>FMS</i>	Virus del sarcoma felino SM		Heregulina y EGF Receptor CSF-1
<i>KIT</i>	Virus del sarcoma felino HZ		Receptor MGF/Steel
<i>TRK</i>	Transfección desde cáncer de colon humano		Hematopoyesis Receptor NGF (factor de crecimiento del nervio)
<i>MET</i>	Transfección desde osteosarcoma humano		Receptor del factor de dispersión/HGF
<i>RET</i>	Translocaciones y mutaciones puntuales	Cáncer de tiroides esporádico; Cáncer de tiroides medular familiar; múltiples neoplasias endocrinas 2A y 2B	Quinasa del receptor huérfano de Tyr
<i>ROS</i>	Virus del sarcoma aviar UR11		Quinasa del receptor huérfano de Tyr
Receptor de <i>PDGF</i>	Translocación	Leucemia mielomonocítica crónica	Fusión TEL(factor de transcripción análogo a ETS) / (gen del receptor de PDGF
Receptor de <i>TGF-β</i>		Carcinoma de colon con diana de mutación no emparejada	

Gen	Fuente	Enfermedad humana	Función
Receptor no de tirosina cinasas			
<i>ABI</i>	Abelson Mul.V	Leucemia mielógena crónica, translocación con BCR	Interactúa con RB, ARN polimerasa, CRK, CBL
<i>FPS/FES</i>	SV aviar Fujinami; FeSV		
<i>LCK</i>	Inserción del promotor Mul. V (virus de la leucemia murina)		Familia Src; señalización de linfocitos T; interactúa con linfocitos T CD4/CD8
<i>SCR</i>	Virus del sarcoma aviar de Rous		Tyr-quinasa asociada a membrana con función de señalización; activada por quinzas del receptor
<i>YES</i>	Virus aviar Y73		Familia Src; señalización
PROTEÍNAS QUINASAS SER/THR			
<i>AKT</i>	retrovirus AKT8 murino		Regulado mediante PI(3)K?;
<i>MOS</i>	SV de Maloney murino		Regula S6 k de 70 kd? GVBD; factor citostático; quinasa MAP
<i>PIM-1</i>	Inserción del promotor de ratón		
<i>RAF/MIL</i>	SV 3611 murino; SV aviar MH2		Señalización de la ruta RAS
SUPERFICIE CELULAR HETEROGÉNEA			
<i>APC</i>	Supresor del tumor	Cáncer de colon	Interactúa con cateninas
<i>DCC</i>	Supresor del tumor	Cáncer de colon	Dominios CAM
E-caderina	Candidato a supresor del tumor	Cáncer de mama	Unión homotípica extracelular; interactúa con cateninas intracelularmente
<i>PTC/NBCCS</i>	Supresor del tumor y homología con <i>Drosophila</i>	Síndrome del nevo de células basales (síndrome de Gorline)	Dominio 12 transmembrana; la señales a través del homólogo Gli de CI antagonizan la ruta de Hedgehog
Homólogo de <i>TAN-1</i>	Translocación	T-ALI.	Señalización
Notch			
SEÑALIZACIÓN HETEROGÉNEA			
<i>BCR-2</i>	Translocación	Linfoma de linfocitos B	Apoptosis
<i>CBL</i>	Mu Cas NS-1 V		El dedo RING interactúa con Abl
<i>CRK</i>	CT1010 ASV		SH2/SH3 interactúa con Abl
<i>DPC4</i>	Supresor del tumor	Cáncer pancreático	Ruta de señalización relacionada con TGF-β
<i>MAS</i>	Transfección y tumorigenicidad		Posible receptor de angiotensina
<i>NCK</i>			Adaptador SH2/SH3
Gen	Fuente	Enfermedad humana	Función
INTERCAMBIADORES Y PROTEÍNAS DE UNIÓN AL NUCLEÓTIDO GUANINA			
<i>BCR</i>		Translocado con ABL en CML	Intercambiador, proteína quinasa
<i>DBL</i>	Transfección		Intercambiador
<i>GSP</i>			
<i>NF-1</i>	Supresor del tumor hereditaria	Supresor del tumor	RAS GAP
<i>OST</i>	Transfección	Neurofibromatosis	Intercambiador
Harvey-Kirsten, N- <i>RAS</i>	HaRat SV; Ki RaSV; Balb-MoMuSV; transfección	Mutaciones puntuales en muchos tumores humanos	Cascada de señales
<i>VAV</i>	Transfección		S112/S113; Intercambiador
PROTEÍNAS NUCLEARES Y FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN			
<i>BRCA1</i>	Supresor hereditario	Cáncer de mama / cáncer de ovario	Localización no determinada
<i>BRCA2</i>	Supresor hereditario	Cáncer de mama	Función desconocida
<i>ERBA</i>	Virus de la eritroblastosis aviar		Receptor de la hormona tiroidea (transcripción)

<i>ETS</i>	Virus E26 aviar		Unión a ADN
<i>EVII</i>	Inserción del promotor MuLV	ELA	Factor de transcripción
<i>FOS</i>	Virus de los osteosarcomas murinos FBI/FBR		Factor de transcripción con c-JUN
<i>GLI</i>	Glioma ampliado	Glioma	Dedo de cinc; el homólogo de <i>cubitus Interruptus</i> se encuentra en la ruta de señalización hedgehog; unión con inhibición a PTC y hedgehog
<i>HMGII/LIM</i>	Translocación t(3:12) t(12:15)	Lipoma	Fusiones génicas en el grupo de alta movilidad HMGI-C (XT-gancho) y factor de transcripción LIM o dominio ácido
<i>JUN</i>	ASV-17		Factor de transcripción AP-1 con FOS
<i>MLL/VHRX + ELI/MEN</i>	Translocación/fusión ELL con MLL del gen análogo a Trithorax	Leucemia mieloide aguda	Fusión génica de unión a ADN y metil transferasa MLL el factor de elongación ELI ARN pol IIr
<i>MYB</i>	Virus de la mieloblastosis aviar		Unión a ADN
<i>MYC</i>	Aviar MC29; Translocación en linfomas de linfocitos B; inserción del promotor; virus de la leucosis aviar	Linfoma de Burkitt	Unión a ADN con el ligante MAX; regulación de ciclina; interactúa con RB? Regula la apoptosis?
<i>N-MYC</i>	Amplificado	Neuroblastoma	
<i>L-MYC</i>		Lung cancer	
<i>REL</i>	Virus de la reticuloendoteliosis aviar		Factor de transcripción de la familia NF-κB
<i>SKI</i>	Retrovirus SKV770 Aviar		factor Factor de transcripción
	Retrovirus		
<i>VHL</i>	Supresor hereditario	Síndrome de Von Hippel-Landau	Regulador negativo o elongina; complejo de elongación transcripcional
<i>WT-1</i>		Tumor de Wilm	Factor de transcripción
RESPUESTA A DAÑOS EN EL CICLO CELULAR/ADN			
<i>ATM</i>	Trastorno hereditario	Ataxia-telangiectasia	Homología de proteína quinasa /líquido; respuesta a daño celular corriente arriba en la ruta P53
<i>BCL-2</i>	Translocación	Linfoma folicular	Apoptosis
<i>FACC</i>	Mutación puntual	Anemia de Fanconi Grupo C (predisposición a leucemia)	
<i>FHIT</i>	Sitio frágil 3p14.2	Carcinoma de pulmón	Histidina relacionada con tríada Diadenosina 5'.3'''-P ¹ .p ⁴ tetrafosfato
<i>hMLIIMutL</i>		cáncer colorrectal hereditario no asociado a poliposis	Hidrolasa asimétrica Reparación de emparejamiento incorrecto; homólogo de MutL
<i>HMSH2/MutS</i>		cáncer colorrectal hereditario no asociado a poliposis	Reparación de emparejamiento incorrecto; homólogo de MutS

<i>HPMS1</i>		cáncer colorrectal hereditario no asociado a poliposis	Reparación de emparejamiento incorrecto; homólogo de MutL
<i>hPMS2</i>		cáncer colorrectal hereditario no asociado a poliposis	Reparación de emparejamiento incorrecto; homólogo de MutL
<i>INK4/MTS1</i>	Adyacente INK-4B ent 9p21; complejos CDK	Supresor candidato de MTS1 y del gen del melanoma	Inhibidor de p16 CDK
<i>INK4B/MTS2</i>		Candidato supresor	Inhibidor de p15 CDK
<i>MDM-2</i>	Amplificado	Sarcoma	Regulador negativo de p53
<i>p53</i>	Asociación con el antígeno SV40 T	Mutado >50 % tumores humanos incluyendo el síndrome de Li-Fraumeni hereditario	Factor de transcripción
<i>PRAD1/BCL1</i>	Translocación con la hormona paratiroidea o con IgG	Adenoma paratiroideo; linfocitos B	apoptosis Ciclina D
<i>RB</i>	Retinoblastoma hereditario; asociación con muchos ADN de antígenos de virus tumorales	Retinoblastoma; Osteosarcoma; cáncer de mama, otros cánceres esporádicos	Interactúa con ciclina/cdk; Regula el factor de transcripción de E2F
<i>XPA</i>	virus tumor Antigenes	Xeroderma pigmentoso; Predisposición a cáncer de piel	Reparación de escisiones; reconocimiento de fotoproducto; dedo de cinc

Ejemplos

EJEMPLO ANTECEDENTE 1

5

Propagación de virus vaccinia en líneas celulares

Se evaluó un panel de 16 diferentes cepas de laboratorio/mutantes del virus vaccinia disponibles de manera rutinaria (y el virus de la viruela del conejo, y otros poxvirus): Copenhagen, Dairen, Evans, USSR, Tashkent, Tian Tan, WR, IHD-J, IHD-W, Lister, NYCBOH, Patwadangar, mutantes King, y WR B8R, B 18R y B 13R. Se evaluó la replicación en células cancerosas y en células normales. Un virus preferido tendría una replicación relativamente elevada en células cancerosas y una replicación reducida en células normales (*es decir*, una relación o índice terapéutico más grande entre las células tumorales y las normales). Se ensayaron dos líneas de células tumorales humanas: carcinoma de colon A2780 y carcinoma de colon HCT116 (American Type Culture Collection). Las células normales incluyeron células epiteliales bronquiales humanas normales (NHBE). Para los ensayos del efecto citopático que utilizan células proliferativas, se hicieron crecer células hasta una confluencia del 70 % (DMEM con FBS al 2 %) en cuyo momento se infectaron las células con multiplicidades de infección (MOI) de 0,001 a 10. Cinco a seis días más tarde se tiñeron las placas con MTT (Promega) y se cuantificó la absorbancia. Las células normales se convirtieron en no proliferativas tras crecer a confluencia completa y cultivo posterior en DMEM con FBS al 0,2 %. Se confirmó la ausencia de proliferación mediante el análisis del ciclo celular y los recuentos celulares. Se evaluó cada muestra por cuadruplicado y se repitió al menos dos veces. Para los ensayos de replicación vírica, se hicieron crecer las células hasta una confluencia del 70 % (37° C, CO₂ al 5 %, DMEM con FBS al 2 %, con suplementación adicional del factor de crecimiento para las células NHBE como en Heise y col., (2000), en cuyo momento se infectaron las células con multiplicidades de infección (MOI, relación de partículas por célula) de 1 o 10 con cada virus. Después de tres horas de incubación, se retiró el medio y se sustituyó con medio suplementado reciente. Cuarenta y ocho horas después (los datos previos habían demostrado que la replicación de vaccinia tuvo un pico en este punto temporal), se recogieron tanto las células como el sobrenadante para el análisis de valoración del virus. Los lisados celulares se sometieron a tres ciclos de congelación y descongelación, seguidos por un pulso de 30 segundos en un baño sonicador de agua. A continuación los virus se purificaron mediante un amortiguador de sacarosa y se valoraron diluciones en serie de sobrenadantes y lisados en células BSC-1 (la purificación y la valoración tal como se describen en Alcami y Smith, (1995).

En la FIG. 1-4 se muestran los resultados a modo de ejemplo. La replicación del virus Copenhagen en dos líneas de carcinomas fue equivalente o superior a todos los demás virus en los ensayos (FIG. 1A y 1B; el eje y son unidades formadoras de placa por ml +/- S.E.). En contraste, en las células humanas normales Copenhagen se atenuó con respecto a otros virus (FIG. 2). Finalmente, se muestran las relaciones de rotura en células cancerosas a células normales para todos los virus en la FIG. 3 (A2780: NHBE) y FIG. 4 (HCT116: NHBE). Copenhagen tuvo una relación de rotura significativamente mayor en A2780 (P<0,001) y HCT116 (p<0,001). Aunque la relación de rotura fue aproximadamente de 20.000 y 30.00 para Copenhagen, todos los otros virus tuvieron relaciones menores de cinco mil, y la mayoría fueron menores de dos mil (*por ejemplo*, Lister y Wyeth). De forma similar. La destrucción de la

40

célula tumoral por Copenhagen en los ensayos del efecto citopático in vitro en A27870 y HCT116 fue mayor que o igual a la de las cepas Lister y NYCBOH.

EJEMPLO ANTECEDENTE 2:

5

Virus Vaccinia en combinación con paclitaxel

Aunque se han ensayado virus tales como adenovirus y VHS en combinación con quimioterapia, no se ha hecho con virus vaccinia (incluyendo la cepa Copenhagen) Se ha diseñado el VV mediante ingeniería genética para expresar enzimas activadoras de profármacos (*por ejemplo*, timidina quinasa, se han ensayado en combinación con profármacos relativamente no tóxicos que se vuelven tóxico tras la activación por el producto génico activador del fármaco. (Puhlmann y *col.*, 2000).

La sinergia entre los agentes quimioterapéuticos citotóxicos normalizados que se han homologado para el tratamiento de pacientes con cáncer podría ser una característica favorable de un poxvirus, incluyendo vaccinia y específicamente la cepa Copenhagen. Paclitaxel (también denominado taxol) está homologado para su uso en pacientes con cáncer en los Estados Unidos y Europa. VV Copenhagen se ha evaluado en combinación con Taxol en las líneas de células cancerosas HCT116 y LNCaP. La generación y el análisis del isoblograma han mostrado sinergia de VV en combinación con Taxol (FUG. 5). Se generaron los isoblogramas utilizando datos derivados de un ensayo MTS tales como un Ensayo de Proliferación Celular No Radioactivo Acuoso CellTiter86® (Nº de catálogo G5421, Promega Corp., Madison, W) sobre la supervivencia celular ilustrado en la FIG. 6, 7, 8 y 9. Todos los puntos de datos en la FIG. 5 están por debajo de la línea que simboliza las posiciones esperadas de los puntos de datos sin no estuvieran presentes la sinergia ni el antagonismo; por tanto, estos puntos de datos respaldan la interacción sinérgica en la destrucción de estas líneas celulares de carcinomas.

25

Los métodos incluyeron el crecimiento de líneas celulares en placas de 96 pocillos en CO₂ al 5 % a 37° DMEM más FCS al 10 %. Una vez que las células alcanzaron aproximadamente un 50 % de confluencia, el medio se cambió a DMEM más FCS al 2 % y se trataron con paclitaxel (intervalo de la dosis de 3×10^{-8} a 3×10^{-4} , en incrementos logarítmicos) y/o virus (VV Copenhagen a una MOI de 10^{-6} a 10^5 partículas por célula). Las células fueron 1) tratadas de forma simulada, 2) tratadas solo con virus, 3) tratadas solo con taxol, 4) tratadas con virus seguido por tratamiento con taxol. Las células se infectaron un total de 6 días y a continuación se colocaron en el ensayo MTS (véanse las instrucciones del fabricante). Las células se expusieron a taxol durante 6 días en total y a continuación se colocaron en el ensayo MTS (véanse las instrucciones del fabricante). Las células tratadas con la combinación se infectaron de manera idéntica a las del grupo de tratamiento solamente con virus y se trataron posteriormente con taxol (en relaciones fijas de virus:taxol) inmediatamente como se realizó antes. A continuación las células se evaluaron como anteriormente. Los datos de supervivencia de las células MTS se expresaron como porcentaje de supervivencia de las células del control como en la FIG. 6, 7, 8, y 9. El análisis de los datos para la evaluación de la sinergia (generación y análisis del isoblograma) fue como se describe en Nielsen y *col.* (1997, 1998). De manera breve, se generaron curvas de dosis respuesta para calcular los valores de CE₅₀ para cada línea de células (en comparación con células no tratadas) para cada célula (*es decir*, y todas las condiciones del ensayo). Se utilizaron nueve concentraciones de cada agente (véase anteriormente) solos y en combinación. Se incluyeron cuatro diferentes diluciones para VV/paclitaxel en cada experimento (3, 33, 333, 3333). Se generaron los isoblogramas para determinar los efectos sinérgicos o antagonísticos. Cada punto de datos representó muestras por triplicado.

45

EJEMPLO ANTECEDENTE 3

Resultados de regresión tumoral a partir de la administración de virus Vaccinia

Se formaron xenoinjertos subcutáneos tumorales de murino inyectando 5×10^5 células CMT-64 o 10^6 células CMT-93 (carcinoma rectal de murino) suspendidas en 100 µl de PBS por vía subcutánea en los flancos de ratones C57B/6. En el primer experimento se inyectaron cepas VV WR mutantes en B8R y B18R en tumores CMT-93 subcutáneos (valores iniciales estimados de los tamaños tumorales 40-100 µl) en los flancos de ratones C57/B6 inmunocompetentes a dosis de 10^4 a 10^8 partículas suspendidas en 40 µl por día en los días 1, 3 y 5. Se preparó una única punción de aguja en el centro del tumor y se practicaron cuatro tractos de aguja en cada cuadrante del tumor. Se inyectó aproximadamente 1 cuarto de la disolución en cada tracto a medida que la aguja se retiraba. Los controles recibieron tratamiento idéntico con virus inactivado con psoralen-UV o PBS. Se llevaron a cabo medidas bidimensionales del tumor bisemanalmente y se estableció el volumen del tumor mediante la siguiente fórmula. (longitud) (anchura) (anchura) (3,14/6).

Se demostraron efectos antitumorales significativos y un aumento de la supervivencia en comparación con los tumores a los que se inyectó el vehículo o el control vírico inactivado, y se observó una relación dosis-respuesta. Ocho de diez ratones tratados con 10^8 - 10^{10} B8R-VV mutante tuvieron regresiones tumorales completas y permanecieron sin tumor a lo largo del periodo de seguimiento (un total de 3 meses). Nueve de diez ratones que recibieron B18R a los mismos niveles de dosis tuvieron regresiones completas y permanecieron sin tumor a lo largo del mismo periodo de seguimiento. Solo se señaló una regresión completa duradera en los grupos del control. La supervivencia promedio fue de dos semanas y todos los ratones se sacrificaron en el día 24 después del

65

tratamiento. La supervivencia aumentó significativamente en los grupos de tratamiento con 10^8 a 10^{10} partículas (análisis de supervivencia KM, prueba del rango logarítmico: $p < 0,01$). Se observó que los animales tenían un aspecto grueso (*por ejemplo*, actividad, piel alborotada) y se pesaron dos veces semanalmente, no se notificaron cambios significativos en el peso o en la apariencia).

5 A continuación se llevó a cabo un régimen de tratamiento/inyección idéntico con B18R y un vehículo control en el modelo de xenoinjerto de tumor CMT-64 murino. Aunque no se demostraron respuestas completas, el retraso en el tiempo hasta la progresión del tumor que requirió el sacrificio fue muy significativo para el grupo de tratamiento con B18R frente a PBS o al virus inactivado con psoralen-UV (mediana aproximadamente 2 semanas frente a 4
10 semanas; $p < 0,05$, prueba del rango logarítmico, análisis de Kaplan-Meier del tiempo hasta el sacrificio debido a la progresión del tumor).

EJEMPLOS ILUSTRATIVO 4:

Aumento de la eficacia de EEV con respecto a xenoinjertos de tumor de murino

Se formaron xenoinjertos subcutáneos de tumor murino inyectando 5×10^5 células JC de carcinoma de mama murino suspendidas en 100 μ l de PBS por vía subcutánea en los flancos de ratones BALB/c inmunocompetentes. Se inyectaron virus VV Western Reserve (WR sin la mutación IHD-J) el mutante IHD-J del virus WR (mutación A34R/K151D) o PBS en tumores JC subcutáneos, una vez que alcanzaron los tamaños inyectables (valores iniciales de los tamaños tumorales 40-100 μ l). Las dosis de virus fueron de 10^{10} partículas por día, se suspendieron en 40 μ l de PBS, en los días 1, 3 y 5 ($n = 8$ ratones por grupo de tratamiento). Se inyectó un control de PBS en un régimen similar. Se preparó una única punción de aguja en el centro del tumor y se inyectaron 4 tractos de aguja en cada cuadrante del tumor. Se inyectó aproximadamente un cuarto de la disolución en cada tracto a medida que la aguja se retiraba. Los controles recibieron idéntico tratamiento con PBS. Se llevaron a cabo medidas bidimensionales bisemanalmente y se estimó el volumen del tumor mediante la siguiente fórmula: (longitud) (anchura) (anchura) (3,14/6).

El grupo tratado con IHD-J demostró efectos antitumorales significativos (retraso del crecimiento del tumor y acortamiento del tumor) y aumentó el tiempo hasta la progresión del tumor que requería el sacrificio (es decir, la supervivencia) en comparación con los grupos tratados con PBS o los grupos tratados con Western Reserve. Basándose en el análisis de supervivencia de Kaplan-Meier, el tiempo hasta la progresión del tumor que requería el sacrificio (supervivencia) del grupo IHD-J fue significativamente superior a PBS (valor $p < 0,05$) y WR (valor $p < 0,05$) basándose en la prueba estadística del rango logarítmico (utilizado para comparar las curvas de supervivencia). La mediana del tiempo de supervivencia fue de 2 semanas para los dos grupos del control frente a 4,5 semanas para IHD-J. Ninguno de los ratones en ningún grupo de tratamiento demostró toxicidad importante significativa y no se produjeron muertes entre los animales que estuvieran relacionadas con el tratamiento. La mutación IHD-J condujo a una mejora significativa en la eficacia antitumoral (en comparación con el virus WR sin la mutación IHD-J) sin aumento de la toxicidad. Los tumores crecerán subcutáneamente y el tratamiento se iniciará cuando alcancen 2-6 mm de diámetro.

EJEMPLO ANTECEDENTE 5

Deleción del gen de unión a interferón y aumento de la selectividad para las células cancerosas resistentes a IFN frente a las células normales

Se llevaron a cabo estudios para evaluar si los poxvirus con deleciones en los genes de unión a interferón (IFN) tenían una selectividad tumoral mayor, y una replicación reducida en células normales, en comparación con los poxvirus del control naturales. Se compararon WR (Western Reserve) y un mutante de WR con una deleción en el gen B18R (B18R) para la replicación en presencia o ausencia de IFN-alfa (1.000 unidades/ml aplicadas 5 horas después de la infección *in vitro*) (FIG. 10). Las células ensayadas fueron células epiteliales bronquiales humanas (NHBE, Clonetics Corp., USA), células C33A de carcinoma de cuello de útero humano (ATCC) y células HCT116 de carcinoma de colon humano (ATCC). En un estudio piloto, estas células se pretrataron inicialmente con IFN (5.000 unidades/ml) durante 24 horas antes de la infección con estos virus para determinar su sensibilidad a los efectos del interferón sobre la replicación vírica. Tal como se esperaba, ambos virus fueron igualmente sensibles a la supresión mediante un pretratamiento con interferón. Se demostró que las células NHBE y HCT116 eran sensibles a IFN ya que la replicación vírica se redujo significativamente en presencia de un pretratamiento con IFN, las células C33A fueron resistentes a IFN ya que el pretratamiento con IFN no tuvo impacto significativo sobre la replicación vírica.

Las células cancerosas se hicieron crecer en DMEM con FCS al 10 %, las células normales se hicieron crecer en DMEM con suplemento de suero tal como se describe en las instrucciones del fabricante. Se infectaron las células a una multiplicidad de infección (moi) de 10 partículas por célula cuando las células alcanzaron aproximadamente una confluencia del 70 %. Cinco horas después de la infección, se añadió IFN al medio a una concentración de 1.000 unidades/ml (células IFN+) o sin lo anterior (células IFN-). Se recogieron las células y el lisado 48 horas después de la infección y se llevaron a cabo el aislamiento del VV y las valoraciones del virus (determinación de las unidades formadoras de placas) (valoración en células BS-C-1 tal como se describe en Tschärke y *col.*, 2002). Tal como se

muestra en la FIG. 10, VV con una mutación en B18R tiene la replicación significativamente inhibida en presencia de IFN en los dos tipos de células sensibles a IFN, incluyendo NHBE ($p < 0,01$, prueba de la t de Student comparado con en ausencia de IFN). En contraste, este virus mutante no está inhibido en las células de carcinoma C33A resistente a IFN. Tal como se esperaba, el WR natural no se vio afectado por el tratamiento con IFN debido a la presencia del producto génico B18R funcional ($P=0,8$). Se obtuvieron resultados similares con otras líneas celulares de carcinoma resistentes a IFN. Por tanto, la delección del gen B18R de unión a IFN dio como resultado un aumento del índice terapéutico y de la protección celular normal en comparación con el virus natural.

Los mutantes de unión a IFN en B8R y B18R demostraron también eficacia antitumoral en un modelo de xenoinjerto de tumor de murino. El relativo aumento de la seguridad resultante de la delección de B18R y/o B8R quedará subestimado en ratones debido a que las versiones de las moléculas de IFN de murino se unieron con afinidad significativamente reducida (*Symons y col.*, 2002). Se pueden llevar a cabo estudios adicionales utilizando estudios de inyecciones intradérmicas llevados a cabo en conejos o primates no humanos utilizando los métodos descritos en *Symons y col.*, y se pueden obtener resultados que son similares a los resultados notificados en el anterior para conejos (el mutante B8R de VV demostró un aumento del reclutamiento de células inflamatorias y como resultado una eliminación acelerada del virus a partir de las lesiones cutáneas en comparación con el control natural). Por tanto, la eficacia antitumoral y la eliminación vírica acelerado a partir de células normales se ha demostrado *in vitro* y se puede demostrar *in vivo* (*Symons y col.*).

20 EJEMPLO PROFÉTICO 6:

Pérdida de la función de modulación de TNF

Los virus correspondientes con y sin delección/inactivación de uno o más genes inhibidores de las citoquinas o quimioquinas (*por ejemplo*, vaccinia WR natural y un mutante con una delección en B29R / vCKBP) se utilizarán para infectar tumores de murino (*por ejemplo* CMT-93, CMT-64 o JC) en ratones inmunocompetentes (C57B/6 o BALB/c). Esta comparación solo será válida si el producto génico vírico es capaz de inhibir las citoquinas/quimioquinas de murino hasta un grado similar a la versión humana. La replicación vírica (unidades formadoras de placa en el tiempo), los niveles de quimioquina CC (*por ejemplo*, tinción inmunohistoquímica o ensayo ELISA), niveles de citoquinas (*por ejemplo*, tinción inmunohistoquímica (IHC) o ensayo ELISA) e infiltración de células inflamatorias (H y E, o tinción IHC) se evaluará en tejidos tumorales y tejidos normales tras la administración intravenosa y/o intratumoral (10^5 a 10^{10} formas de partículas víricas, administradas en de 1 a 6 dosis). Además, la eficacia antitumoral (curvas de regresión tumoral/supervivencia de Kaplan-Meier) y la toxicidad (pérdida de peso, hematología; y análisis de química sérica) se evaluarán para ambos virus. El resultado sería que el/los virus mutantes demostrarían 1) un aumento de la eficacia e inducción de la inflamación en el interior de los tumores (*por ejemplo*, aumento del reclutamiento de células inmunofectoras; 2) replicación y toxicidad similares o reducidas en tejidos normales (*por ejemplo*, hígado, bazo, pulmón y/o cerebro); 3) e inducción aumentada o mantenida de la inmunidad mediada por células específicas del tumor. Finalmente, se espera que la eficacia antitumoral en combinación con quimioterapia y/o radioterapia sea mayor para el(los) virus mutante(s) que para el virus natural. Se pueden llevar a cabo también estudios de toxicidad en conejos o primates no humanos para caracterizar adicionalmente un virus de la presente invención (*Tscharke y col.*, 2002).

45 EJEMPLO PROFÉTICO 7:

Pérdida de la función moduladora del interferón

Los virus correspondientes con y sin delección/inactivación de uno o más polipéptidos de unión a interferón (*por ejemplo*, vaccinia WR natural y un mutante con una delección en B18R) se utilizarán para infectar tumores en animales inmunocompetentes cuyas moléculas IFN diana se unen de manera eficaz mediante el producto génico del virus vaccinia, tal como se ha descrito en los ejemplos anteriores. Se debe señalar que, puesto que el interferón murino es relativamente resistente al(a los) polipéptido(s) de VV en comparación con el interferón humano, se espera que los resultados en ratones sean mucho menos significativos de lo que serán en seres humanos. La replicación vírica y la diseminación en tejidos tumorales y tejidos normales se evaluarán tras la administración intravenosa y/o intratumoral, tal como se ha descrito anteriormente. Además, se evaluará la eficacia antitumoral y la toxicidad de ambos virus, tal como se ha descrito anteriormente. El resultado esperado sería que el(los) virus mutante(s) mostraría(n) una replicación y toxicidad reducidas en tejidos normales (*por ejemplo*, hígado, bazo, pulmón y/o cerebro) pero se podrían seguir produciendo la replicación y la inducción de necrosis en los tumores. El virus vaccinia natural (*por ejemplo* WR) demostrará un diferencial de replicación/inducción de necrosis más pequeño entre tejidos normales y tumorales. Además, los tumores tratados con el(los) virus mutante(s) tendrán una vascularidad reducida (*por ejemplo*, mediante la tinción de H y E, IHC para CD31 en marcadores vasculares equivalentes) en comparación con los controles tratados con suero salino y con los tumores del control tratados con virus natural. Finalmente, se espera que la eficacia antitumoral inmunomediada y la eficacia en combinación con quimioterapia y/o radiación sean mayores con el(los) virus mutante(s) que con el virus natural. Se pueden llevar a cabo estudios de toxicidad en conejos o en primates no humanos para caracterizar adicionalmente un virus de la presente invención (*Tscharke y col.*, 2002).

EJEMPLO PROFÉTICO 8:**Pérdida de función del inhibidor de la serina proteasa**

5 Los virus correspondientes con y sin delección/inactivación de los genes anti-apoptosis podrían utilizarse para infectar tumores en ratones inmunocompetentes, tal como se ha descrito anteriormente. Los virus incluyen, pero no se limitan a virus vaccinia con o sin expresión de B 13R (SPI-2). La replicación y la diseminación víricas en tejidos tumorales y tejidos normales se evaluarían tras la administración intravenosa, tal como se ha descrito anteriormente. Además, podrían evaluarse la eficacia antitumoral y la toxicidad de los virus mutantes tras la administración intratumoral y/o intravenosa, tal como se ha descrito anteriormente. El resultado esperado sería que los virus mutantes demostrarían una replicación y toxicidad reducidas en tejidos normales, y/o se eliminarían más rápidamente a partir de tejidos normales, en comparación con tejidos tumorales. El virus natural mostraría un diferencial más pequeño (si acaso) entre la replicación y la toxicidad en tejidos normales en comparación con los tejidos normales. Se espera que la eficacia antitumoral del(de los) virus mutante(s), tras la administración intratumoral, intraperitoneal, intravenosa u otras rutas de administración, sea equivalente o superior a la eficacia con el virus natural. Los estudios de quimioterapia combinada podrían utilizar el mismo sistema como modelo. Los ratones recibirían vehículo (placebo), quimioterapia solo, virus solo (natural o mutante) o virus más quimioterapia. Se espera que la eficacia con el virus mutante más la quimioterapia sea superior a la quimioterapia solo y al virus natural más quimioterapia. Se esperan hallazgos similares en combinación con la radioterapia.

EJEMPLO PROFÉTICO 9:**Pérdida de la función de control del complemento**

25 Los virus correspondientes con y sin delección/inactivación de los genes VCP podrían utilizarse para infectar tumores en ratones inmunocompetentes, tal como se ha descrito anteriormente. Podrían evaluarse la replicación y la diseminación víricas en tejidos tumorales y tejidos normales tras la administración intravenosa u otras rutas de administración, tal como se ha descrito anteriormente. Además, podrían evaluarse la eficacia antitumoral y la toxicidad de los virus mutantes, tal como se ha descrito anteriormente, tras la administración intratumoral y/o intravenosa. El resultado esperado sería que los virus mutantes demostrarían una replicación y toxicidad reducidas en tejidos normales, y/o se podrían eliminar más eficazmente a partir de tejidos normales, en comparación con tejidos tumorales. El virus natural mostraría un diferencial más pequeño (si acaso) entre la replicación y la toxicidad en tejidos normales en comparación con el de los tejidos tumorales. La eficacia antitumoral del(de los) virus mutante(s), tras la administración intratumoral, intraperitoneal, intravenosa u otras rutas de administración, sería equivalente o superior a la eficacia con el virus natural. Los estudios de tratamientos combinados utilizarían el mismo sistema de modelo. *Por ejemplo*, los ratones recibirían vehículo (placebo), quimioterapia sola, virus solo (natural o mutante) o virus más quimioterapia. Se espera que la eficacia con el virus mutante más la quimioterapia sea superior a la quimioterapia sola y al virus natural más la quimioterapia. Se demostrarán resultados similares con anticuerpos monoclonales dirigidos al tumor en combinación con estos virus.

Referencias

- 45 Patentes de los Estados Unidos 4. 554. 101, 4. 683. 195, 4. 683. 202, 4. 684. 611, 4. 800. 159 4. 879. 236, 4. 883. 750, 4. 946. 773, 4. 952. 500, 5. 220. 007, 5. 279. 721, 5. 284. 760, 5. 302. 523, 5. 322. 783, 5. 354. 670, 5. 366. 878, 5. 384. 253, 5. 389. 514, 5. 399. 363, 5. 464. 765, 5. 466. 468, 5. 538. 877, 5. 538. 880, 5. 543. 158, 5. 550. 318, 5. 563. 055, 5. 580. 859, 5. 589. 466, 5. 591. 616, 5. 610. 042, 5. 633. 016, 5. 635. 377, 5. 641. 515, 5. 656. 610, 5. 702. 932, 5. 736. 524, 5. 739. 169, 5. 780. 448, 5. 789. 166, 5. 789. 215, 5. 798. 208, 5. 798. 339, 5. 801. 005, 5. 824. 311, 5. 824. 348, 5. 830. 650, 5. 830. 880, 5. 840. 873, 5. 843. 640, 5. 843. 650, 5. 843. 651, 5. 843. 663, 5. 846. 225, 5. 846. 233, 5. 846. 708, 5. 846. 709, 5. 846. 717, 5. 846. 726, 5. 846. 729, 5. 846. 783, 5. 846. 945, 5. 849. 481, 5. 849. 483, 5. 849. 486, 5. 849. 487, 5. 849. 497, 5. 849. 546, 5. 849. 547, 5. 851. 770, 5. 851. 772, 5. 853. 990, 5. 853. 992, 5. 853. 993, 5. 856. 092, 5. 858. 652, 5. 861. 244, 5. 863. 732, 5. 863. 753, 5. 866. 331, 5. 866. 337, 5. 866. 366, 5. 871. 740, 5. 871. 986, 5. 882. 864, 5. 900. 481, 5. 905. 024, 5. 910. 407, 5. 912. 124, 5. 912. 145, 5. 912. 148, 5. 916. 776, 5. 916. 779, 5. 919. 626, 5. 919. 630, 5. 922. 574, 5. 925. 517, 5. 925. 525, 5. 925. 565, 5. 928. 862, 5. 928. 869, 5. 928. 870, 5. 928. 905, 5. 928. 906, 5. 928. 906, 5. 929. 227, 5. 932. 413, 5. 932. 451, 5. 935. 791, 5. 935. 819, 5. 935. 825, 5. 939. 291, 5. 942. 391, 5. 945. 100, 5. 981. 274. 5. 994. 624.
- 60 Alcamí y Smith, Cell., 71(1): 153-67, 1992.
Alcamí y col., Sem. Virol., 5: 419-427, 1998.
Alcamí y col., Virology, 74(23): 11230-9, 2000.
Almendro y col., J. Immunol., 157(12): 5411-5421, 1996.
Andoh y col., Cancer Immunol. Immunother., 50(12): 663-72, 2002.
Angel y col., Mol. Cell. Biol., 7: 2256, 1987.
Angel y col., Cell, 49: 729, 1987b.
Angel y col., Mol. Cell. Biol., 7: 2256, 1987a.
- 65 Arap y col., Cancer Res., 55(6): 1351-1354, 1995.
Atchison y Perry, Cell, 46: 253, 1986. Atchison y Perry, Cell, 48:121, 1987.

- Austin-Ward y Villaseca, *Rev. Med. Chil.*, 126(7): 838-45, 1998.
- Ausubel y *col.*, En: *Current Protocols in Molecular Biology*, John, Wiley & Sons, Inc, Nueva York, 1994.
- Bajorin y *col.*, *J. Clin. Oncol.*, 6(5): 786-92, 1988.
- Bakhshi y *col.*, *Cell.*, 41(3): 899-906, 1985.
- 5 Banerji y *col.*, *Cell.*, 27(2 Pt 1): 299-308, 1981.
- Banerji y *col.*, *Cell.*, 33(3): 729-740, 1983.
- Bellus, J. *Macromol. Sci. Pure Appl. Chem.*, A31(1): 1355-1376, 1994.
- Berkhout y *col.*, *Cell*, 59: 273-282, 1989.
- Blanar y *col.*, *EMBO J.*, 8: 1139, 1989.
- 10 Blasco y Moss, *J. Virology*, 66(7): 4170-4179, 1992.
- Blasco y *col.*, *J. Virology*, 67(6): 3319-3325, 1993.
- Bodine y Ley, *EMBO J.*, 6: 2997, 1987.
- Boshart y *col.*, *Cell*, 41: 521, 1985.
- Bosze y *col.*, *EMBO J.*, 5(7): 1615-1623, 1986.
- 15 Boyd y *col.*, *Cell.*, 79: 341-351, 1994.
- Braddock y *col.*, *Cell*, 58: 269, 1989.
- Braisted y Wells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93(12): 5688-5692, 1996.
- Brizel, *Semin. Radiat. Oncol.*, 8(4): 237-246, 1998.
- Bukowski y *col.*, *Clin. Cancer Res.*, 4(10): 2337-47, 1998.
- 20 Bulla y Siddiqui, *J. Virol.*, 62: 1437, 1986.
- Burton y Barbas, *Adv. Immunol.*, 57: 191-280, 1994.
- Caldas y *col.*, *Nat. Genet.*, 8(1): 27-32, 1994.
- Campbell y Villarreal, *Mol. Cell. Biol.*, 8: 1993, 1988.
- Campere y Tilghman, *Genes and Dev.* 3: 537, 1989.
- 25 Campo y *col.*, *Nature*, 303: 77, 1983.
- Caragine y *col.*, *Cancer Res.*, 62(4): 1110-5, 2002.
- Carbonelli y *col.*, *FEMS Microbiol. Lett.*, 177(1): 75-82, 1999.
- Celander y Haseltine, *J. Virology*, 61: 269, 1987.
- Celander y *col.*, *J. Virology*, 62: 1314, 1988.
- 30 Chandler y *col.*, *Cell*, 33: 489, 1983.
- Chandler y *col.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94(8): 3596-601, 1997.
- Chang y *col.*, *Mol. Cell. Biol.*, 9: 2153, 1989.
- Chatterjee y *col.*, *Proc Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 86: 9114, 1989.
- Chen y Okayama, *Mol. Cell Biol.*, 7(8): 2745-2752, 1987.
- 35 Cheng y *col.*, *Cancer Res.*, 54(21): 5547-5551, 1994.
- Choi y *col.*, *Cell*, 53: 519, 1988.
- Christodoulides y *col.*, *Microbiology*, 144(Pt 11): 3027-37, 1998.
- Cleary and Sklar, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (21): 7439-7443, 1985.
- Cleary y *col.*, *J. Exp. Med.*, 164(1): 315-320, 1986.
- 40 Cocea, *Biotechniques*, 23(5): 814-816, 1997.
- Cohen y *col.*, *J. Cell. Physiol.*, 5: 75, 1987.
- Colamonici y *col.*, *J. Biol. Chem.*, 270: 15974-15978, 1995.
- Cooley y *col.*, *Science*, 239(4844): 1121-1128, 1988.
- Costa y *col.*, *Mol. Cell. Biol.*, 8: 81, 1988.
- 45 Cripe y *col.*, *EMBO J.*, 6: 3745, 1987.
- Culotta y Hamer, *Mol. Cell. Biol.*, 9: 1376, 1989.
- Culver y *col.*, *Science*, 256(5063): 1550-1552, 1992.
- Cunningham y Wells, *Science*, 244(4908): 1081-1085, 1989
- Curran, *Semin. Radiat. Oncol.*, 8(4 Supl. 1): 2-4, 1998.
- 50 Dandolo y *col.*, *J. Virology*, 47: 55-64, 1983.
- Davidson y *col.*, *J. Immunother.*, 21(5): 389-98, 1998.
- De Villiers y *col.*, *Nature*, 312(5991): 242-246, 1984.
- Deschamps y *col.*, *Science*, 230: 1174-1177, 1985.
- Dillman, *Cancer Biother. Radiopharm.*, 14(1): 5-10, 1999.
- 55 Dobbstein y Shenk, *J. Virology*, 70: 6479-6485, 1996.
- Durrant y Spendlove, *Curr. Opin. Investig. Drugs*, 2(7): 959-66, 2001.
- Edbrooke y *col.*, *Mol. Cell. Biol.*, 9: 1908, 1989.
- Edlund y *col.*, *Science*, 230: 912-916, 1985.
- Eliopoulos y *col.*, *Oncogene*, 11(7): 1217-28, 1995.
- 60 el-Kareh y Secomb, *Crit. Rev. Biomed. Eng.*, 25(6): 503-571, 1997.
- Erlandsson, *Cancer Genet. Cytogenet.*, 104(1): 1-18, 1998.
- EP-A 0 320 308 y 0 329 822.
- Feng y Holland, *Nature*, 334: 6178, 1988.
- Firak y Subramanian, *Mol. Cell. Biol.*, 6: 3667, 1986.
- 65 Foecking y Hofstetter, *Gene*, 45(1): 101-105, 1986.
- Fraley y *col.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76: 3348-3352, 1979.

- Frohman, En: PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications, Academic Press, N.Y., 1990.
 Fujita *y col.*, Cell, 49: 357, 1987.
 Solicitud británica 2 202 328
 Número de acceso a Genbank NC_001559
- 5 Gertig *y col.*, Semin. Cancer Biol., 8(4): 285-98, 1998.
 Gilles *y col.*, Cell, 33: 717, 1983.
 Gloss *y col.*, EMBO J., 6: 3735, 1987.
 Gnant *y col.*, Cancer Res., 59(14): 3396-403, 1999.
 Godbout *y col.*, Mol. Cell. Biol., 8: 1169, 1988.
- 10 Goebel *y col.*, Virology, 179(1): 247-66 y 517-63, 1990.
 Goodbourn *y Maniatis*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85: 1447, 1988.
 Goodbourn *y col.*, Cell, 45: 601, 1986.
 Gopal, Mol. Cell Biol., 5: 1188-1190, 1985.
 Graham *y Van Der Eb*, Virology, 52: 456-467, 1973.
- 15 Graham *y col.*, Virology, 229(1): 12-24, 1997.
 Greene *y col.*, Immunology Today, 10: 272, 1989
 Gross *y col.*, Genes Dev., 13(15): 1899-911, 1999.
 Grosschedl *y Baltimore*, Cell, 41: 885, 1985.
 Hanibuchi *y col.*, Int. J. Cancer, 78(4): 480-5, 1998.
- 20 Harland *y Weintraub*, J. Cell Biol., 101: 1094-1099, 1985.
 Haslinger *y Karin*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 8572, 1985.
 Hauber *y Cullen*, J. Virology, 62: 673, 1988.
 Heise *y col.*, Cancer Gene Ther., 6(6): 499-504, 1999.
 Hellstrand *y col.*, Acta Oncol., 37(4): 347-353, 1998.
- 25 Hen *y col.*, Nature, 321: 249, 1986.
 Hensel *y col.*, Lymphokine Res., 8: 347, 1989.
 Hermiston, J. Clin. Invest., 105: 1169-1172, 2000.
 Herr *and Clarke*, Cell., 45: 461, 1986.
 Hilton *y col.*, J. Biol. Chem., 271(9): 4699-4708, 1996.
- 30 Hirochika *y col.*, J. Virology, 61 :2599, 1987.
 Hirsch *y col.*, Mol. Cell. Biol., 10: 1959, 1990.
 Ho *y col.*, Environ Health Perspect, 106(5): 1219-1228, 1998.
 Holbrook *y col.*, Virology, 157: 211, 1987.
 Homey *y col.*, Nature. Rev. Immunol., 2: 175-184, 2002.
- 35 Horlick *y Benfield*, Mol. Cell. Biol., 9: 2396, 1989.
 Huang *y col.*, Cell., 27: 245, 1981.
 Hug *y col.*, Mol. Cell. Biol., 8: 3065, 1988.
 Hui *y Hashimoto*, Infect. Immun., 66(11): 5329-36, 1998.
 Hussussian *y col.*, Nat. Genet., 8(1): 15-21, 1994.
- 40 Hwang *y col.*, Mol. Cell. Biol., 10: 585, 1990.
 Ikeda *y col.*, Nat. Med., 5(8): 881-7, 1999.
 Imagawa *y col.*, Cell, 51: 251, 1987.
 Imbra *y Karin*, Nature, 323: 555, 1986.
 Imler *y col.*, Mol. Cell. Biol, 7: 2558, 1987.
- 45 Imperiale *y Nevins*, Mol. Cell. Biol., 4: 875, 1984.
 Innis *y col.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85(24): 9436-9440, 1988.
 Inouye *e Inouye*, Nucleic Acids Res., 13: 3101-3109, 1985.
 Irie *y Morton*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83(22): 8694-8698, 1986.
 Irie *y col.*, Lancet., 1(8641): 786-787, 1989.
- 50 Isaacs *y col.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89(2): 628-32, 1992.
 Jakobovits *y col.*, Mol. Cell. Biol., 8: 2555, 1988.
 Jameel *y Siddiqui*, Mol. Cell. Biol., 6: 710, 1986.
 Jaynes *y col.*, Mol. Cell. Biol., 8: 62, 1988.
 Johnson *y Hamdy*, Oncol. Rep., 5(3): 553-7, 1998.
- 55 Johnson *y col.*, Mol. Cell. Biol., 9: 3393, 1989.
 Ju *y col.*, J. Neuropathol. Exp. Neurol., 59(3): 241-50, 2000.
 Kadesch *y Berg*, Mol. Cell. Biol., 6: 2593, 1986.
 Kaeppler *y col.*, Plant Cell Reports, 9: 415-418, 1990.
 Kamb *y col.*, Nat.Genet., 8(1): 23-2, 1994.
- 60 Kaneda *y col.*, Science, 243: 375-378, 1989.
 Karin *y col.*, Mol. Cell. Biol., 7: 606, 1987.
 Karin *y col.*, Mol. Cell. Biol., 7: 606, 1987.
 Katinka *y col.*, Cell, 20: 393, 1980.
- 65 Kato *y col.*, J. Biol. Chem., 266: 3361-3364, 1991.
 Kawamoto *y col.*, Mol. Cell. Biol., 8: 267, 1988.
 Kay *y col.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94(9): 4686-91, 1997.

- Kerr *y col.*, Br. J. Cancer, 26(4): 239-257, 1972.
 Kettle *y col.*, J. Gen. Virology, 78: 677-685, 1997.
 Kiledjian *y col.*, Mol. Cell. Biol., 8: 145, 1988.
 5 Kirn *y col.*, Nat. Med., 7(7): 781-787, 2001.
 Klamut *y col.*, Mol. Cell. Biol., 10: 193, 1990.
 Koch *y col.*, Mol. Cell. Biol., 9: 303, 1989.
 Kolmel, J. Neurooncol., 38(2-3): 121-5, 1998.
 Koncz *y col.*, EMBO J., 9(5): 1337-1346, 1990.
 Kraus *y col.*, FEBS Lett., 428(3): 165-170, 1998.
 10 Kriegler *y Botchan*, en: Eukaryotic Viral Vectors, Gluzman (ed), Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory, NY, 1982.
 Kriegler *y Botchan*, Mol. Cell. Biol., 3: 325, 1983.
 Kriegler *y col.*, Cell, 38: 483, 1984.
 Kriegler *y col.*, Cell, 53: 45, 1988.
 15 Kuhl *y col.*, Cell, 50: 1057, 1987.
 Kunz *y col.*, Nucl. Acids Res., 17: 1121, 1989.
 Kwoh *y col.*, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 86: 1173, 1989.
 Kyte *y Doolittle*, J. Mol. Biol., 57(1): 105-32, 1982.
 Lareyre *y col.*, J. Biol. Chem., 274(12): 8282-8290, 1999.
 20 Larsen *y col.*, Proc Natl. Acad. Sci. USA., 83: 8283, 1986.
 Laspia *y col.*, Cell, 59: 283, 1989.
 Latimer *y col.*, Mol. Cell. Biol., 10: 760, 1990.
 Lee *y col.*, DNA Cell. Biol., 16(11): 1267-75, 1997.
 Lee *y col.*, Nature, 294:228, 1981.
 25 Lee *y col.*, Nucleic Acids Res., 12: 4191-206, 1984.
 Levenson *y col.*, Hum Gene Ther. 20; 9(8): 1233-1236, 1998.
 Levinson *y col.*, Nature, 295: 79, 1982.
 Liebermann, Oncogene, 17(10): 1189-94, 1998.
 Lin *y col.*, Mol. Cell. Biol., 10: 850, 1990.
 30 Luria *y col.*, EMBO J., 6: 3307, 1987.
 Lusky *y Botchan*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83: 3609, 1986.
 Lusky *y col.*, Mol. Cell. Biol. 3: 1108, 1983.
 Macejak *y Sarnow*, Nature, 353: 90-94, 1991.
 Magi-Galluzzi *y col.*, Anal. Quant. Cytol. Histol, 20(5): 343-50, 1998.
 35 Majors *y Varmus*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80: 5866, 1983.
 Mangray and King, Front Biosci., 3: D 1148-60, 1998.
 Marks *y col.*, Symp. Soc. Exp. Biol., 45: 77-87, 1991.
 Marsters *y col.*, Recent Prog Horm Res, 54: 225-234, 1999.
 Mayer *y col.*, Radiat. Oncol. Investig., 6(6): 281-288, 1998.
 40 McCart *y col.*, Gene Ther., 7(14): 1217-23, 2000.
 McNeill *y col.*, Gene, 76: 81, 1989.
 Miksicek *y col.*, Cell, 46: 203, 1986.
 Mitchell *y col.*, Ann. NY Acad. Sci., 690: 153-166, 1993.
 Mitchell *y col.*, J. Clin. Oncol., 8(5): 856-869, 1990.
 45 Mordacq *y Linzer*, Genes and Dev., 3: 760, 1989.
 Moreau *y col.*, Nucl. Acids Res., 9: 6047, 1981.
 Mori *y col.*, Cancer Res., 54(13): 3396-3397, 1994.
 Morton *y col.*, Arch. Surg., 127: 392-399, 1992.
 Moss, En: Fields Virology, Fields (ed.), Lippincott-Raven Publ, Phila., 3: 3637, 2672, 1996.
 50 Moss, En: Fields Virology, Fields (ed.), Lippincott-Raven Publ, Phila., 3: 3637-2672, 1996.
 Mossman *y col.*, Virology, 215(1): 17-30, 1996.
 Mougín *y col.*, Ann. Biol. Clin., (Paris) 56(1): 21-8, 1998.
 Muesing *y col.*, Cell, 48: 691, 1987.
 Mumby *y Walter*, Cell Regul., 2(8): 589-98, 1991.
 55 Natoli *y col.*, Biochem. Pharmacol., 56(8): 915-20, 1998.
 Ng *y col.*, Nuc. Acids Res., 17: 601, 1989.
 Nicolau *y Sene*, Biochim. Biophys. Acta, 721: 185-190, 1982.
 Nicolau *y col.*, Methods Enzymol., 149: 157-176, 1987.
 Nielsen *y col.*, Cancer Gene Therapy, 4(6): S12, 1997.
 60 Nielsen *y col.*, Clin. Cancer Res., 4(4): 835-846, 1998.
 Nobori *y col.*, Nature, 368(6473): 753-6, 1994.
 Nomoto *y col.*, Gene, 236(2): 259-71, 1999.
 Ochi *y col.*, Am. J. Gastroenterol., 93(8): 1366-8, 1998.
 Ochi *y col.*, Am. J. Gastroenterol., 93(8): 1366-1368, 1998.
 65 Ohara *y col.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86: 5673-5677, 1989.
 Ohara, Gan To Kagaku Ryoho, 25(6): 823-8, 1998.

- Okamoto *y col.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1(23): 11045-11049, 1994.
 Omirulleh *y col.*, Plant Mol. Biol., 21(3): 415-428, 1993.
 Ondek *y col.*, EMBO J., 6: 1017, 1987.
 5 Orlow *y col.*, Cancer Res., 54(11): 2848-2851, 1994.
 Ornitz *y col.*, Mol. Cell. Biol., 7: 3466, 1987.
 Palmiter *y col.*, Nature, 300: 611, 1982.
 Solicitudes PCT PCT/US87/00880, PCT/US89/01025, WO 88/10315, WO 89/06700, WO 90/07641, WO 94/09699, y WO 95/06128.
 Pech *y col.*, Mol. Cell. Biol., 9: 396, 1989.
 10 Pelletier y Sonenberg, Nature, 334(6180): 320-325, 1988.
 Perez-Stable y Constantini, Mol. Cell. Biol., 10: 1116, 1990.
 Picard y Schaffner, Nature, 307: 83, 1984.
 Pietras *y col.*, Oncogene, 17(17): 2235-49, 1998.
 Pietras *y col.*, Oncogene, 17(17): 2235-49, 1998.
 15 Pinkert *y col.*, Genes and Dev., 1: 268, 1987.
 Ponta *y col.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 1020, 1985.
 Porton *y col.*, Mol. Cell. Biol., 10: 1076, 1990.
 Potrykus *y col.*, Mol. Gen. Genet., 199: 183-188, 1985.
 Puhlmann, *y col.*, Cancer Gene Ther., 7(1): 66-73, 2000.
 20 Qin *y col.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95(24): 14411-14416, 1998.
 Queen y Baltimore, Cell, 35: 741, 1983.
 Quinn *y col.*, Mol. Cell. Biol., 9: 4713, 1989.
 Ravindranath y Morton, Intern. Rev. Immunol., 7: 303-329, 1991.
 Redondo *y col.*, Science, 247: 1225, 1990.
 25 Reisman y Rotter, Mol. Cell. Biol., 9: 3571, 1989.
 Remington's Pharmaceutical Sciences" 15ª Edición, págs. 1035-1038 y 1570-1580
 Resendez Jr. *y col.*, Mol. Cell. Biol., 8: 4579, 1988.
 Ripe *y col.*, Mol. Cell. Biol., 9: 2224, 1989.
 Rippe *y col.*, Mol. Cell. Biol., 10: 689-695, 1990.
 30 Rittling *y col.*, Nuc. Acids Res., 17: 1619, 1989.
 Rosel *y col.*, J. Virology, 60(2): 436-449, 1986.
 Rosen *y col.*, Cell, 41: 813, 1988.
 Rosenberg *y col.*, Ann. Surg. 210(4): 474-548, 1989.
 Rosenberg *y col.*, N. Engl. J. Med., 319: 1676, 1988.
 35 Sakai *y col.*, Genes and Dev., 2: 1144, 1988.
 Sambrook *y col.*, En Molecular Cloning: A Laboratory Manual, segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989.
 Saraiva y Alcami, J. Virology, 75(1): 226-33, 2001.
 Satake *y col.*, J. Virology, 62: 970, 1988.
 40 Schaffner *y col.*, J. Mol. Biol., 201: 81, 1988.
 Searle *y col.*, Mol. Cell. Biol., 5: 1480, 1985.
 Seet *y col.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 98(16): 9008-13, 2001.
 Serrano *y col.*, Nature, 366: 704-707, 1993.
 Serrano *y col.*, Science, 267(5195): 249-252, 1995.
 45 Sharp y Marciniak, Cell, 59: 229, 1989.
 Shaul y Ben-Levy, EMBO J., 6: 1913, 1987.
 Sherman *y col.*, Mol. Cell. Biol., 9: 50, 1989.
 Sinkovics y Horvath, J. Clin. Viro., 16: 1-15, 2000.
 Sleigh y Lockett, J. EMBO, 4: 3831, 1985.
 50 Smith y Vanderplasschen, Adv. Exp. Med. Biol., 440: 395-414, 1998.
 Smith *y col.*, Immunol. Rev., 159: 137-154, 1997.
 Solyanik *y col.*, Cell. Prolif., 28(5): 263-78, 1995.
 Sommer *y col.* EMBO J., 9(3): 605-613, 1990.
 Spalholz *y col.*, Cell, 42: 183, 1985.
 55 Spandau y Lee, J. Virology, 62: 427, 1988.
 Spandidos y Wilkie, EMBO J., 2: 1193, 1983.
 Spriggs *y col.*, Cell, 71(1): 145-52, 1992.
 Stephens y Hentschel, Biochem. J., 248: 1, 1987.
 Stokke *y col.*, Cell. Prolif., 30(5): 197-218, 1997.
 60 Stuart *y col.*, Nature, 317: 828, 1985.
 Sullivan y Peterlin, Mol. Cell. Biol., 7: 3315, 1987.
 Swartzendruber y Lehman, J. Cell. Physiology, 85: 179, 1975.
 Symons *y col.*, Cell, 81: 551-560, 1995.
 Takebe *y col.*, Mol. Cell. Biol., 8: 466, 1988.
 65 Tavernier *y col.*, Nature, 301: 634, 1983.
 Taylor y Kingston, Mol. Cell. Biol., 10: 165, 1990a.

- Taylor y Kingston, *Mol. Cell. Biol.*, 10: 176, 1990b.
 Taylor y *col.*, *J. Biol. Chem.*, 264: 15160, 1989.
 Thiesen y *col.*, *J. Virology*, 62: 614, 1988.
 5 Todo y *col.*, *Cancer Res.*, 61: 153-161, 2001.
 Treisman, *Cell*, 42:889, 1985.
 Tronche y *col.*, *Mol. Biol. Med.*, 7: 173, 1990.
 Trudel y Constantini, *Genes y Dev.* 6: 954, 1987.
 Tsujimoto y Croce, y *col.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83(14): 5214-5218, 1986.
 Tsujimoto y *col.*, *Science*, 228(4706): 1440-1443, 1985.
 10 Tsumaki y *col.*, *J. Biol. Chem.*, 273(36): 22861-4, 1998.
 Tyndell y *col.*, *Nuc. Acids. Res.*, 9: 6231, 1981.
 Upton y *col.*, *Virology*, 184(1): 370-82, 1991.
 Vanderplasschen y *col.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95(13): 7544-9, 1998.
 Vannice y Levinson, *J. Virology*, 62: 1305, 1988.
 15 Vasseur y *col.*, *Proc Natl. Acad. Sci. USA.*, 77: 1068, 1980.
 Vicari y Caus, *Cytokine Growth Factor Rev.*, 13: 143-154, 2002.
 Vogelstein y Kinzler, *Cell*, 70(4): 523-6, 1992.
 Walker y *col.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 392-396 1992.
 Wallach y *col.*, en: *The cytokine network and immune functions*,
 20 Theze (ed.), Oxford Univ. Press, Oxford, UK, 51-84, 1999.
 Wang y Calame, *Cell*, 47: 241, 1986.
 Warren y *col.*, *Biochemistry*, 35(27): 8855-8862, 1996.
 Weber y *col.*, *Cell*, 36: 983, 1984.
 Weinberger y *col.* *Mol. Cell. Biol.*, 8: 988, 1984.
 25 Winoto y Baltimore, *Cell* 59: 649, 1989.
 Wold y *col.*, *Trends Microbiol.*, 2: 437-443, 1994.
 Wong y *col.*, *Gene*, 10: 87-94, 1980.
 Wu y Wu, *J. Biol. Chem.*, 262: 4429-4432, 1987.
 Yelton y *col.*, *J. Immunol.*, 155(4): 1994-2004, 1995.
 30 Yutzey y *col.* *Mol. Cell. Biol.*, 9: 1397, 1989.
 Zeng y *col.*, *Biochemistry*, 35(40): 13157-13164; 1996.
 Zhao-Emonet y *col.*, *Biochim. Biophys. Acta*, 1442(2-3): 109-119, 1998.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Virus vaccinia que comprende una mutación conservativa o no conservativa en el gen A34R, mutación que da como resultado una sustitución K151X (representando X cualquier aminoácido presente en la naturaleza) en el polipéptido A34R codificado y en un aumento en la producción de la forma infecciosa EEV del virus, para su uso en un método de tratamiento del cáncer.
2. El virus vaccinia para el uso de la reivindicación 1, donde el cáncer es un cáncer residual microscópico.
- 10 3. El virus vaccinia para el uso de la reivindicación 1, donde la mutación en el gen A34R da como resultado una sustitución K151D (representando D ácido aspártico).
4. El virus vaccinia para el uso de la reivindicación 1 o 3, donde el virus vaccinia es una cepa Copenhagen o Western Reserve.
- 15 5. El virus vaccinia para el uso de la reivindicación 1, donde el virus vaccinia está atenuado.
6. El virus vaccinia para el uso de la reivindicación 5, donde el virus vaccinia comprende una mutación inactivante en un gen B8R o en un gen B18R.
- 20 7. El virus vaccinia para el uso de la reivindicación 5, donde el virus vaccinia atenuado comprende además una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido terapéutico heterólogo.
8. El virus vaccinia para el uso de la reivindicación 7, donde el polipéptido terapéutico heterólogo es un supresor, inmunomodulador, inhibidor de la angiogénesis, polipéptido antivascular, polipéptido citotóxico, inductor de la apoptosis, enzima activador de profármaco o polipéptido citostático.
- 25 9. El virus vaccinia para el uso de la reivindicación 1, donde el tratamiento se realiza mediante administración intratumoral o intravenosa.
- 30 10. El virus vaccinia para el uso de la reivindicación 9, donde el tratamiento es mediante administración en el interior de un tumor sólido.
11. El virus vaccinia para el uso de la reivindicación 1, donde el cáncer es un cáncer de vejiga, de la sangre, de hueso, de médula ósea, de cerebro, de mama, colorrectal, de esófago, gastrointestinal, de cabeza, de riñón, de hígado, de pulmón, nasofaríngeo, de cuello, de ovario, de páncreas, de próstata, de piel, de estómago, de testículo, de lengua o de útero.
- 35 12. Uso de un virus vaccinia que comprende una mutación conservativa o no conservativa en el gen A34R, mutación que da como resultado una sustitución K151X (representando X cualquier aminoácido presente en la naturaleza) y un aumento en la forma infecciosa EEV del virus, para la preparación de un medicamento para el tratamiento del cáncer.
- 40

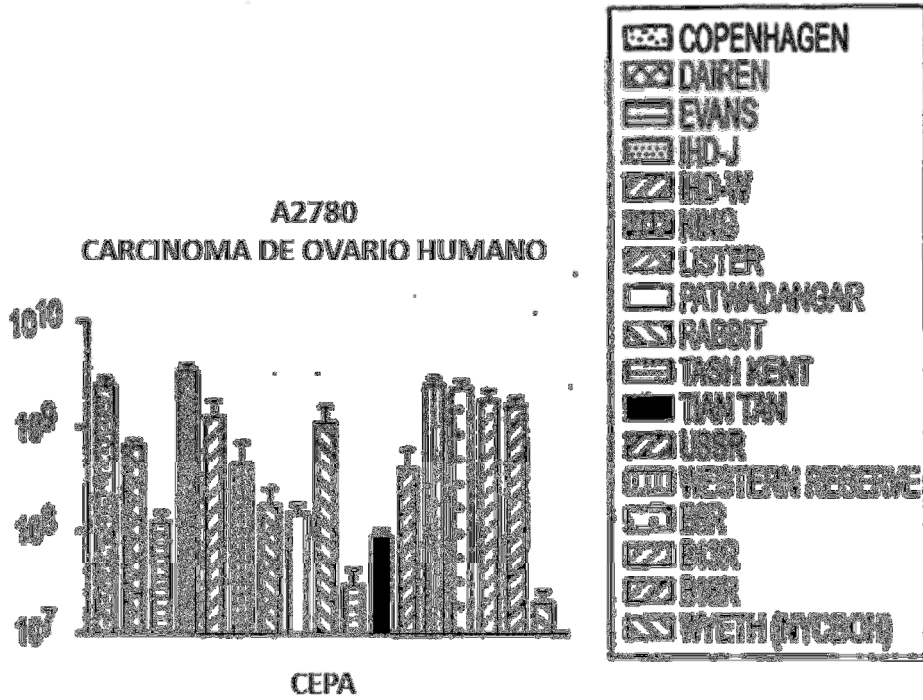


FIG. 1A

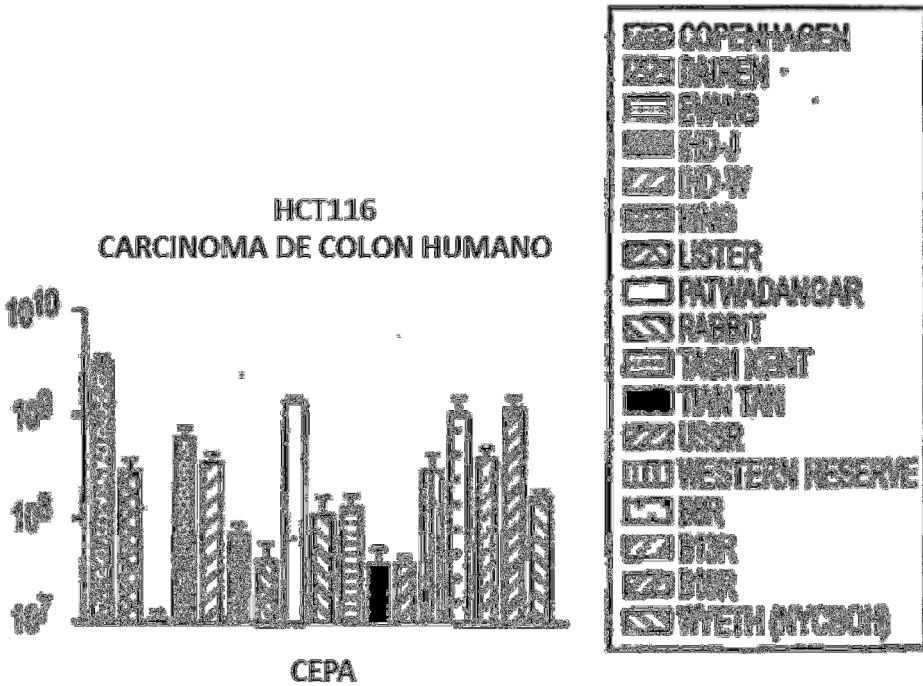


FIG. 1B

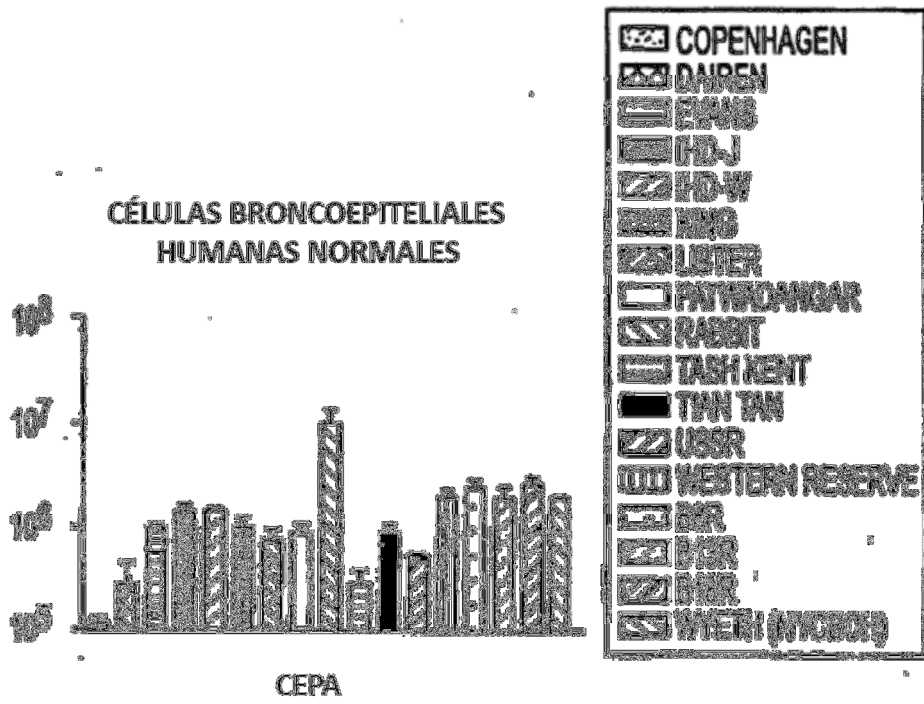


FIG. 2

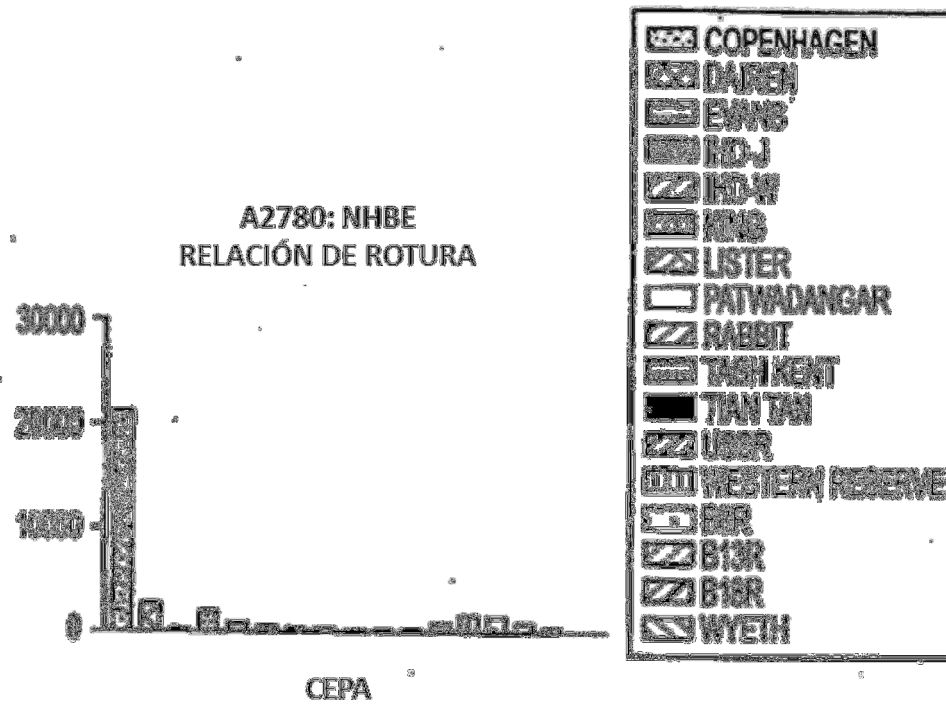


FIG. 3

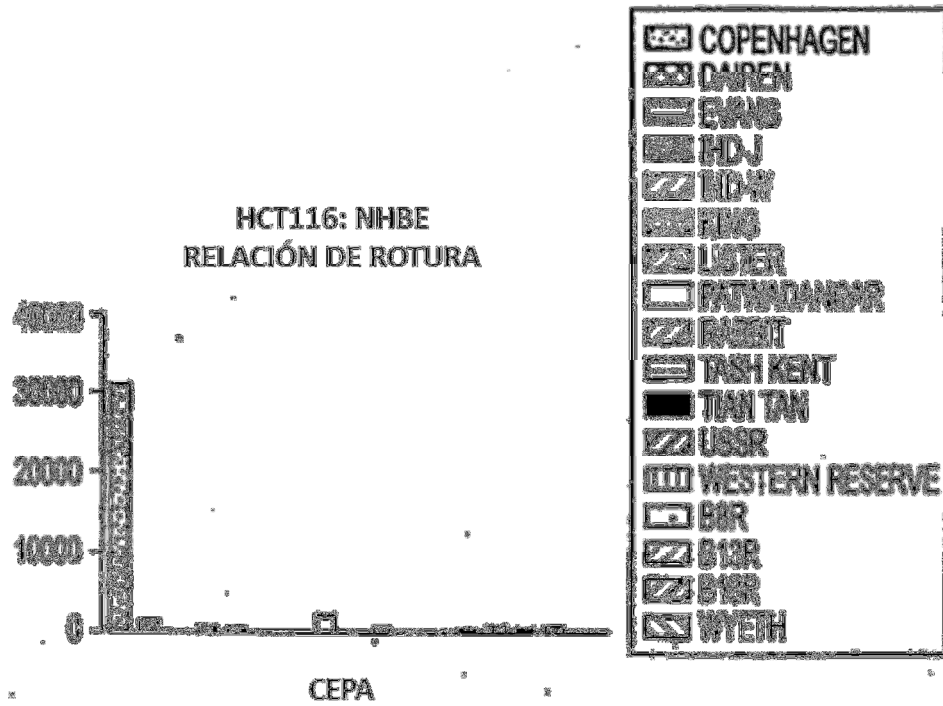


FIG. 4

LNCaP
CARCINOMA DE PRÓSTATA HUMANO

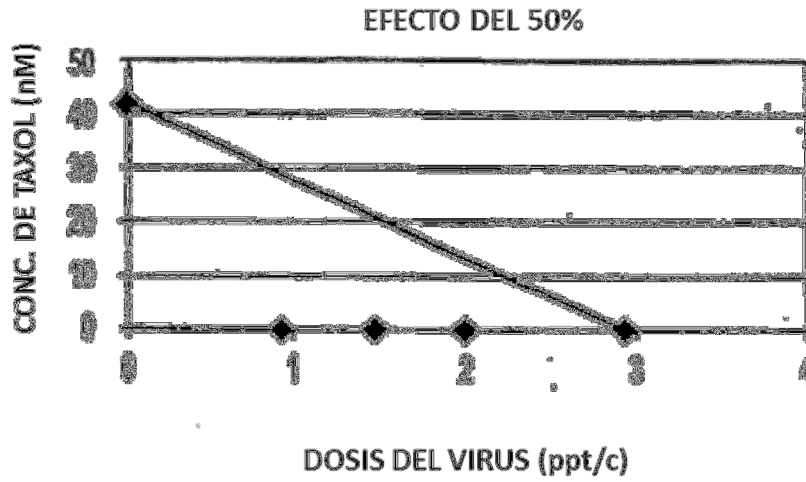


FIG. 5A

HCT116
CARCINOMA DE COLON HUMANO

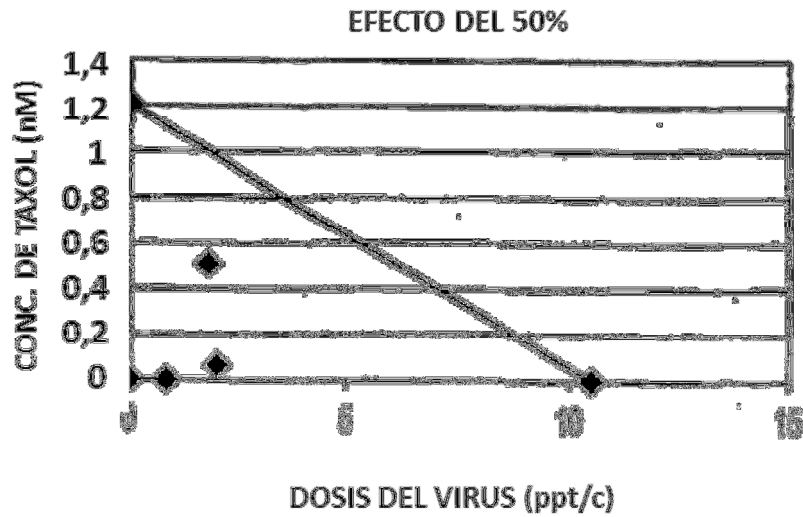


FIG. 5B

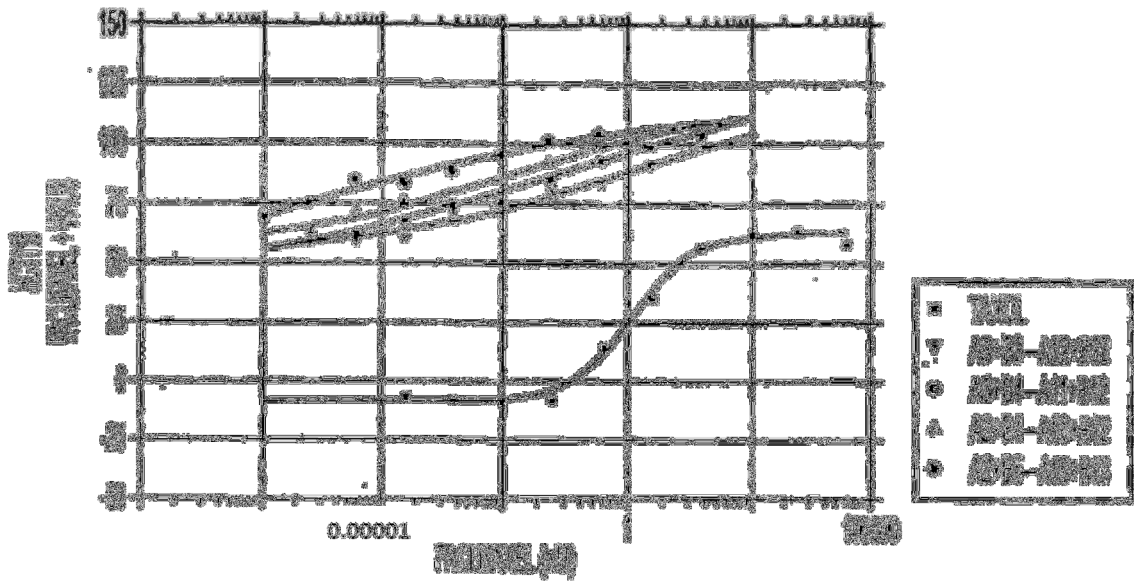


FIG. 6A

DOSIS	TAXOL			A3+B3-A12+B12			A3+B4-A11+B12			A2+B4-A10+B12			A2+B5-A10+B13		
	Y1	Y2	Y3	Y1	Y2	Y3	Y1	Y2	Y3	Y1	Y2	Y3	Y1	Y2	Y3
30000.0	58.10	57.23	54.26												
3000.0	62.71	61.94	63.96												
300.0	64.65	62.23	57.90	102.18	102.62	102.87									
30.0	58.74	52.84	53.33	99.64	98.81	98.14	103.47	101.59	103.33	104.91	103.57	105.02			
3.0	41.57	31.58	27.36	90.31	91.36	90.39	99.20	98.15	98.71	104.01	102.91	104.61	103.17	102.72	103.58
0.3	18.63	13.91	6.47	84.06	82.50	82.03	92.25	91.59	91.47	99.35	97.96	99.53	104.31	101.87	103.74
3.0e-02	-9.12	-7.21	-12.01	80.48	78.11	78.74	85.84	84.33	81.36	92.15	89.85	92.19	101.68	99.18	101.53
3.0e-03	-9.12	-8.91	-15.71	68.62	70.19	70.78	75.82	77.69	73.97	85.55	83.72	84.54	95.13	93.86	93.88
3.0e-04	-9.32	-5.14	-13.19	73.24	68.31	71.55	75.87	75.61	75.66	77.31	75.28	73.09	88.43	86.93	86.95
3.0e-05	-10.46	-7.68	-4.31	57.15	62.41	58.16	65.94	66.89	67.14	74.43	76.74	76.64	83.31	80.47	82.59
3.0e-06				52.98	58.22	61.70	61.87	62.18	56.46	71.45	68.59	70.99	83.11	83.25	83.62
3.0e-07				54.02	57.61	61.39	54.22	59.54	60.21	63.70	61.94	59.34	72.19	76.04	72.89
3.0e-08													65.74	66.66	70.99

FIG. 6B

	TAXOL	A3+B3-A12+B12	A3+B4-A11+B12	A2+B4-A10+B12	A2+B5-A10+B13
ECUACIÓN 1					
VALORES DE MEJOR AJUSTE					
INFERIOR	-10.33	50.03	40.11	54.13	36.77
SUPERIOR	60.85	121.9	133.3	115.1	115.8
LOG CE50	0.08336	-0.2865	-1.226	-2.631	-6.082
PENDIENTE	0.7812	0.1629	0.1211	0.1852	0.1208
CE50	1.212	0.5170	0.05942	0.002340	8.2790e-07
BONDAD DEL AJUSTE					
GRADOS DE LIBERTAD	26	26	23	23	23
R CUADRADO	0.9804	0.9696	0.9789	0.9724	0.9617
SUMA ABSOLUTA DE CUADRADOS	571.9	231.9	135.0	159.1	155.0
Syx	4.690	2.986	2.423	2.630	2.596

FIG. 6C

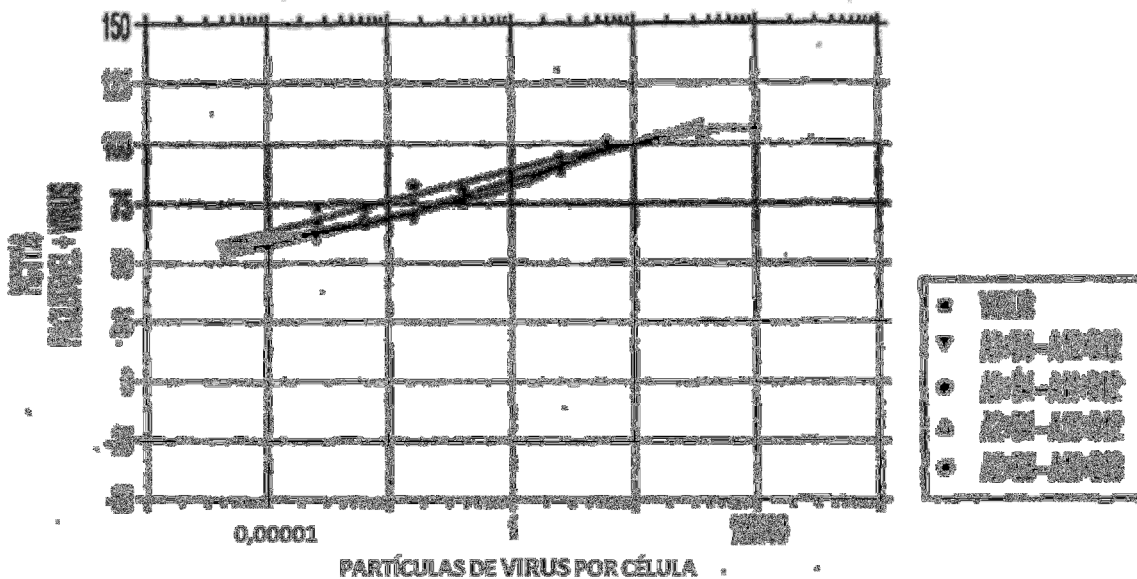


FIG. 7A

DOSIS DE VIRUS (ppc)	VIRUS			A3+B3-A12+B12			A3+B4-A11+B12			A2+B4-A10+B12			A2+B5-A10+B13		
	Y1	Y2	Y3	Y1	Y2	Y3	Y1	Y2	Y3	Y1	Y2	Y3	Y1	Y2	Y3
100000,0	105,40	105,41	107,43							104,91	103,57	105,02	103,17	102,72	103,58
10000,0	104,91	104,51	106,72							104,01	102,91	104,61	104,31	101,87	103,74
1000,0	104,71	103,24	105,48	102,18	102,62	102,87	103,47	101,59	103,33	104,01	102,91	104,61	104,31	101,87	103,74
100,0	99,10	98,71	98,61	99,64	98,81	98,14	99,20	98,15	98,71	99,35	97,96	99,53	101,68	99,18	101,53
10,0	88,97	89,52	88,54	90,31	91,26	90,39	92,25	91,59	91,47	92,15	89,85	92,19	95,13	93,86	93,88
1,0	83,61	83,06	83,51	84,06	82,50	82,03	85,84	84,33	81,36	85,55	83,72	84,54	88,43	86,93	86,95
0,1	76,95	75,90	73,45	80,48	78,11	78,74	75,82	77,69	73,97	77,31	75,28	73,09	83,31	80,47	82,59
1,0e-02	74,82	77,92	74,99	68,62	70,19	70,78	75,87	75,61	75,66	74,43	76,74	76,64	83,11	83,25	83,62
1,0e-03	72,89	75,57	74,27	73,24	68,31	71,55	65,94	66,89	67,14	71,45	68,59	70,99	72,19	76,04	72,89
1,0e-04	71,50	75,47	73,92	57,15	62,41	58,16	61,87	62,18	56,46	63,70	61,94	59,34	65,74	66,66	70,99
1,0e-05				52,98	53,22	61,70	54,22	59,54	60,21						
1,0e-06				54,02	57,61	61,39									

FIG. 7B

	VIRUS	A3+B3-A12+B12	A3+B4-A11+B12	A2+B4-A10+B12	A2+B5-A10+B13
ECUACIÓN 1					
VALORES DE MEJOR AJUSTE					
INFERIOR	73,90	50,03	40,11	54,17	36,75
SUPERIOR	106,7	121,9	133,3	115,1	115,8
LOG CE50	1,016	0,2364	0,2968	-0,1062	-2,561
PENDIENTE	0,4936	0,1629	0,1211	0,1855	0,1208
CE50	10,37	1,723	1,981	0,7830	0,002751
BONDAD DEL AJUSTE					
GRADOS DE LIBERTAD	26	26	23	23	23
R CUADRADO	0,9890	0,9696	0,9789	0,9724	0,9617
SUMA ABSOLUTA DE CUADRADOS	57,66	231,9	135,0	159,1	155,0
Syx	1,489	2,986	2,423	2,630	2,596

FIG. 7C

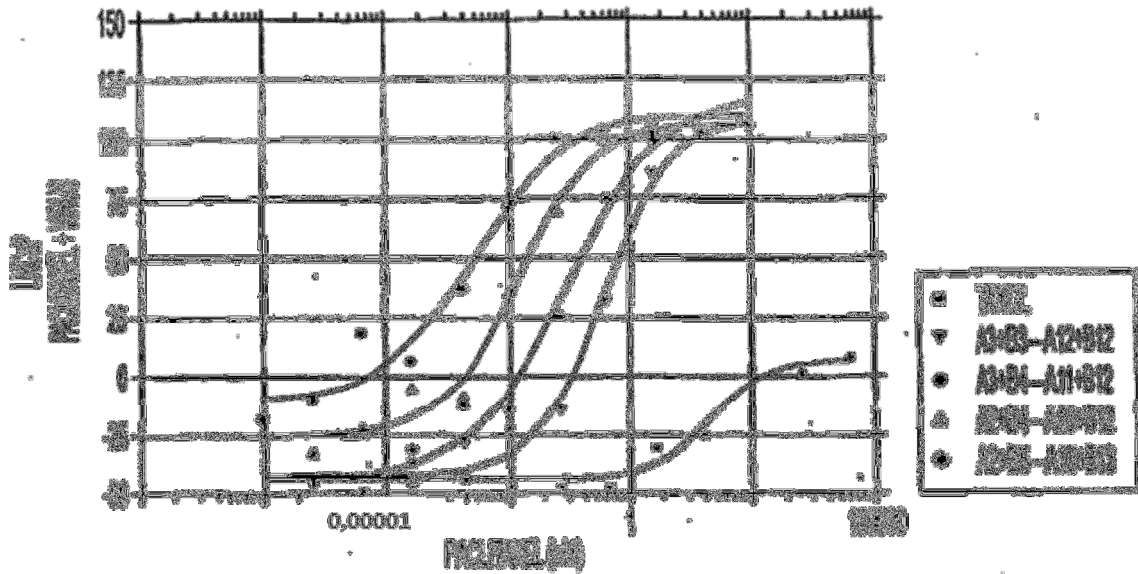


FIG. 8A

DOSIS	TAXOL			A3+B3-A12+B12			A3+B4-A11+B12			A2+B4-A10+B12			A2+B5-A10+B13			
	Y1	Y2	Y3	Y1	Y2	Y3	Y1	Y2	Y3	Y1	Y2	Y3	Y1	Y2	Y3	
30000,0	26,83	1,16	1,47													
3000,0	12,11	-2,63	-6,45													
300,0	10,92	-3,56	5,34	101,81	106,39	106,09										
30,0	-18,32	-30,20	-28,01	96,24	105,54	104,85	102,21	105,85	108,55	99,76	106,54	107,67				
3,0	-32,24	-34,53	-22,47	89,28	89,43	80,39	95,51	101,59	103,09	98,10	106,00	107,49	102,67	105,07	108,81	
0,3	-44,71	-43,90	-48,95	39,76	34,15	24,70	76,42	83,00	67,37	94,59	104,45	101,51	101,35	105,23	106,79	
3,0e-02	-33,17	-53,12	-52,30	3,16	-23,54	-18,42	37,10	35,00	5,69	76,95	74,64	60,24	92,20	103,99	105,56	
3,0e-03	-35,69	-50,33	-52,82	-17,99	-22,30	-25,72	-6,32	-11,15	-19,74	46,45	34,07	31,12	72,91	72,24	73,00	
3,0e-04	-33,57	-45,61	-48,78	-25,55	-25,40	-32,59	-11,96	-8,75	-12,35	11,71	-23,54	-12,88	41,35	44,06	28,30	
3,0e-05	-28,86	-45,61	-31,79	-44,51	-47,93	-45,17	-27,07	-34,69	-28,98	-1,55	-4,03	-6,72	14,03	1,39	6,92	
3,0e-06				-44,31	-47,62	-56,34	-47,76	-48,47	-53,88	-20,11	-26,95	-18,16	26,70	16,88	14,93	
3,0e-07				-28,86	-48,47	-52,56	-35,43	-46,07	-52,21	-31,05	-23,38	-40,42		-5,86	-5,42	-14,37
3,0e-08													-16,80	-18,04	-17,36	

FIG. 8B

	TAXOL	A3+B3-A12+B12	A3+B4-A11+B12	A2+B4-A10+B12	A2+B5-A10+B13
ECUACIÓN 1					
VALORES DE MEJOR AJUSTE					
INFERIOR	-42,74	-41,46	-43,08	-24,95	-9,544
SUPERIOR	8,087	110,7	119,2	107,9	111,3
LOG CE50	1,618	-0,5616	-1,359	-2,352	-3,224
PENDIENTE	0,7578	0,5825	0,4296	0,5454	0,4660
CE50	41,48	0,2744	0,04376	0,004447	0,0005973
BONDAD DEL AJUSTE					
GRADOS DE LIBERTAD	26	26	23	23	23
R CUADRADO	0,8472	0,9796	0,9712	0,9716	0,9628
SUMA ABSOLUTA DE CUADRADOS	2320	2242	2662	2253	2241
Syx	9,447	9,286	10,76	9,898	9,871

FIG. 8C

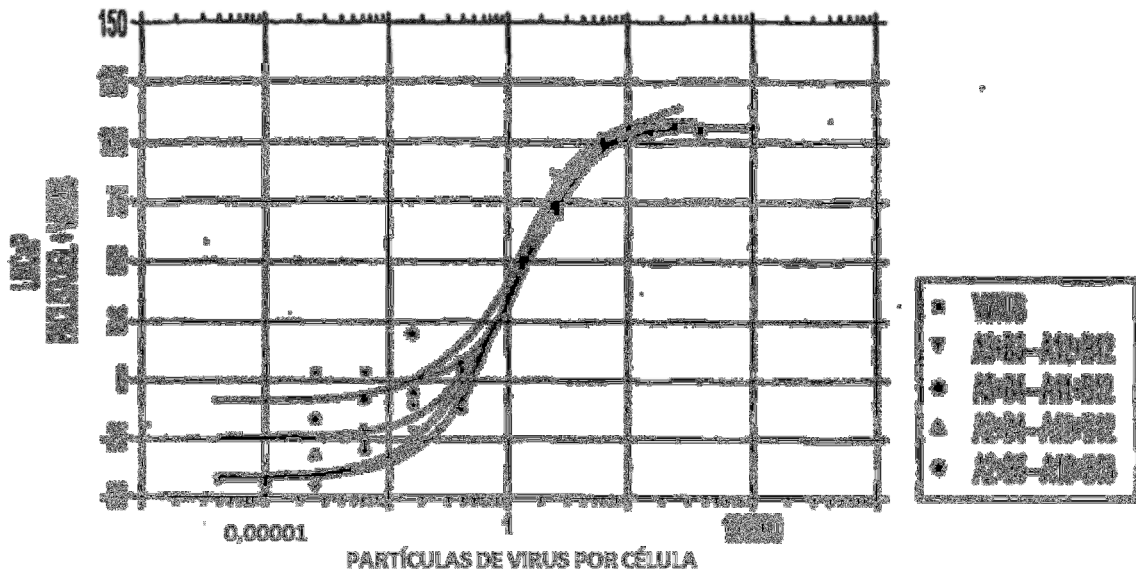


FIG. 9A

DOSIS DE VIRUS (ppc)	VIRUS			A3+B3-A12+B12			A3+B4-A11+B12			A2+B4-A10+B12			A2+B5-A10+B13			
	Y1	Y2	Y3	Y1	Y2	Y3	Y1	Y2	Y3	Y1	Y2	Y3	Y1	Y2	Y3	
100000.0	102.94	108.63	110.84													
10000.0	99.03	108.71	110.40													
1000.0	98.70	108.17	109.52	101.81	106.39	106.09	102.21	105.85	108.55	99.76	106.54	107.67	102.67	105.07	108.81	
100.0	97.30	103.52	95.44	96.24	105.54	104.85	95.51	101.59	103.09	94.59	104.45	101.51	92.20	103.99	105.56	
10.0	81.46	79.60	63.50	89.28	89.43	80.39	76.42	83.00	67.37	76.95	74.64	60.24	72.91	72.24	73.00	
1.0	49.04	30.43	26.81	39.76	34.15	24.70	37.10	35.00	5.69	46.45	34.07	31.12	41.35	44.06	28.30	
0.1	7.07	13.24	-8.65	3.16	-23.54	-18.42	-6.32	-11.15	-19.74	11.71	-23.54	-12.88	14.03	1.39	6.92	
1.0e-02	1.97	4.41	-22.64	-17.99	-22.30	-25.72	-11.96	-8.75	-12.35	-1.55	-4.03	-6.72	26.70	16.88	14.93	
1.0e-03	6.14	10.61	-5.84	-25.55	-25.40	-32.59	-27.07	-34.69	-28.98	-20.11	-26.95	-18.16	-5.86	-5.42	-14.37	
1.0e-04	12.24	-4.49	2.26	-44.51	-47.93	-45.17	-47.76	-48.47	-53.88	-31.05	-23.38	-40.42	-16.80	-18.04	-17.36	
1.0e-05				-44.31	-47.62	-56.34	-35.43	-46.07	-52.21							
1.0e-06				-28.66	-48.47	-52.56										

FIG. 9B

	VIRUS	A3+B3-A12+B12	A3+B4-A11+B12	A2+B4-A10+B12	A2+B5-A10+B13
ECUACION 1					
VALORES DE MEJOR AJUSTE					
INFERIOR	-0.5588	-41.46	-43.08	-24.96	-9.572
SUPERIOR	106.5	110.7	119.2	107.9	111.3
LOG CE50	0.4635	-0.03873	0.1640	0.1709	0.2986
PENDIENTE	0.7543	0.5825	0.4296	0.5453	0.4654
CE50	2.907	0.9147	1.459	1.482	1.989
BONDAD DEL AJUSTE					
GRADOS DE LIBERTAD	26	26	23	23	23
SUMA ABSOLUTA DE CUADRADOS	0.9712	0.9796	0.9712	0.9716	0.9628
Syx	1964	2242	2662	2253	2241
	8.691	9.286	10.76	9.898	9.871

FIG. 9C

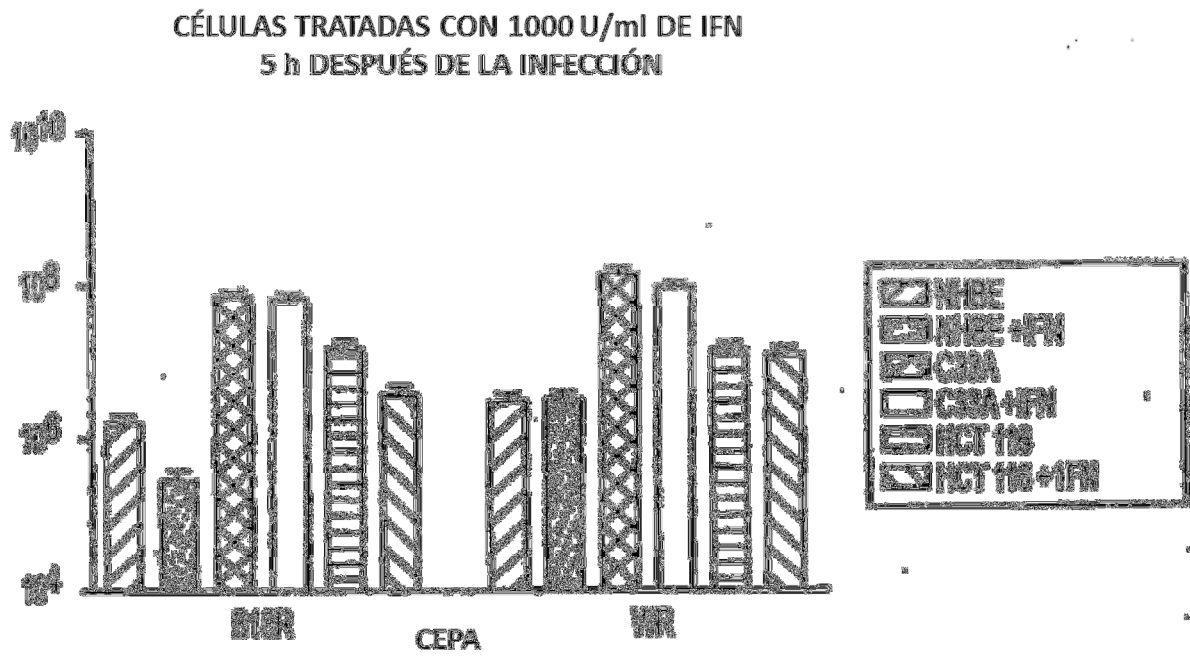


FIG. 10