(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 539 941**

(51) Int. CI.:

A61K 39/245 (2006.01)
C07K 14/035 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.05.2002 E 10000308 (6)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.03.2015 EP 2213300**

(54) Título: **Composición y método para tratar el cáncer usando herpes virus**

(30) Prioridad:

09.05.2001 JP 2001139094
28.09.2001 JP 2001300931

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.07.2015

(73) Titular/es:

TAKARA BIO, INC. (50.0%)
Seta 3-4-1 Otsu
Shiga 520-2193, JP y
NAGOYA INDUSTRIAL SCIENCE RESEARCH INSTITUTE (50.0%)

(72) Inventor/es:

NISHIYAMA, YUKIHIRO

(74) Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

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

Composición y método para tratar el cáncer usando herpes virus

CAMPO TÉCNICO

La presente invención se refiere a un nuevo virus del herpes simple (a partir de ahora en este documento puede abreviarse como HSV). Más específicamente, la presente invención se refiere a un uso y una composición para el tratamiento o prevención del cáncer usando un nuevo herpes virus.

TÉCNICA ANTECEDENTE

El primer registro de herpes virus en la historia data de la era de la antigua Grecia antes de Cristo. El herpes virus infrecuentemente se desarrolla después de infección primaria, pero se oculta en los ganglios o similares durante un largo periodo de tiempo. Cuando la capacidad inmune de un ser humano está reducida, el virus se activa y prolifera para desarrollar síntomas. En este caso, el herpes virus se dirige a un amplio intervalo de tejidos, tales como la piel, órganos genitales, globo ocular, nervios, y similares. Aunque haya anticuerpos presentes en la sangre que neutralizan el virus, a menudo aparecen síntomas. Por tanto se cree que una reducción en la función inmune celular está implicada en la aparición de los síntomas.

Ejemplos de herpes virus que se transmiten al ser humano incluyen virus del herpes simple (HSV-1), virus del herpes simple (HSV-2), virus varicela zoster (VZV), virus EB (EBV), citomegalovirus (HCMV), virus del herpes humano 6 (HHV-6), virus del herpes humano 7 (HHV-7), virus del herpes humano 8 (HHV-8), y similares.

HSV-1 causa gingivostomatitis o herpes facial como síntoma de infección primaria y herpes labial, queratoconjuntivitis por herpes, encefalitis por herpes como síntoma de infección recurrente. Un sitio de infección latente principal de HSV-1 es los ganglios trigéminos. HSV-2 causa herpes genital como síntoma de infección primaria y herpes genital o herpes neonatal como síntoma de infección recurrente. Un sitio de infección latente principal de HSV-2 es los ganglios sacros. VZV causa varicela (varicella) como síntoma de infección primaria y varicela y herpes zoster como síntoma de infección recurrente. Un sitio de infección latente principal de VZV es el ganglio de la raíz dorsal. EBV no causa síntomas o causa mononucleosis infecciosa como síntoma de infección primaria y linfoma de Burkitt, o cáncer rinofaríngeo como síntoma de infección recurrente. Un sitio de infección latente principal de EBV son las células B. HCMV no causa síntomas como síntoma de infección primaria y causa neumonía, enfermedad de inclusión citomegálica o similares como síntoma de infección recurrente. Se cree que los sitios de infección latente de HCMV son macrófagos y células progenitoras sanguíneas. HHV-6 causa exantema súbito como síntoma de infección primaria y exantema súbito (neumonía) como síntoma de infección recurrente. Se cree que los sitios de infección latente de HHV-6 son macrófagos y células progenitoras sanguíneas. HHV-7 causa exantema súbito como síntoma de infección primaria. Un sitio de infección latente principal de HHV-7 son las células T. HHV-8 no causa síntomas como síntoma de infección primaria y causa sarcoma de Kaposi, PEL, y enfermedad de Castleman como síntoma de infección recurrente. Un sitio de infección latente principal de HHV-8 son las células B. Por tanto, una diversidad de enfermedades infecciosas está causada por herpes virus.

Una vacuna viva atenuada contra el virus de la varicela es la única vacuna exitosa contra virus de herpes humano (Takahashi M., et al., Lancet, 2: 1288, 1974). Sin embargo, este virus vivo atenuado se obtuvo accidentalmente y se basa en la característica de que la varicela es más eficaz para inmunidad humoral ya que causa infección sistémica debido a viremia, a diferencia de otros herpes virus. Por lo tanto, aún no está disponible una vacuna que pueda utilizarse de forma universal para herpes virus.

HSV es un herpes virus representativo que es infeccioso para los seres humanos. La infección por HSV resulta de la inoculación del virus en la mucosa, o la invasión del virus a través de una rotura de la piel. La mayoría de las infecciones primarias suceden en los periodos neonatos, pero la mayoría de los niños con una infección primaria mejoran rápidamente. HSV se transmite a un bebé desde una niñera infectada o más generalmente una madre infectada (específicamente, un bebé encuentra herpes genital según el bebé pasa a través del canal de parto). En este caso, la infección por HSV causa síntomas graves. Por ejemplo, infección diseminada del neonato por herpes causa hepatitis o similares, de modo que el bebé puede morir.

Una vez que se adquiere HSV en el organismo, el HSV se mantiene en el organismo durante toda la vida. Durante el periodo de latencia, el HSV se localiza en neuronas de ganglios sensoriales (en el caso de lesiones faciales, habitualmente están implicados los ganglios trigéminos), y un paciente infectado es asintomático. Sin embargo, el HSV se activa por estímulos, tales como menstruación, exposición excesiva a luz solar o a viento frío, hormonas de la glándula pituitaria o glándula suprarrenal, reacciones alérgicas, o fiebre. El HSV activado se replica e invade el mecanismo de una célula hospedadora, produciendo partículas virales maduras infecciosas y causando muerte celular. Los síntomas causados por dicho ataque recurrente a menudo aparecen en la boca, cara, y órganos genitales. Por ejemplo, la queratitis debida a HSV recurrente se considera una causa principal de ceguera. Además, la infección por HSV en órganos genitales es frecuente, y la incidencia de enfermedades transmitidas por vía sexual (por ejemplo, herpes genital) causa por HSV es significativamente elevada. Más específicamente, ejemplos de

enfermedades inducidas por HSV recurrente que están causadas por el ataque recurrente incluyen enfermedades mucocutáneas, tales como herpes labial (un trastorno de los labios habitualmente llamado "ampolla febril" o "úlcera bucal"), gingivostomatitis (la boca y las encías se cubren de vesículas y las vesículas se rompen formando úlceras), faringitis, tonsilitis, queratoconjuntivitis (queratitis o inflamación de la córnea, que progresa a úlcera dendriforme y finalmente a cicatrización de la córnea, provocando ceguera), y herpes genital. En casos raros, la infección por HSV causa encefalitis, eczema herpético, herpes traumático, y hepatitis.

El virus del herpes simple 2 (en este documento a partir de ahora también mencionado como HSV-2) induce infección de la mucosa cutánea en órganos genitales. Después de la infección, el virus se mantiene en los ganglios sensoriales, y después se activa causando infección recurrente por HSV (Price, R. W., Walz, M. A., Wohlenberg, C., y Notkins, A. L. (1975) "Latent infection of sensory ganglia with herpes simplex virus: efficacy of immunization", Science 188, 938-940). Muchos investigadores han estudiado extensivamente las reacciones inmunes con infección por HSV-2 usando modelos animales.

Se ha informado de que una célula presentadora de antígenos principal (APC) es la célula dendrítica (DC), incluyendo célula de Langerhans (LC), y varios macrófagos (Mϕ) y células B en la vagina (Parr, M. B., y Parr, E. L. (1991), "Langerhans cells and T lymphocyte subsets in the murine vagina and cervix", Biol. Reprod. 44:491-498; Nandi, D., y Allison, J. P. (1993), "Characterization of neutrophiles and T lymphocytes associated with the murine vaginal epithelium", Reg. Immunol., 5, 332-338).

Se ha informado de que las células T desempeñan un papel importante como linfocitos T citotóxicos (CTL), y producen citoquinas antivirales contra infección por HSV-2 (Milligan, G. N., y Bernstein, D. I. (1995), "Analysis of herpes simplex virus-specific T cells in the murine female genital tract following genital infection with herpes simplex virus type 2", Virology 212, 481-489. ; Parr, M.B., y Parr, E.L. (1998), "Mucosal immunity to herpes simplex virus type 2 infection in the mouse vagina is impaired by in vivo depletion of T lymphocytes", J. Virol. 72, 2677-2685; Milligan, G. N., Bernstein, D. I., y Bourne, N. (1998), "T lymphocytes are required for protection of the vaginal mucosae and sensory ganglia of immune mice against reinfection with herpes simplex virus type 2", J. Immunol. 160, 6093-6100).

Se ha informado de que mutantes que carecen de la capacidad de replicación pueden provocar un amplio espectro de reacciones inmunes (Morrison, L. A., Da Costa, X. J., y Knipe, D. M. (1998), "Influence of mucosal and parenteral immunization with a replication-defective mutant of HSV-2 on immune responses and protection from genital infection", Virology 243, 178-187; McLean, C. S., Ni Challanain, D., Duncan, I., Boursnell, M. E. G., Jennings, R., y Inglis, S. C. (1996), "Induction of a protective immune response by mucosal vaccination with a DISC HSV-1 vaccine", Vaccine 14, 987-992).

Se sabe que la infección con HSV-2 atenuado causa el flujo de células $CD4^+$ tipo célula T tipo 1 (Th1) específica de HSV-2 en la vagina (Milligan, G. N., Bernstein, D. I., y Bourne, N. (1998), "T lymphocytes are required for protection of the vaginal mucosae and sensory ganglia of immune mice against reinfection with herpes simplex virus type 2", J. Immunol. 160, 6093-6100).

Sin embargo, en la patología de las enfermedades por HSV, no se ha aclarado completamente una relación detallada entre el papel de un gen de virus específico de HSV y las reacciones inmunes.

Por tanto, en las presentes circunstancias, no existe un método decisivo para prevenir o tratar enfermedades o trastornos causados por herpes virus.

Como terapia contra el cáncer, actualmente existen por lo general escisión quirúrgica, quimioterapia, radioterapia, y similares. Sin embargo, ninguna de estas terapias tiene suficiente efecto sobre algunos tipos de cánceres. Por ejemplo, en el caso de cáncer pancreático progresivo y cáncer de ovario progresivo, no se obtiene un pronóstico favorable. Particularmente, cuando el cáncer pancreático progresivo o el cáncer de ovario progresivo está diseminado al peritoneo, el pronóstico después de la escisión quirúrgica probablemente no estará a la altura de las expectativas.

Por lo tanto, se está haciendo un intento por desarrollar terapia génica como nuevo método para tratar el cáncer. Se están estudiando las siguientes terapias génicas contra el cáncer: (1) un método para inhibir el crecimiento de células tumorales controlando oncogenes usando antisentido o ribozima, o introduciendo antioncogenes; (2) un método para introducir un gen metabólicamente toxico (gen suicida) en células tumorales para causar que cometan suicidio; (3) un método para potenciar la inmunidad antitumoral introduciendo genes; (4) un método para proteger las células madre de médula ósea usando genes resistentes a múltiples fármacos con el fin de mejorar el efecto de la quimioterapia; y similares.

En cuanto al método de (2) enumerado anteriormente, se conoce un método que emplea la timidina quinasa del virus del herpes simple como gen suicida. Por ejemplo, se introduce la timidina quinasa del virus del herpes simple en células cancerosas, y después de ello, se administra ganciclovir. El ganciclovir se fosforila por la timidina quinasa del virus del herpes simple para activarse. El ganciclovir activado inhibe la ADN polimerasa de las células cancerosas. Por lo tanto, introduciendo la timidina quinasa del virus del herpes simple en células cancerosas, puede

suprimirse el crecimiento de las células cancerosas, y también es posible que las células cancerosas se destruyan completamente.

Como el virus del herpes simple es un virus patogénico, no puede usarse HSV de tipo silvestre para la terapia contra el cáncer. Por lo tanto, la investigación está dirigida al uso de virus del herpes simple atenuados para terapia contra el cáncer (documento WO96/39841).

Por lo tanto, se ha hecho un intento por usar terapia génica como nueva terapia contra el cáncer. Como un ejemplo de dicha terapia génica, se introduce un gen metabólicamente toxico (gen suicida) en células tumorales que causa que cometan suicidio. Más específicamente, se conoce un método que usa la timidina quinasa del virus del herpes simple como gen suicida.

Como se ha descrito anteriormente, el herpes virus, tal como el virus del herpes simple (por ejemplo, herpes virus tipo 1 (HSV-1) con capacidad de replicación), puede mediar la destrucción de células tumorales. Por lo tanto, se estudia el uso de un vector de virus HSV-1 modificado por ingeniería genética con capacidad de replicación en asociación con terapia antitumoral.

Como vector de virus HSV-1, se ha usado una cepa γ34.5-deficiente que carece del gen γ34.5 (y34.5) y por lo tanto tiene un nivel reducido de neurotoxicidad, de modo que se demostró un cierto nivel de su efecto antitumoral. Sin embargo, la cepa γ 34.5-deficiente aún no ha llegado a ser práctica.

Los presentes inventores se han concentrado en un gen que codifica US2 de HSV-2 (a partir de ahora abreviado como gen US2) y un gen que codifica US3 de HSV-2 (a partir de ahora en este documento abreviado como gen US3), e investigaron las tareas patológicas de éstos genes usando un mutante US2-deficiente o un recombinante génico de HSV US3-deficiente. Como resultado, los presentes inventores revelaron que ni el gen US2 ni el gen US3 son necesariamente esenciales para la replicación de los virus respectivos en cultivo celular, y el recombinante génico de HSV US3-deficiente está significativamente atenuado (Nishiyama, Y., Yamada, Y., Kurachi, R., y Daikoku, T (1992), "Construction of a US3 lacZ insertion Mutant of herpes simplex virus type 2 and characterization of its phenotype in vitro and in vivo", Virology 190, 256-268; Daikoku, T., Yamashita, Y., Tsurumi, T., Maeno, K., y Nishiyama, Y (1993), "Purification and biological characterization of the protein kinase encoded by the US3 gene of herpes simplex virus type 2", Virology 197, 685-694; Jiang, Y-H., Yamada, H. , Goshima, F. , Daikoku T., Oshima, S., Wada, K., y Nishiyama, Y (1998), "Characterization of the herpes simplex virus type 2 (HSV-2) US2 gene product and a US2-deficient HSV-2 mutant", J. Gen. Virol. 79, 2777-2784).

Las investigaciones previas sobre herpes genital usando modelos murinos revelaron que a diferencia de la infección con la cepa KOS de HSV-1, la infección intravaginal con la cepa 186 de HSV-2 altamente virulenta no logra inducir aumentos en las células T activadas dentro de la vagina o un aumento rápido de APC (célula presentadora de antígeno) en la fase temprana de infección (Inagaki-Ohara K, Daikoku T, Goshima F, Nishiyama Y, "Impaired induction of protective immunity by highly virulent herpes simplex virus type 2 in a murine model of genital herpes", Arch Virol. 2000; 145(10): 1989-2002.).

Por lo tanto, el objetivo de la presente invención es proporcionar una construcción de herpes virus modificada característica, el uso de la misma, o un método que usa la misma para tratar o prevenir enfermedades o trastornos asociados con herpes virus, u otras enfermedades o trastornos.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

En un primer aspecto, la presente invención proporciona un herpes virus, donde al menos dos genes no esenciales para la replicación del mismo están inactivados, donde el herpes virus es virus del herpes simple, donde el primer gen no esencial es UL56 y el segundo gen no esencial para la replicación es UL43, y donde dicho herpes virus incluye una deleción desde la posición 116515 hasta la 120346 del genoma del herpes virus y una deleción en la parte del genoma que codifica UL56 de modo que la secuencia que codifica 136 aminoácidos en el extremo N-terminal de un total de 197 aminoácidos de UL56 está delecionada, junto con su región cadena arriba.

El herpes virus puede tener la capacidad de seleccionar células cancerosas.

La inactivación puede incluir al menos una sustitución, adición, deleción o modificación de nucleótido en la secuencia del gen no esencial para la replicación. Puede insertarse una señal para detener la traducción en la secuencia del gen no esencial para la replicación.

El virus puede ser un virus del herpes simple modificado. El virus puede ser un HSV-1 o HSV-2 modificado.

En un segundo aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica para tratar o prevenir el cáncer, que comprende: un herpes virus de acuerdo con el primer aspecto de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

El cáncer puede seleccionarse entre el grupo que consiste en cáncer de ovario, cáncer hepático, cáncer pancreático, cáncer de vejiga, cáncer de uretra, cáncer de intestino grueso, cáncer cutáneo, melanoma maligno, osteosarcoma, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, cáncer de mama, cáncer pulmonar, cáncer de colon y cáncer de estómago.

En un tercer aspecto, la presente invención proporciona un herpes virus de acuerdo con el primer aspecto de la invención para su uso en el tratamiento o prevención del cáncer.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 es un gráfico que muestra un efecto de tratamiento del cáncer obtenido por inoculación de un HSV atenuado de acuerdo con la presente invención.

La Figura 2 es un gráfico que muestra la comparación de un efecto de tratamiento del cáncer entre el HSV atenuado de la presente invención y agentes antineoplásicos conocidos.

La Figura 3 muestra características clínicas de ratones BALB/c que se infectaron por vía intravaginal con 2 X 10^4 PFU de 186 de tipo silvestre, YY2 de tipo silvestre, o L1BR1 después de tratamiento E/DP. Se tomaron fotografías en el día 7 después de la infección intravaginal.

La Figura 4 muestra las tasas de supervivencia de ratones que se infectaron por vía intravaginal con 2 X 10^4 PFU de 186 de tipo silvestre, YY2 de tipo silvestre, o L1BR1. En cada caso, el número de ensayos fue n=7. Debe apreciarse que en esta figura, los círculos rellenos indican 186 de tipo silvestre, los cuadrados sin relleno indican YY2 de tipo silvestre, y los círculos sin relleno indican L1BR1.

La Figura 5 muestra la eliminación viral en la vagina de ratones infectados con 186 de tipo silvestre, YY2 de tipo silvestre o L1BR1. El lavado vaginal en el día 0 se recogió dos horas después de la infección intravaginal con 2 X 10^4 PFU de 186 de tipo silvestre, YY2 de tipo silvestre, o L1BR1. Los valores en tres experimentos diferentes están representados por ± desviación típica (DT). Debe apreciarse que en esta figura, los círculos rellenos indican 186 de tipo silvestre, los cuadrados sin relleno indican YY2 de tipo silvestre, y los círculos sin relleno indican L1BR1. Además, en la figura, ** indica que una diferencia significativa es $p<0,001$ en comparación con valores para ratones infectados con 186 de tipo silvestre. En la figura, * indica que la diferencia significativa es $p<0,01$.

Las Figuras 6A a 6F muestran las mucosas vaginales de ratones BALB/c usados en estudio histoquímico en los ejemplos. Las Figuras 6A y 6D muestran las mucosas vaginales de ratones infectados de forma simulada. Las Figuras 6B y 6E muestran las mucosas vaginales de ratones infectados con 186 de tipo silvestre. Las Figuras 6C y 6F muestran las mucosas vaginales de ratones infectados con L1BR1. G, H e I indican cambios histológicos en las paredes vaginales de ratones infectados con 186 de tipo silvestre (G), YY2 de tipo silvestre (H) y L1BR1 (I) en el día 5 después de la inoculación. Debe apreciarse que A a I son fotografías microscópicas a un aumento de 100. A, B, C, G, H e I muestran tinción con hematoxilina-eoxina. D, E y F muestran detección de antígenos HSV.

La Figura 7A muestra la cantidad de MNC vaginales infectadas con 186 de tipo silvestre, YY2 de tipo silvestre o L1BR1. La cantidad de MNC vaginales se midió contando las células supervivientes teñidas con azul tripán, que se recogieron de ratones infectados con cada virus. Debe apreciarse que en esta figura, los círculos rellenos indican 186 de tipo silvestre, los cuadrados sin relleno indican YY2 de tipo silvestre, y los círculos sin relleno indican L1BR1.

La Figura 7B muestra la cinética de Fas expresada en EC vaginales. EC vaginales aisladas de ratones infectados con 186 de tipo silvestre, YY2 de tipo silvestre, o L1BR1 se tiñó con mAb anti Fas.

La Figura 8 muestra MNC vaginales aisladas de ratones infectados por VIH, que se tiñeron con CD11b y CD40 para la detección de APC, y con mAb marcado para la detección de células T. Los valores en tres experimentos diferentes se representan por ± desviación típica (DT). En la figura, ** indica que una diferencia significativa fue $p<0,001$ en comparación con valores para ratones infectados con 186 de tipo silvestre. En la figura, * indica que la diferencia significativa es $p<0,01$.

La Figura 9 muestra la cantidad de citoquinas generadas en el lavado vaginal. El lavado vaginal se recogió de ratones infectados con 186 de tipo silvestre, YY2 de tipo silvestre, o L1BR1 en el día 0, 2, y 4. Los niveles de IL-12, IFN-γ e IL-4 se midieron por ELISA. Los valores en tres experimentos diferentes se representan por ± desviación típica (DT). En esta figura, ** indica que una diferencia significativa es $p<0,05$ en comparación con valores para ratones infectados con 186 de tipo silvestre. En la figura, * indica que la diferencia significativa es $p<0,01$.

La Figura 10A es un diagrama esquemático que muestra un gen de HSV-2. Este diagrama esquemático viene acompañado por una unidad de mapa.

La Figura 10B es un mapa de escisión de la cepa 186 de HSV-2 por Hind III.

La Figura 10C muestra las posiciones correspondientes de la enzima de restricción (sitio de escisión por endonucleasa de restricción) en el mapa, que se refiere a la presente invención. Debe apreciarse que en la figura, H indica sitios para la enzima de restricción Hind III, B indica sitios para la enzima de restricción Bam HI, G indica sitios para la enzima de restricción Bal II, X indica sitios para la enzima de restricción Xba I.

La Figura 10D indica la posición del gen US3 en un fragmento Hind III-Xba I de 4,8-kb pre-clonado en pLHX que es pBluescript.

La Figura 10E muestra un fragmento Bam HI de 4,3-kb que contiene un gen que codifica lazZ fusionado con un promotor HSV-1 β8 y una señal de poliadenilación derivada de SV40 en el extremo 5' y el extremo 3', respectivamente. El fragmento Bam HI de 4,3-kb se insertó en los sitios para enzimas de restricción de pLHX por Bal II, preparando de ese modo un pHZL1 recombinante génico.

La Figura 11 es un diagrama que muestra la comparación del tiempo de supervivencia entre inoculación con HSV UL56-deficiente (cepa HF; MNO10) e inoculación con HSV UL39-inactivado. En la figura, los rombos sin relleno indican un control, los cuadrados rellenos indican ratones a los que se ha dado el HSV UL39-inactivado de una vez, los triángulos sin relleno indican ratones a los que se ha dado HSV UL39-inactivado en dos veces, y las cruces indican ratones a los que se ha dado la cepa RF de una vez.

La Figura 12 es un diagrama que muestra el tiempo de supervivencia cuando se administró consecutivamente HSV UL56-deficiente (MNO10). En la figura, los rombos rellenos indican un control, y los triángulos sin relleno indican ratones a los que se ha dado consecutivamente la cepa HF. También se muestra el cambio en el peso corporal de los mismos.

La Figura 13A es un diagrama que muestra la estructura de un genoma usando en el Ejemplo 9. L1BR1 es HSV-2 en que está inactivado el gen US3 del mismo. HF es HSV-1 en que está inactivado el gen UL56 del mismo. HL es un híbrido de L1BR1 y HF. Una región L es HSV-1 mientras una región S es HSV-2. Tanto UL56 como US3 están defectuosos. La estructura del genoma se confirma por al análisis de PCR a continuación.

La Figura 13B es un diagrama que muestra la estructura de un genoma usando en el Ejemplo 13. HF es HSV-1 en que está inactivado el gen UL56 del mismo. HH es HSV-1 en que están inactivados los genes UL39 y UL56 del mismo. HSV UL39-inactivado es HSV-1 en que está inactivado el gen UL39. También se muestra una lista de bases mutadas.

La Figura 13C es un diagrama para explicar la inactivación de HF en detalle. La Figura 13D muestra una secuencia génica en las cercanías del gen UL56 insertado entre la región TRL y la región UL. La Figura 13E muestra una secuencia génica en las cercanías del gen UL52 insertado entre la región TLR y la región UL. La Figura 13F muestra una secuencia génica inherente en las cercanías del gen UL56.

La Figura 14 es un gráfico que muestra el efecto antitumoral de HSV-2 en que está inactivado el gen US3 del mismo.

La Figura 15 es un gráfico que muestra el efecto antitumoral de HSV-2 en que está inactivado el gen UL56 del mismo.

MEJOR MODO DE REALIZAR LA INVENCIÓN

Debe entenderse en toda la presente memoria descriptiva que artículos para una forma singular (por ejemplo, "a", "an", "the", etc. en Inglés; "ein", "der", "das", "die", etc. y sus inflexiones en Alemán; "un", "une", "le", "la", etc. en Francés; "un", "una", "el", "la", etc. en Español, y artículos, adjetivos, etc. en otras lenguas) incluyen el concepto de su pluralidad salvo que se mencione de otro modo. También debe entenderse que los términos usados en este documento tienen definiciones típicamente usadas en la técnica salvo que se mencione de otro modo.

El término "herpes virus" como se usa en este documento se refiere a cualquier virus que pertenezca a la familia herpes virus. Un herpes virus comprende aproximadamente 162 capsómeros que incluyen ADN de doble hélice que tiene un peso molecular de aproximadamente 80-150 x 10^6 Da alrededor de una proteína central. Un herpes virus se caracteriza por infección latente. Una partícula de herpes virus está en forma de una esfera que tiene un diámetro de aproximadamente 100-200 nm y tiene una cápsida tipo icosaedro regular de un diámetro de aproximadamente 100 nm dentro de su envuelta. El genoma del mismo es ADN bicatenario. El tamaño del genoma es de 152260 pares de bases para el virus del herpes simple tipo I, de 172282 pares de bases para el virus EB, 229400 pares de bases para citomegalovirus, por ejemplo. El virus se multiplica dentro de un núcleo celular para formar cuerpos de inclusión que son positivos a reacción de Feulgen. El virus se multiplica bien en un hospedador natural, células epiteliales de un animal experimental, tal como piel y mucosa, tejido nervioso central, y similares. La familia de herpes virus se divide en tres: la subfamilia de herpes virus alfa (por ejemplo, herpes virus humano 1 (virus del herpes simple tipo 1;

HSV-1), herpes virus humano 2 (virus del herpes simple tipo 2; HSV-2), virus de Allerton, virus B, virus de mamilitis bovina (BMV), virus de rinotraqueítis felina, virus de laringotraqueítis infecciosa, virus ILT, virus varicella zoster (VZV), y similares); la subfamilia de herpes virus beta (por ejemplo, citomegalovirus, herpes virus humano 6 (HHV-6), herpes virus humano 7 (HHV-7), y similares); la subfamilia de herpes virus gamma (por ejemplo, herpes virus humano 4 (HHV-4), herpes virus humano 8 (HHV-8), virus EB (EBV), virus de la enfermedad de Marek, y similares). Preferiblemente, el herpes de la invención se deriva de la subfamilia de herpes virus alfa.

La expresión "virus del herpes simple" o "HSV" como se usa en este documento se refiere a cualquiera de los virus del género virus simple de la subfamilia de herpes virus alfa de la familia herpes virus. El virus del herpes simple es de 100 a 200 nm de diámetro y tiene una envuelta que contiene una glucoproteína viral en su capa más externa, en que se incluye una cápsida icosaédrica. Una construcción llamada tegumento está presente entre la cápsida y la envuelta, en que están contenidas varias proteínas virales. En la parte central (núcleo) de la cápsida, hay un ADN bicatenario (de aproximadamente 150.000 pares de bases). Están presentes al menos 74 genes en el ADN genómico, aproximadamente la mitad de los cuales son genes no esenciales para la reproducción de células cultivadas (genes accesorios). La reproducción del ADN genómico y la formación de la cápsida se realizan dentro del núcleo. La cápsida que incluye ADN se transfiere desde el núcleo al citoplasma por gemación desde la membrana nuclear. HSV incluye dos especies de virus llamadas, de forma representativa, tipo 1 (HSV-1) y tipo 2 (HSV-2), que están muy relacionadas entre sí. Se emplea un mutante de HSV-1 y HSV-2 en la presente invención. En algunos casos, es preferible HSV-2. La expresión "HSV atenuado" como se usa en este documento se refiere a HSV cuya toxicidad está reducida por modificación o similares.

Las expresiones "gen no esencial para la replicación" y "gen accesorio" se usan en este documento de forma intercambiable. Incluso si dicho gen está ausente en un virus, se mantiene el crecimiento del virus. Dicho gen se localiza en una región UL o región US y constituye un gen único en el ADN genómico. Ejemplos de dicho gen incluyen, aunque sin limitación, UL2, UL3, UL4, UL7, UL10, UL11, UL12, UL13, UL14, UL16, UL20, UL21, UL24, UL35, UL39, UL40, UL41, UL43, UL44, UL45, UL46, UL47, UL50, UL51, UL55, UL56, US1, US2, US3, US4, US5, US7, US8, US8.5, US9, US10, US11, US12, y similares para virus del herpes simple tales como HSV-1 y HSV-2. Para otros herpes virus, pueden inactivarse genes correspondientes a los genes descritos anteriormente.

El HSV atenuado de la presente invención puede multiplicarse de forma favorable en células cancerosas. Preferiblemente, dicho HSV tiene la capacidad de seleccionar una célula cancerosa.

La expresión "se inactiva un gen" como se usa en este documento indica que se altera al menos una función del gen, o preferiblemente se elimina sustancialmente. El método de inactivación no está particularmente limitado. Ejemplos de dichos métodos incluyen los siguientes métodos conocidos.

Por ejemplo, un gen HSV no esencial para la replicación (por ejemplo, gen US3) se trata para que no se pueda traducir (por ejemplo, se altera un promotor de modo que no se exprese); o un gen no esencial particular para la replicación de los genes HSV (por ejemplo, gen US3) se somete a recombinación (por ejemplo, inserción de otra secuencia, eliminación de una secuencia parcial, modificación de bases, sustitución de bases, y similares), de modo que el gen recombinado se traduzca en una proteína diferente de US3 (por ejemplo, inserción de otra secuencia, eliminación de una secuencia parcial, modificación de aminoácidos, sustitución de aminoácidos, y similares).

Un proceso de recombinación génica para preparar los recombinantes génicos descritos anteriormente no está particularmente limitado. Por ejemplo, una parte o la totalidad de un gen no esencial particular para la replicación (por ejemplo, gen US3) se deleciona; una parte o la totalidad de un gen no esencial particular para la replicación se sustituye; una parte de un gen no esencial particular para la replicación se invierte, una parte del gen US3 se repite; una parte de un gen no esencial particular para la replicación se transloca; un fragmento génico se inserta en un gen no esencial particular para la replicación para interrumpir el gen no esencial particular para la replicación; y similares. Entre ellos, la deleción de una parte o la totalidad de un gen no esencial particular para la replicación, la sustitución de una parte o la totalidad de un gen no esencial particular para la replicación, o la inserción de un fragmento génico en un gen no esencial particular para la replicación para interrumpir el gen no esencial particular para la replicación es preferible. Particularmente, la inserción de un fragmento génico en un gen no esencial particular para la replicación para interrumpir el gen no esencial particular para la replicación es más preferible. Incluso más preferiblemente, el fragmento génico a invertir contiene una señal que detiene la traducción. Entre las señales que detiene la traducción, es preferible una señal de poliadenilación derivada de SV40.

Los términos "proteína", "polipéptido" y "péptido" se usan en este documento de forma intercambiable y se refieren a un polímero que consiste en una serie de aminoácidos. El término "aminoácido" se refiere a una molécula orgánica que contiene uno o más átomos de carbono con uno o más grupos carboxi y uno o más grupos amino. Un aminoácido en este documento es preferiblemente cualquiera de los veinte aminoácidos de origen natural pero no se limita a ellos.

Un cierto aminoácido puede sustituirse con otro aminoácido sin clara reducción o pérdida de capacidad de unión interactiva, por ejemplo, en una estructura proteica, tal como una región catiónica o un sitio de unión para una molécula sustrato. La función biológica de una cierta proteína se determina mediante la capacidad de interacción y

propiedades de la proteína. Por lo tanto, incluso si la sustitución de un aminoácido particular se realiza en una secuencia de aminoácidos (o al nivel de secuencia codificante de ADN), una proteína puede mantener sus propiedades originales después de la sustitución. Por lo tanto, pueden modificarse péptidos descritos en este documento o ADN que codifica los péptidos de diversos modos sin alterar claramente su utilidad biológica.

Cuando se diseñan las modificaciones descritas anteriormente, pueden tenerse en consideración los índices de hidrofobicidad de los aminoácidos. Los índices de hidrofobicidad de los aminoácidos desempeñan un papel importante para proporcionar una proteína con una función biológica interactiva, que generalmente está reconocida en la técnica (Kyte. J y Doolittle, R.F., J. Mol. Biol. 157 (1): 105-132, 1982). La propiedad hidrófoba de un aminoácido contribuye a la estructura secundaria de una proteína generada y después regula las interacciones entre la proteína y otras moléculas (por ejemplo, enzimas, sustratos, receptores, ADN, anticuerpos, antígenos, etc.). A cada aminoácido se le da un índice de hidrofobicidad en base a la hidrofobicidad y propiedades de carga de los mismos del siguiente modo: isoleucina (+4,5); valina (+4,2); leucina (+3,8); fenilalanina (+2,8); cisteína/cistina (+2,5) ; metionina (+1,9); alanina (+1,8); glicina (-0,4); treonina (-0,7); serina (-0,8); triptófano (-0,9); tirosina (-1,3); prolina (-1,6); histidina (-3,2); ácido glutámico (-3,5); glutamina (-3,5); ácido aspártico (-3,5); asparagina (-3,5); lisina (-3,9); y arginina (-4,5)).

Es bien sabido que si un cierto aminoácido se sustituye con otro aminoácido que tiene un índice de hidrofobicidad similar, una proteína resultante aún puede tener una función biológica similar a la de la proteína original (por ejemplo, una proteína que tiene una actividad enzimática equivalente). Para dicha sustitución de aminoácido, el índice de hidrofobicidad es preferiblemente en ±2, más preferiblemente en ±1, e incluso más preferiblemente en ±0,5. Se entiende en la técnica que dicha sustitución de aminoácido basada en la hidrofobicidad es eficaz. Como se describe en la patente de Estados Unidos Nº 4.554.101, a los restos de aminoácido se les da los siguientes índices de hidrofobicidad: arginina (+3,0); lisina (+3,0); ácido aspártico (+3,0±1); ácido glutámico (+3,0±1); serina (+0,3); asparagina (+0,2); glutamina (+0,2); glicina (0); treonina (-0,4); prolina (-0,5±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); y triptófano (-3,4). Se entiende que un aminoácido puede sustituirse con otro aminoácido que tenga un índice de hidrofilicidad similar y aún proporcionar un equivalente biológico. Para dicha sustitución de aminoácido, el índice de hidrofilicidad es preferiblemente en ±2, más preferiblemente en ±1, e incluso más preferiblemente en ±0,5.

La expresión "sustitución conservativa" como se usa en este documento se refiere a sustitución de aminoácido en que un aminoácido sustituido y un aminoácido de sustitución tienen índices similares de hidrofilicidad y/o hidrofobicidad. Ejemplos de la sustitución conservativa incluyen, aunque sin limitación, sustituciones dentro de cada uno de los siguientes grupos: arginina y lisina; ácido glutámico y ácido aspártico; serina y treonina; glutamina y asparagina; y valina, leucina, e isoleucina, que son bien conocidos para los especialistas en la técnica.

La expresión "sustitución no conservativa" como se usa en este documento se refiere a sustitución que no es una sustitución conservativa como se ha descrito anteriormente y por la cual se altera una función de una proteína. Ejemplos de sustitución no conservativa incluyen, aunque sin limitación, sustitución entre cada uno de los siguientes grupos; arginina y lisina; ácido glutámico y ácido aspártico; serina y treonina; glutamina y asparagina; valina, leucina, e isoleucina; y similares, que son bien conocidos para los especialistas en la técnica.

Para preparar polipéptidos funcionalmente equivalentes, puede realizarse adición, deleción o modificación de aminoácidos diferentes a la sustitución de aminoácido. Sustitución de aminoácido significa sustituir al menos un aminoácido (por ejemplo, 1 a 10 aminoácidos, preferiblemente 1 a 5 aminoácidos, y más preferiblemente 1 a 3 aminoácidos) en un péptido original con la misma cantidad de aminoácidos diferentes. Adición de aminoácido significa añadir al menos un aminoácido (por ejemplo, 1 a 10 aminoácidos, preferiblemente 1 a 5 aminoácidos, y más preferiblemente 1 a 3 aminoácidos) a una cadena peptídica original. Deleción de aminoácido significa delecionar al menos un aminoácido (por ejemplo, 1 a 10 aminoácidos, preferiblemente 1 a 5 aminoácidos, y más preferiblemente 1 a 3 aminoácidos) de un péptido original. Modificación de aminoácido incluye, aunque sin limitación, amidación, carboxilación, sulfatación, halogenación, alquilación, glucosilación, fosforilación, hidroxilación, acilación (por ejemplo, acetilación), y similares. Un aminoácido sustituido o añadido puede ser un aminoácido de origen natural, un aminoácido de origen no natural, o un análogo de aminoácido. Es preferible un aminoácido de origen natural.

Una molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido descrito en este documento puede tener una o más deleciones de bases (se deleciona una parte de la secuencia de ácido nucleico), una o más sustituciones (se sustituye una parte de la secuencia de ácido nucleico con otras bases), o una o más adiciones (se añade una parte de otra secuencia de ácido nucleico) siempre que el polipéptido expresado tenga sustancialmente la misma actividad que el polipéptido descrito en este documento, si se pretende que el péptido expresado muestre la misma función o similar. Como alternativa, puede ligarse otro ácido nucleico al extremo 5' y/o extremo 3'. La molécula de ácido nucleico puede hibridar con un gen que codifica el polipéptido en condiciones rigurosas y puede codificar un polipéptido que tenga sustancialmente la misma función que la del polipéptido. Un método para preparar dicha molécula de ácido nucleico es conocido en la técnica y se usa como se describe en este documento.

Una parte de la secuencia de ácido nucleico del polipéptido descrito en este documento puede someterse a deleción o sustitución, o una parte de otra secuencia de ácido nucleico puede añadirse a la secuencia de ácido nucleico del polipéptido de modo que la actividad del polipéptido expresado sea sustancialmente diferente de la del polipéptido original o preferiblemente se elimine, si el método pretende modificar, o preferiblemente, inactivar, una función de un polipéptido. Como alternativa, puede ligarse otro ácido nucleico al extremo 5' y/o extremo 3'.

La expresión "incorporado de forma expresable" como se usa en este documento indica que se incorpora un gen suicida de interés corriente abajo de una secuencia promotora descrita a continuación, por ejemplo.

Un HSV atenuado puede obtenerse insertando el gen suicida exógeno descrito anteriormente cadena abajo de una secuencia promotora usando un vector HSV en el cual están incorporadas una secuencia promotora y una secuencia terminadora para inactivar un gen accesorio, por ejemplo.

Un promotor no está particularmente limitado si el promotor funciona como promotor en células tumorales. Son preferibles un promotor específico de tumor y un promotor derivado de HSV. Ejemplos de dicho promotor, que también es útil en la práctica de la presente invención (particularmente, en la producción de una vacuna génica para seres humanos), incluye, aunque sin limitación, promotores derivados del virus de simio 40 (SV40), virus del tumor de glándulas mamarias murino (MMTV), virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (promotor de la secuencia de repetición terminal larga (LTR) de VIH), virus de Moloney, ALV, citomegalovirus (CMV) (promotor temprano inmediato de CMV), virus Epstein-Barr (EBV), virus del sarcoma de Rous (RSV), y promotores de genes humanos, tales como, actina humana, miosina humana, hemoglobina humana, creatina muscular humana, y metalotioneina humana.

Un promotor específico de célula tumoral incluye un promotor que se induce selectivamente o a un alto nivel en un tipo particular de célula o célula tumoral, tal como un promotor de proteína embrionaria cancerosa (por ejemplo, CEA, AFP, y similares), un promotor de tirosinasa, un promotor de albúmina, un promotor de GRP78/Bip inducido por estrés, y similares.

Ejemplos de un promotor derivado de HSV incluyen un promotor de proteína primaria UL29 de HSV, un promotor de UL39 de HSV, y similares.

Ejemplos de una señal de poliadenilación útil para la práctica de la presente invención (particularmente, en la producción de una vacuna génica para seres humanos) incluyen, aunque sin limitación, una señal de poliadenilación de hormona de crecimiento bovina, una señal de poliadenilación de SV40, y una señal de poliadenilación de LTR. Particularmente, se emplea una señal de poliadenilación de SV40 presente en el plásmido pCEP4 (Invitrogen, San Diego, CA; llamada señal de poliadenilación de SV40).

Además de los elementos de control necesarios para la expresión del ADN, pueden incluirse otros elementos en una molécula de ADN. Un promotor derivado de HSV usado en este documento puede tener adicionalmente un potenciador. Los elementos adicionales descritos anteriormente incluyen un potenciador. Un potenciador puede seleccionarse del grupo que consiste en potenciadores de actina human, miosina humana, hemoglobina humana, creatina muscular humana y virus, tales como potenciadores de CMV, RSV y EBV, pero sin limitación a ellos.

Puede proporcionarse una construcción génica con un origen de replicación de mamífero para mantener la construcción fuera de un cromosoma y producir una gran cantidad de copias dentro de una célula. Los plásmidos y pCEP4 y pREP4 (Invitrogen, San Diego, CA) incluyen el origen de replicación del virus Epstein-Barr y una región codificante del antígeno nuclear EB NA-1 que causa replicación de grandes cantidades de copias del episoma. En algunas realizaciones, se inserta un ADNc que codifica una proteína inmunomoduladora dentro de pCDNA3.

Puede suministrarse una molécula de ácido nucleico que incluya una secuencia de nucleótidos que codifica los genes de una proteína diana, una proteína inmunomoduladora, y una proteína que acelere una respuesta inmune contra la proteína diana. Un ejemplo de dicho gen es un gen que codifica una citoquina o una linfoquina, tal como interferón-α, interferón-gamma, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), TNF, factor de crecimiento epidérmico (EGF), IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10 e IL-12. Una construcción génica usada en una composición para inmunización puede incluir el gen de GM-CSF.

Para maximizar la producción de proteína, puede seleccionarse una secuencia de control adecuada para la expresión génica en una célula en la cual se inserta una construcción génica. Además, puede seleccionarse un codón que se transcriba de forma más eficaz en una célula. Los especialistas en la técnica pueden producir fácilmente una construcción de ADN que funcione dentro de una célula en base a técnicas bien conocidas.

Dicho ácido nucleico puede obtenerse por un método de PCR bien conocido, o sintetizarse químicamente. Estos métodos pueden combinarse con un método de mutagénesis específica de sitio, un método de hibridación, y similares.

Los métodos de biología molecular, métodos bioquímicos, y métodos microbiológicos usados en este documento son bien conocidos y habitualmente usados en la técnica, como se describe en, por ejemplo, Ausubel F. A. et al Ed. (1988), "Current Protocols in Molecular Biology", Wiley, Nueva York, NY; Sambrook J. et al., (1987) "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 2ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Jikken Igaku [Experimental Medicine], "Experimental Methods for Gene Introduction & ExpressionAnalysis", edición especial, Yodo-sha, 1997; y similares.

El término "homología" de un gen se refiere a la magnitud de identidad entre dos o más secuencias génicas. Por lo tanto, cuanto mayor sea la homología entre dos ciertos genes, mayor será la identidad o similitud entre sus secuencias. Que dos genes tengan o no homología se determina comparando sus secuencias directamente o mediante un método de hibridación en condiciones rigurosas. Cuando dos secuencias génicas se comparan directamente entre sí, los genes tienen homología si representativamente al menos el 50%, preferiblemente al menos el 70%, más preferiblemente al menos el 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, ó 99% de la secuencia de ADN de los genes es idéntica.

La comparación de identidad entre secuencias de bases se calcula en este documento mediante BLAST que es una herramienta para analizar una secuencia usando parámetros por defecto.

La expresión "polinucleótidos hibridado en condiciones rigurosas" como se usa en este documento se refiere a un polinucleótidos hibridado en condiciones bien conocidas habitualmente usadas en la técnica. Dicho polinucleótido puede obtenerse mediante un método de hibridación de colonias, un método de hibridación en placa, un método de hibridación por transferencia de Southern, o similares usando un polinucleótido seleccionado entre los polinucleótidos de la presente invención como sonda. Específicamente, dicho polinucleótido puede identificarse por hibridación usando un filtro, sobre el cual se inmoviliza el ADN derivado de una colonia o una placa, en presencia de NaCl 0,7 a 1,0 M a 65ºC, seguido de lavado del filtro con solución de SSC (solución salina-citrato sódico) que tienen una concentración de factor 0,1 a 2 (solución de SSC con concentración de factor 1 contiene cloruro sódico 150 mM y citrato sódico 15 mM) a 65ºC. La hibridación puede realizarse de acuerdo con un método descrito en un manual experimental, tal como Molecular Cloning 2ª ed., Current Protocols in Molecular Biology, Suplemento 1-38, DNA Cloning 1: Core Techniques, A Practical Approach, Segunda Edición, Oxford University Press (1995), y similares. Preferiblemente, las secuencias hibridadas en condiciones rigurosas en este documento excluyen secuencias que consisten solamente en A y secuencias que consisten solamente en T.

La expresión "polinucleótido hibridable" como se usa en este documento se refiere a un polinucleótido que puede hibridar con otro polinucleótido en las condiciones descritas anteriormente para hibridación. Ejemplos específicos de polinucleótidos hibridables incluyen un polinucleótido que tiene al menos un 60% de homología con la secuencia de bases de ADN que codifica un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos indicada por la SEC ID Nº 2, 4 o 6, más preferiblemente un polinucleótido que tiene al menos un 80% de homología, e incluso más preferiblemente al menos un 95%. La homología descrita en este documento se representa por la similitud indicada por un valor usando BLAST que es un programa de búsqueda que emplea un algoritmo desarrollado por Altschul et al. (J. Mol. Biol. 215, 403-410 (1990)).

La expresión "oligonucleótido derivado" o "polinucleótido derivado" se refiere a un oligonucleótido o polinucleótido que incluye un derivado de un nucleótido o que tiene un enlace entre nucleótidos que no es normal. Los términos descritos anteriormente se usan de forma intercambiable. Específicamente, ejemplos de dicho oligonucleótido incluyen un oligonucleótido derivado en que un enlace fosfodiéster se ha convertido en un enlace fosfotioato, un oligonucleótido derivado en que el enlace fosfodiéster se ha convertido en enlace N3'-P5' fosforamidato, un oligonucleótido derivado en que la ribosa y el enlace fosfodiéster se han convertido en un enlace ácido péptido-nucleico, un oligonucleótido derivado en que el uracilo se ha sustituido con C-5 propinil uracilo, un oligonucleótido derivado en que el uracilo se ha sustituido con C-5tiazol uracilo, un oligonucleótido derivado en que la citosina se ha sustituido con C-5 propinil citosina, un oligonucleótido derivado en que la citosina se ha sustituido con citosina modificada con fenoxazina, un oligonucleótido derivado en que la ribosa se ha sustituido con 2'-O-propinil ribosa, un oligonucleótido derivado en que la ribosa se ha sustituido con 2'-metoxietoxi ribosa, y similares.

El término "aminoácido" como se usa en este documento se refiere a cualquier aminoácido de origen natural y aminoácido de origen no natural como se ha descrito anteriormente. La expresión "aminoácido derivado" como se usa en este documento se refiere a un aminoácido que es diferente de aminoácidos de origen natural pero que tiene una función similar a la de su aminoácido de origen natural original. Dichos aminoácidos derivados son bien conocidos en la técnica.

El término "nucleótido" como se usa en este documento se refiere a cualquier nucleótido de origen natural y nucleótido de origen no natural. La expresión "nucleótido derivado" como se usa en este documento se refiere a un nucleótido que es diferente de nucleótidos de origen natural pero que tiene una función similar a la de su nucleótido de origen natural original. Dichos nucleótidos derivados son bien conocidos en la técnica.

La expresión "actividad biológica" como se usa en este documento se refiere a la actividad que un cierto factor (por ejemplo, polipéptido o proteína) tiene dentro de un organismo, incluyendo actividad que muestra diversas funciones.

Por ejemplo, cuando el cierto factor es una enzima, su actividad biológica incluye actividad enzimática. Como otro ejemplo, cuando el cierto factor es un ligando, su actividad biológica incluye la unión a un receptor al cual corresponde el ligando.

El término "variante" como se usa en este documento se refiere a una sustancia, tal como polipéptido, polinucleótido, o similares, que difiere parcialmente de la sustancia original. Ejemplos de dicha variante incluyen una variante de sustitución, una variante de adición, una variante de deleción, una variante truncada, una variante alélica, y similares. El término "alelo" como se usa en este documento se refiere a una variante genética localizada en un locus idéntico a un gen correspondiente, donde los dos genes se distinguen entre sí. Por lo tanto, la expresión "variante alélica" como se usa en este documento se refiere a una variante que tiene una relación alélica con un cierto gen. El término "homólogo" de una molécula de ácido nucleico como se usa en este documento se refiere a una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótidos que tiene homología con la secuencia de nucleótidos de una molécula de ácido nucleico de referencia. De forma representativa, "homólogo" se refiere a un polinucleótido que hibrida con una molécula de ácido nucleico de referencia en condiciones rigurosas. En el caso de la molécula de ácido nucleico descrita en este documento, un "homólogo" es una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia de ácido nucleico que tiene homología con una secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de una proteína, cuya función biológica es la misma que o similar al promotor de la presente invención. Por lo tanto, los conceptos de los términos "homólogo" y "variante" solapan parcialmente. Por lo tanto, un homólogo tiene homología de aminoácidos o nucleótidos con un cierto gen en una cierta especie (preferiblemente al menos el 60% de homología, más preferiblemente al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, y al menos el 95% de homología). Un método para obtener dicho homólogo se entiende claramente a partir de la descripción de la presente memoria descriptiva.

Cuando se requiere en este documento la introducción de una construcción de virus en una célula, la construcción de virus puede introducirse en una célula por cualquier método para introducir ADN en una célula. Ejemplos de dicho método incluyen transfección, transducción, transformación, y similares (por ejemplo, electroporación, un método que usa pistola de partículas (pistola génica), y similares).

Las composiciones farmacéuticas (medicinales) descritas en este documento contienen el herpes virus de la presente invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Dichas composiciones farmacéuticas están en cualquier forma siempre que sea eficaz para un hospedador. Ejemplos de la forma incluyen, aunque sin limitación, polvos, gránulos, cápsulas, comprimidos, comprimidos oblongos, píldoras, soluciones, trociscos, comprimidos bucales, comprimidos sublinguales, comprimidos vaginales, elixires, jarabes, bebidas refrescantes, suspensiones, emulsiones, aerosoles, inyecciones, infusiones, nebulosas, linimento, pomadas, parches, lociones, supositorios, y similares. Preferiblemente, la presente invención se proporciona en forma de inyecciones de vacuna. La presente invención puede estar en forma de preparaciones sostenidas. Puede aplicarse una técnica DDS a la presente invención.

Preferiblemente, la composición farmacéutica de la presente invención contiene al menos 10^3 herpes virus, y preferiblemente al menos $2x10^3$, al menos $5x10^3$, al menos 10^4, al menos $2x10^4$, al menos $5x10^4$, al menos 10^5, al menos $2x10^5$, al menos $5x10^5$, al menos 10^6, al menos $2x10^6$, al menos $5x10^6$, al menos 10^7, al menos $2x10^7$, al menos $5x10^7$, al menos 10^8, al menos $2x10^8$, al menos $5x10^8$, al menos 10^9, al menos $2x10^9$, al menos $5x10^9$, al menos 10^{10}, o al menos más de 10^{10} herpes virus. Una cantidad adecuada varía dependiendo de circunstancias. Los especialistas en la técnica determinarían la cantidad adecuada, dependiendo del estado del ingrediente activo en una composición, o en el caso de una composición medicinal, de las condiciones de un paciente, las condiciones de una enfermedad de un paciente, la vía de administración, la forma de dosificación, o las condiciones de un paciente controlado durante la administración.

Ejemplos del vehículo farmacéuticamente aceptable incluyen, aunque sin limitación excipientes, aglutinantes, disgregantes, lubricantes, antioxidantes, conservantes, colorantes, agentes aromatizantes, estabilizantes, agentes de recubrimiento, diluyentes, emulsionantes, agentes de suspensión, disolventes, cargas, agentes de volumen, tampones, vehículos de suministro, y/o adyuvantes farmacéuticos.

La composición farmacéutica puede contener adicionalmente los siguientes ingredientes medicinales:

fármacos para el sistema nervioso central (por ejemplo, anestésicos generales, sedantes-hipnóticos, ansiolíticos, antiepilépticos, agentes anti-inflamatorios, estimulantes, antihipnóticos, agentes antiparkinson, antipsicóticos, remedios de combinación para el catarro, y similares);

agentes para los nervios periféricos (por ejemplo, anestésicos locales, relajantes de músculo esquelético, agentes para nervios autónomos, agentes antiespasmódicos, y similares);

fármacos para órganos sensoriales (por ejemplo, agentes oftalmológicos, agentes otorrinolaringológicos, antidínicos, y similares);

fármacos para órganos circulatorios (por ejemplo, cardiotónicos, antiarrítmicos, diuréticos, agentes antihipertensivos, vasoconstrictores, vasodilatadores, agentes antihiperlipemia, y similares);

fármacos para órganos respiratorios (por ejemplo, estimulantes respiratorios, antitusivos, expectorantes, expectorantes antitusivos, broncodilatadores, colutorios, y similares);

fármacos para órganos digestivos (por ejemplo, estegnóticos, antiflatulentos, agentes para las úlceras pépticas, estomacales, antiácidos, catárticos, enemas, colagogos, y similares);

agentes hormonales (por ejemplo, agentes hormonales de la glándula pituitaria, agentes hormonales de la glándula salivar, agentes hormonales de la glándula toroides, agentes hormonales de la glándula tiroides accesoria, agentes esteroides anabólicos, agentes hormonales de la glándula suprarrenal, agentes hormonales androgénicos, agentes estrógenos, agentes de progesterona, agentes hormonales mixtos, y similares);

fármacos para los órganos urogenitales y ano (por ejemplo, agentes para los órganos urinarios, agentes para los órganos genitales, uterotónicos, agentes para hemorroides, y similares);

fármacos dermatológicos (por ejemplo, desinfectantes dermatológicos, agentes protectores de heridas, agentes para enfermedades piogénicas, analgésicos, antipruríticos, astringentes, antiflogísticos, agentes para enfermedades cutáneas parasitarias, emolientes, agentes para el cabello, y similares);

agentes dentales y orales;

fármacos para otros órganos;

agentes de vitamina (por ejemplo, agentes de vitamina A, agentes de vitamina D, agentes de vitamina B, agentes de vitamina C, agentes de vitamina E, agentes de vitamina K, agentes de vitaminas mixtas, y similares);

agentes nutritivos (por ejemplo, agentes de calcio, preparaciones inorgánicas, agentes sacáridos, preparaciones proteicas de aminoácidos, preparaciones orgánicas, preparaciones infantiles, y similares);

fármacos para la sangre y fluidos corporales (por ejemplo, agentes sustitutos de la sangre, estípticos, anticoagulantes, y similares);

fármacos de diálisis (por ejemplo, agentes de diálisis renal, agentes de diálisis peritoneal, y similares);

otros fármacos metabólicos (por ejemplo, agentes para enfermedades orgánicas, antídotos, medicamentos para tratar dependencias, artrífugos, preparación enzimática, agentes diabéticos, y otros);

agentes activadores celulares (por ejemplo, preparaciones de clorofila, agentes pigmentarios, y similares);

agentes tumorales (por ejemplo, agentes de alquilación, antimetabolitos, preparaciones antibióticas antineoplásicas, preparaciones de extractos vegetales antineoplásicas, y similares);

agentes radiofarmacéuticos;

fármacos para la alergia (por ejemplo, agentes antihistamínicos, agentes para terapia de irritación, preparaciones inmunogénicas no específicas, y otros fármacos para la alergia, fármacos en bruto y fármacos basados en medicina china, fármacos en bruto, preparaciones de medicina china, y otras preparaciones basadas en fármaco en bruto y formulación de medicina china);

preparaciones antibióticas (por ejemplo, que actúan para bacterias gram-positivas, bacterias gram-negativas, micoplasmas gram-positivos, micoplasmas gram-negativos, rickettsia gram-positiva, rickettsia gram-negativa, bacterias ácido-resistentes, mohos, y similares);

agentes quimioterapéuticos (por ejemplo, fármacos sulfa, agentes antituberculosos, agentes antimicrobianos sintéticos, agentes antivirales, y similares);

preparaciones biológicas (por ejemplo, vacunas, toxoides, antitoxinas, antisueros contra leptospira, preparaciones sanguíneas, preparaciones de ensayo biológico, y otras preparaciones biológicas, y fármacos antiprotozoarios, antihelmínticos, y similares);

agentes de distribución (por ejemplo, excipientes, bases de pomada, disolventes, aromas, colorantes, y similares);

fármacos de diagnóstico (por ejemplo, medios de contraste, reactivos para el ensayo de funciones, y similares);

fármacos de desinfección (por ejemplo, conservante);

fármacos de xenodiagnóstico (por ejemplo, fármacos de examen citológico, y similares);

fármacos no clasificados no dirigidos principalmente para terapia; y

narcóticos (por ejemplo, fármacos alcaloides de opio, preparaciones alcaloides de coca, narcóticos sintéticos, y similares).

La composición farmacéutica de la presente invención puede producirse fácilmente por los especialistas en la técnica con referencia a la farmacopea japonesa, la farmacopea de Estados Unidos, farmacopeas de otros países, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª Edición, A. R. Gennaro, ed., Mack Publishing Company, 1990, o similares.

Cuando se prescribe como una composición farmacéutica, la composición puede administrarse por vía parenteral. Como alternativa, dicha composición puede administrarse por vía intravenosa o subcutánea. Cuando se administra de forma sistémica, las composiciones terapéuticas para su uso en la presente invención pueden estar en forma de solución acuosa oralmente aceptable que no contiene a pirógeno. Dicha solución acuosa farmacéuticamente aceptable puede prepararse por técnicas en la técnica si se controlan cuidadosamente el pH, la isotonicidad, la estabilidad, y similares.

En una realización preferida, el HSV de la presente invención o una composición farmacéutica que contiene el mismo puede administrarse en forma de inoculación. La composición farmacéutica que comprende el HSV atenuado de la presente invención no se limita a una forma particular de inoculación y puede usarse en cualquier forma conocida. Preferiblemente, dicha composición se inocula como una inyección de solución o suspensión acuosa a un paciente. Dicha inyección incluye solución de infusión, suplementos, y similares.

La inyección descrita anteriormente puede contener un aditivo habitualmente usado además del HSV atenuado de la presente invención. El aditivo no está particularmente limitado. Por ejemplo, la inyección puede contener opcionalmente un tensioactivo, un emulsionante, agentes de suspensión, un conservante, un agente calmante, un estabilizante, o similares como ingrediente. Ejemplos del tensioactivo incluyen Tween80, estearato de polioxilo 40, sesquioleato de sorbitán, monoestearato de glicerilo, lauromacrogol, y similares. Ejemplos del emulsionante incluyen goma arábiga, tragacanto, alginato sódico, y similares. Ejemplos de los agentes de suspensión incluyen monoestearato de aluminio, carboximetil celulosa, metil celulosa, y similares. Ejemplos del conservante incluyen fenol, nitrato fenilmercúrico, cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio, alcohol bencílico, clorobutanol, y similares. Ejemplos del agente calmante incluyen alcohol bencílico, clorobutanol, sorbitol, y similares. Ejemplos del estabilizante incluyen agentes tamponantes, tales como ácido cítrico, ácido acético, ácido tartárico, ácido succínico, y similares, propilenglicol, dietilina, sulfito, ácido ascórbico, Rongalite, y similares.

Además, pueden añadirse agua, solución salina fisiológica, dextrosa, glicerol, etanol, propilenglicol, polietilenglicol, aceite vegetal, éster orgánico tal como oleato de etilo y similares, agentes tamponantes del pH, adyuvante, activadores inmunes para potencial el efecto de HSV atenuado, y similares.

Los métodos para producir las inyecciones descritas anteriormente no están particularmente limitados. Las inyecciones pueden producirse mediante un dispositivo y método habitualmente usados. Las inyecciones preparadas pueden someterse a eliminación de bacterias por filtración, y opcionalmente a liofilización y similares. Las inyecciones se administran por vía subcutánea, intramuscular, intravenosa, intratumoral, intraperitoneal, intratraqueal, intravesical, intraintestinal, intrarrectal, intrabucal, intraocular, intraarterial, o similares mediante un método habitualmente usado o por infusión.

Las inyecciones descritas anteriormente pueden disolverse en solución inmediatamente antes de la administración. Las inyecciones pueden prepararse en forma de un sólido.

Las dosis precisas de composiciones farmacéuticas individuales que contienen el HSV atenuado de la presente invención varían dependiendo de un método de administración, diferentes entre sujetos pacientes individuales, tipos de enfermedades, el estado de los sujetos pacientes, y no se determinan necesariamente de la misma manera. Sin embargo, por ejemplo, cuando se administra a un ser humano como una inyección, la dosis de HSV atenuado es de aproximadamente 0,01 ng a 10 mg/kg en uno o varios momentos de dosificación para un adulto. Preferiblemente, la administración puede realizarse controlando al mismo tiempo el estado de un paciente si fuera necesario.

El HSV atenuado de la presente invención puede usarse junto con un profármaco de acuerdo con un método conocido. La vía de administración y dosis del profármaco se determinan de acuerdo con el método conocido. El profármaco puede usarse simultáneamente o alternativamente con el HSV atenuado de la presente invención.

El herpes virus de la presente invención también puede administrarse preferiblemente en forma de una vacuna. Vacuna significa un antígeno en cualquiera de diversas formas (por ejemplo, proteína, ADN, y similares) que se usa para prevenir (o tratar) un cierto tipo de enfermedad (por ejemplo, enfermedades contagiosas, enfermedades infecciosas, y similares). Se usan patógenos vivos atenuados (vacuna viva), patógenos inactivos (o una parte de los mismos), metabolitos de un patógeno (toxina, toxina inactivada (es decir, toxoide), o similares), vacunas de ADN, o similares dependiendo del tipo de infección, transmisión, epidemia, o similares. La vacunación desarrolla activamente inmunidad (inmunidad humoral, inmunidad mediada por células, o ambas) dentro del cuerpo de organismos (seres humanos, ganado, y vectores) y previene la infección, transmisión, epidemia, o similares de patógenos.

Las vacunas no están particularmente limitadas a ninguna forma de dosificación, y se preparan de acuerdo con métodos per se conocidos en la técnica. Las vacunas son preferiblemente vacunas vivas que contienen el recombinante génico de HSV descrito anteriormente. Además, las vacunas pueden estar en forma de una emulsión que contiene diversos adyuvantes. Los adyuvantes ayudan a sostener un alto nivel de inmunidad cuando el recombinante génico de HSV descrito anteriormente se usa en una dosis menor que cuando se usa solo. Ejemplos de los adyuvantes incluyen adyuvante de Freund (completo o incompleto), adyuvante 65 (incluyendo aceite de cacahuete, monooleato de manida y monoestearato de aluminio), e hidrato de aluminio, fosfato de aluminio o gel mineral tal como alumbre. Para vacunas para seres humanos o animales comestibles, es preferible adyuvante 65. Para vacunas para animales comerciales, es preferible gel mineral.

Además de los adyuvantes descritos anteriormente, las vacunas pueden contener al menos un aditivo para preparaciones seleccionadas entre diluyentes, químicos de aroma, conservantes, excipientes, disgregantes, lubricantes, aglutinantes, tensioactivos, plastificantes, y similares.

Las vías de administración de las vacunas no están particularmente limitadas. Sin embargo, las vacunas se administran preferiblemente por vía parenteral (por ejemplo, intravenosa, intraarterial, subcutánea, intradérmica, intramuscular o intraperitoneal).

La dosis de las vacunas puede seleccionarse dependiendo de diversas condiciones: si la administración está pretendida para prevenir o tratar enfermedades causadas por infección por HSV; si la infección es primaria o recurrente; la edad y peso, estado de los pacientes; la gravedad de la enfermedad; y similares. Cuando se pretende para tratar enfermedades causadas por infección recurrente, la dosis de las vacunas de la presente invención puede ser preferiblemente de aproximadamente 0,01 ng a 10 mg por kg de peso, más preferiblemente de aproximadamente 0,1 ng a 1 mg/kg.

La cantidad de administraciones de las vacunas varía dependiendo de las diversas condiciones descritas anteriormente, y no se determina necesariamente de la misma manera. Sin embargo, preferiblemente, las vacunas se administran repetidamente a los intervalos de días o semanas. Particularmente, la administración se realiza a un total de varias veces, o preferiblemente aproximadamente una a dos veces, a los intervalos de aproximadamente 2 a 4 semanas. La cantidad de administraciones (tiempo de administración) se determina preferiblemente por la sintomatología o un ensayo fundamental usando título de anticuerpo controlando al mismo tiempo las condiciones de las enfermedades.

La expresión "enfermedades o trastornos" como se usa en este documento se refiere a enfermedades o trastornos para las cuales son eficaces las construcciones de virus de la presente invención. Ejemplos de las enfermedades o trastornos incluyen enfermedades o trastornos relacionados con herpes virus (por ejemplo, gingivostomatitis, herpes facial, herpes labial, herpes de queratoconjuntivitis, herpes de encefalitis, herpes genital, herpes neonatal, varicela, herpes zoster, mononucleosis infecciosa, linfoma de Burkitt, cáncer rinofaríngeo, neumonía, enfermedad de inclusión citomegálica, exantema súbito, neumonía, sarcoma de Kaposi, PEL, enfermedad de Castleman), cáncer (por ejemplo, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer pancreático, cáncer de vejiga, cáncer de uretra, cáncer de colon, cáncer de piel, melanoma maligno, osteosarcoma, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, cáncer de estómago, cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de colon, linfoma, hepatoma, mesotelioma, melanoma, astrocitoma, oligodendroglioma, meningioma, neurofibroma, glioblastoma, ependimoma, schwannoma, neurofibrosarcoma, meduloblastoma, fibrosarcoma, carcinoma de células escamosas, cáncer de neuroectodermo, tirocele, tumor de glándula pituitaria, carcinoma epidermoide, y similares), otras enfermedades o trastornos (por ejemplo, enfermedades o trastornos causados por otros virus (por ejemplo, VIH, virus de la influenza, rotavirus, y similares) o bacterias (por ejemplo, *Bordetella pertussis, Corynebacterium diphtheriae, Clostridium tetani,* y similares)), procariotas (por ejemplo, gonococos, *Listeria monocytogenes,* bacilo de la disentería, y similares) y eucariotas (por ejemplo, patógenos unicelulares, parásitos multicelulares, y similares).

Por lo tanto, el virus del herpes simple de la presente invención y una composición que contiene el mismo puede usarse para prevenir o tratar el cáncer como se ha descrito anteriormente. Preferiblemente, el virus del herpes simple de la presente invención y una composición que contiene el mismo puede aplicarse a cáncer pancreático progresivo, cáncer de ovario, y similares que habitualmente aparecen con diseminación peritoneal y son difíciles de tratar por escisión quirúrgica o quimioterapia, y a tumor sólido. La presente invención puede usarse para inmunizar a un individuo contra al menos una forma de cáncer. Particularmente, la presente invención puede usarse para

inmunizar prudentemente a un individuo humano que tienen una disposición a padecer un cáncer particular o un individuo humano que ha tenido previamente cáncer y por lo tanto tiene riesgo de recidiva. El desarrollo de la genética, la tecnología y la epidemiología hace posible determinar la posibilidad y la evaluación del riesgo de la aparición de cáncer en los individuos. Con selección génica y/o un historial de salido familiar, es posible predecir la posibilidad de aparición de cualquiera de varios tipos de cánceres en los individuos.

Las composiciones farmacéuticas que contienen el HSV atenuado de la presente invención pueden prepararse combinando una cantidad eficaz del HSV atenuado con un vehículo medicinal apropiado y otros aditivos por un método usado habitualmente. "Cantidad eficaz" se refiere a la cantidad necesaria o suficiente para mostrar un efecto pretendido con pocos efectos secundarios, aunque varía dependiendo del tipo o forma de uso del mismo y no se determina necesariamente de la misma manera.

Las composiciones farmacéuticas que contienen el HSV atenuado de la presente invención pueden inocularse a pacientes en formas conocidas, preferiblemente inyecciones de solución o suspensión acuosa. Las formas de inoculación no están particularmente limitadas. Las inyecciones incluyen solución de infusión, solución de renovación nutritiva, y similares.

Las inyecciones pueden contener un aditivo usado habitualmente además del HSV atenuado de la presente invención. Ejemplos del aditivo incluyen, aunque no se limitan particularmente, tensioactivos, emulsionantes, agentes de suspensión, conservantes, agentes calmantes, estabilizantes, y similares, que se usan opcionalmente. Ejemplos de los tensioactivos incluyen Tween80, estearato de polioxilo 40, sesquioleato de sorbitán, monoestearato de glicerilo, lauromacrogol, y similares. Ejemplos de los emulsionantes incluyen goma arábiga, tragacanto, alginato sódico, y similares. Ejemplos de los agentes de suspensión incluyen monoestearato de aluminio, carboximetil celulosa, metil celulosa, y similares. Ejemplos de los conservantes incluyen fenol, nitrato fenilmercúrico, cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio, alcohol bencílico, clorobutanol, y similares. Ejemplos de los agentes calmantes incluyen alcohol bencílico, clorobutanol, sorbitol, y similares. Ejemplos de los estabilizantes incluyen agentes tamponantes (por ejemplo, ácido cítrico, ácido acético, ácido tartárico, ácido succínico, y similares), propilenglicol, dietilina, sulfito, ácido ascórbico, Rongalite, y similares.

Además, pueden añadirse agua, solución salina fisiológica, dextrosa, glicerol, etanol, propilenglicol, polietilenglicol, aceite vegetal, éster orgánico tal como oleato de etilo y similares, agentes tamponantes del pH, adyuvantes, activadores inmunes para potenciar el efecto del HSV atenuado, y similares.

Los métodos para producir las inyecciones descritas anteriormente no están particularmente limitados. Las inyecciones pueden producirse por un dispositivo y método habitualmente usados. Las inyecciones preparadas pueden someterse a eliminación de bacterias por filtración, y opcionalmente a liofilización y similares. Las inyecciones se administran por vía subcutánea, intramuscular, intravenosa, intratumoral, intraperitoneal, intratraqueal, intravesical, intraintestinal, intrarrectal, intrabucal, intraocular, intraarterial, o similares por un método usado habitualmente o por infusión.

Las inyecciones descritas anteriormente pueden disolverse en solución inmediatamente antes de la administración. Las inyecciones pueden prepararse en forma de un sólido.

Las dosis precisas de composiciones farmacéuticas individuales que contienen el HSV atenuado de la presente invención varían dependiendo de un método de administración, diferencias entre sujetos pacientes individuales, tipos de enfermedades, el estado de los sujetos pacientes, y no se determinan necesariamente de la misma manera. Sin embargo, por ejemplo, cuando se administra a un ser humano como una inyección, la dosis de HSV atenuado es de aproximadamente 0,01 ng a 10 mg/kg al día en uno o varios momentos de dosificación para un adulto. Preferiblemente, la administración puede realizarse controlando al mismo tiempo el estado de un paciente si fuera necesario.

El HSV atenuado de la presente invención puede usarse junto con un profármaco de acuerdo con un método conocido. La vía de administración y dosis del profármaco se determinan de acuerdo con el método conocido. El profármaco puede usarse simultáneamente o alternativamente con el HSV atenuado de la presente invención.

El término "profármaco" como se usa en este documento se refiere a un fármaco que es inactivo como tal y se convierte en activo cuando se cambia químicamente en el cuerpo por una enzima metabolizante del fármaco (por ejemplo, derivados de purina y pirimidina usados como agentes quimioterapéuticos para el cáncer). Ejemplos de los profármacos en este documento preferiblemente incluyen ganciclovir, aciclovir, taxol, camptotecina, derivados nucleosídicos de guanina (por ejemplo, A-5021), y similares. Un profármaco en este documento preferiblemente es un profármaco que se convierte en una forma activa por un gen suicida contenido en el HSV atenuado de la presente invención.

La expresión "gen suicida" como se usa en este documento se refiere a un gen que puede eliminar la célula en que se expresa. De forma representativa, dicho gen es un gen metabólicamente tóxico. Por ejemplo, en este documento se ejemplifica un método para introducir un gen suicida incorporado en una construcción de virus en células

tumorales para dirigirlas al suicidio. Específicamente, puede transducirse timidina quinasa en virus del herpes simple.

La expresión "capacidad de seleccionar células cancerosas" como se usa en este documento indica que la tasa de crecimiento en células cancerosas es mayor que en células normales.

El herpes virus de la presente invención puede proporcionarse junto con una proteína inmunomoduladora. La expresión "proteína inmunomoduladora" como se usa en este documento se refiere a proteínas y productos de expresión de moléculas de ácido nucleico que aceleran y/o regulan respuestas inmunes. Por lo tanto, en una realización preferida, las proteínas inmunomoduladoras pueden suministrarse como un agente inmunoterapéutico, o un ingrediente de una vacuna.

Ejemplos de las proteínas inmunomoduladoras incluyen quimioquinas, moléculas adhesivas, citoquinas, moléculas co-estimuladoras, factores de crecimiento, y moléculas receptoras. Las quimioquinas incluyen MIP-1α, MIP-1β, RANTE, IL-8 y MCP-1. Ejemplos de las moléculas adhesivas incluyen construcciones de la familia de selectina, moléculas tipo mucina, construcciones de la familia de integrina, y construcciones de la superfamilia de inmunoglobulina. Ejemplos de las construcciones de la familia de selectina incluyen L-selectina, P-selectina, y E-selectina. Las moléculas tipo mucina son ligandos para las construcciones de la familia de selectina. Ejemplos de la molécula tipo mucina incluyen CD34, GlyCAM-1, y MadCAM-1. Ejemplos de las construcciones de la familia de integrina incluyen LFA-1, VLA-1, Mac-1, y p150.95. Ejemplos de las construcciones de la superfamilia de inmunoglobulina incluyen PECAM-1, ICAM (ICAM-1, ICAM-2, y ICAM-3), CD2, y LFA-3. Ejemplos de la citoquina incluyen mutantes de M-CSF, GM-CSF, G-CSF, CSF, IL-4, e IL-18 (incluyendo deleción de los primeros aproximadamente 35 restos de aminoácido que están presentes en el precursor de una proteína pero no están presentes en la proteína en la forma madura). Ejemplos de moléculas co-estimuladoras incluyen CD40 y ligandos de CD40 (CD40L). Ejemplos de factores de crecimiento incluyen IL-7, factores de crecimiento de nervios, y un factor de crecimiento del endotelio vascular. Ejemplos de las moléculas receptoras incluyen un producto de expresión del gen letal Fas, un receptor del factor de necrosis tumoral TNF, Flt, Apo-1, p55, WSL-1, DR3, TRAMP, Apo-3, AIR, LARD, NGRF, DR4, DR5, KILLER, TRAIL-R2, TRICK2, y DR6. Las composiciones de la presente invención pueden contener caspasa (ICE).

Las proteínas inmunomoduladoras pueden suministrarse administrando las moléculas de ácido nucleico que se expresan en las proteínas inmunomoduladoras cuando se captan en las células. Las proteínas inmunomoduladoras pueden suministrarse administrando las proteínas per se. Las proteínas inmunomoduladoras pueden suministrarse administrando los ácidos nucleicos o las proteínas per se. Las proteínas inmunomoduladoras pueden suministrarse administrando los ácidos nucleicos y las proteínas per se simultáneamente.

Las proteínas inmunomoduladoras descritas anteriormente (como proteínas o moléculas de ácido nucleico que codifican las proteínas) pueden administrarse como suplemento junto con una composición o de otro modo una composición de vacuna. En este caso, la vacuna es cualquiera de una vacuna de subunidad, una vacuna inactivada, una vacuna viva atenuada, una vacuna celular, una vacuna recombinante, y una vacuna de ácido nucleico o ADN. En el caso de la vacuna viva atenuada, la vacuna celular, la vacuna recombinante, o la vacuna de ácido nucleico o ADN, las proteínas inmunomoduladoras están codificadas por las moléculas de ácido nucleico de las vacunas.

Las composiciones (por ejemplo, vacuna) se proporcionan en este documento para tratar o prevenir patógenos diferentes a herpes virus (por ejemplo, virus (por ejemplo, VIH, virus de la influenza, rotavirus, y similares), o bacterias). Dichas composiciones comprenden al menos un gen del patógeno que se incluye en un herpes virus atenuado como un gen exógeno. El gen exógeno preferiblemente es de longitud completa pero puede ser una secuencia parcial siempre que contenga al menos un epítopo capaz de desencadenar la inmunidad. El término "epítopo" como se usa en este documento se refiere a un determinante antigénico cuya estructura se ha revelado. Un método para determinar un epítopo es conocido en la técnica. Una vez proporcionada la secuencia primaria de ácido nucleico o de aminoácidos de una proteína, dichos epítopos pueden determinarse por dicha técnica rutinaria conocida. Un epítopo útil puede tener al menos una longitud de tres aminoácidos, preferiblemente, al menos 4 aminoácidos, 5 aminoácidos, 6 aminoácidos, 7 aminoácidos, 8 aminoácidos, 9 aminoácidos, 10 aminoácidos, 15 aminoácidos, 20 aminoácidos, o 25 aminoácidos.

Ejemplos de dicho gen exógeno incluyen, aunque sin limitación, proteínas de matriz gp120, gp41 y gp17, proteína de cápsida p24, transcriptasa inversa (VIH pol), tat rev, y similares en el caso de VIH; VP4, VP6 y VP7 y similares en el caso de rotavirus, y HA, NA y NP y similares en el caso de virus de la influenza.

Las proteínas inmunomoduladoras son útiles para inducir y acelerar respuesta citotóxicas de linfocitos T (CTL) y/o respuestas de anticuerpos, y/o respuestas de crecimiento de linfocitos T.

Las proteínas inmunomoduladoras que inducen y aceleran respuestas CTL son particularmente útiles cuando se administran junto con o como parte de vacunas contra patógenos dentro de las células, enfermedades autoinmunes, o cánceres. Las proteínas inmunomoduladora que inducen y aceleran respuestas CTL son particularmente útiles cuando se administran junto con vacunas vivas atenuadas, vacunas celulares, vacunas recombinantes, y vacunas

de ácido nucleico o ADN. Como alternativa, las proteínas inmunomoduladora que inducen y aceleran respuestas CTL son útiles como agente inmunoterapéutico que se administra para pacientes con cáncer o infección intracelular. Las proteínas inmunomoduladoras que inducen y aceleran respuestas CTL son útiles cuando se administran a pacientes inmunocomprometidos.

Los sujetos hospedadores de las enfermedades pueden ser en este documento cualquier animal al que pueda inyectarse herpes virus. Ejemplos de dichos animales incluyen primates (por ejemplo, monos y seres humanos), ganado bovino (por ejemplo, ganado bovino para carne y ganado bovino para leche), caballos, cerdos, gatos, perros, pollos, y similares. Los hospedadores son preferiblemente primates, y más preferiblemente seres humanos.

La edad de los sujetos hospedadores puede ser en este documento cualquier edad a la que los sujetos hospedadores pueden infectarse con herpes virus. Por ejemplo, los sujetos hospedadores incluyen los ancianos, adultos, niños, bebés, fetos, y similares.

Un HSV atenuado de la presente invención es el clon 10 (MNO10) que es uno de los clones recogidos de la cepa HF. Este clon tiene el genoma de herpes virus en que están delecionadas 3832 pb en las posiciones 116515 a 120346, y 136 aminoácidos en el lado N terminal de un total de 197 aminoácidos de UL56, y su región cadena arriba están delecionados. MNO10 se conserva y distribuye por el Laboratory of Virology, Research Institute for Disease Mechanism and Control, Nagoya University School of Medicine de acuerdo con los requisitos según la ley de patentes japonesa y está fácilmente disponible.

El HSV atenuado de la presente invención puede prepararse usando HSV-1 o como alternativa HSV-2.

El HSV atenuado de la presente invención puede multiplicarse favorablemente en células cancerosas. Además, puede expresarse de forma eficaz un gen suicida en células cancerosas abordadas, lo que conduce potencialmente a una función anticancerosa eficaz.

El virus del herpes simple atenuado de la presente invención puede combinarse con un profármaco que se convierte en una forma activa por el herpes virus, o se usa solo sin dicha combinación, para tratar el cáncer.

El HSV atenuado puede contener el gen de timidina quinasa. En este caso, si se administra ganciclovir que es un profármaco, el ganciclovir se convierte en una forma activa por la fosforilación por timidina quinasa, inhibiendo de ese modo la ADN polimerasa en células cancerosas. Además, el HSV atenuado se capta en el ADN, inhibiendo de este modo el metabolismo de ADN y de desoxirribonucleótidos y la síntesis de ARN independiente de ADN. Un gen que tiene dicha función se llama gen suicida. Puede incorporarse de forma expresable un gen suicida exógeno además del gen de la timidina quinasa descrito anteriormente.

El gen suicida exógeno descrito anteriormente es, aunque sin limitarse particularmente, cualquier gen que pueda convertir un profármaco en una forma activa. Ejemplos del gen suicida exógeno incluyen un gen de citosina desaminasa, el gen gpt de E. coli, el gen deoD de E. coli, un gen de carboxiesterasa, y similares.

Se describe en este documento un método mejorado para inmunizar a un individuo que comprende la etapa de suministrar una construcción génica a células del individuo como parte de una composición de vacuna (incluyendo vacunas de ADN, vacunas vivas atenuadas, y vacunas recombinantes). La construcción génica comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína inmunomoduladora y está unida de forma funcional a una secuencia de control que puede funcionar en la vacuna para conseguir la expresión de la construcción génica. La vacuna mejorada causa una respuesta inmune mediada por células potenciada.

El HSV atenuado de la presente invención puede contener el gen de la timidina quinasa. En este caso, si se administra ganciclovir que es un profármaco, el ganciclovir se convierte en una forma activa por fosforilación por timidina quinasa, inhibiendo de ese modo la ADN polimerasa en células cancerosas. Además, el HSV atenuado se capta en el ADN, inhibiendo de ese modo el metabolismo de ADN y de desoxirribonucleótidos y la síntesis de ARN independiente de ADN. Un gen que tiene dicha función se llama gen suicida. Puede incorporarse de forma expresable un gen suicida exógeno además del gen de la timidina quinasa descrito anteriormente.

El gen suicida exógeno descrito anteriormente es, aunque sin limitarse particularmente, cualquier gen que pueda convertir un profármaco en una forma activa. Ejemplos del gen suicida exógeno incluyen un gen de citosina desaminasa, el gen gpt de E. coli, el gen deoD de E. coli, un gen de carboxiesterasa, y similares.

(Ejemplos)

A partir de ahora en este documento, la presente invención se describirá mediante ejemplos. Los siguientes ejemplos se proporcionan solamente con fines de ilustración. Por lo tanto, la presente invención no está limitada a los ejemplos. El alcance de la presente invención está limitada solamente por las reivindicaciones adjuntas. Debe apreciarse que % indica % en peso salvo que se mencione de otro modo.

(Ejemplo 1: Preparación de HSV atenuado (HSV con UL39-inactivado)) (para referencia solamente)

Se incorporó un fragmento de ADN de HSV-1 que contenía el gen UL39 en el plásmido pBluescript (fabricado por Stratagene) para clonación, para preparar ADN que tenía un casete lacZ interrumpiendo la fase de lectura abierta del gen UL39. En este caso, el casete lacZ es un fragmento de ADN que contiene un promotor para el UL39 de HSV en el extremo 5' del mismo y el gen lacZ de E. coli y la señal de poliadenilación de SV40 cadena abajo del promotor. Se preparó ADN de HSV infeccioso a partir de células infectadas con HSV. Las células se transfectaron con este ADN. Después de tres días, los virus producidos se recogieron. Se recogió una placa que se había teñido de azul en presencia de X-gal. Se realizaron clonaciones en placa adicionales tres veces. Los virus resultantes se multiplicaron en células Vero y después se almacenaron. El mutante obtenido de este modo se sometió a transferencia de Southern, PCR, transferencia de Western, y similares, de modo que se confirmó que UL39 estaba inactivado.

(Ejemplo 2: Preparación de HSV atenuado (Hh) en que los genes UL39 y UL56 no implicados en el metabolismo de ADN y desoxirribonucleótidos están inactivados) (para referencia solamente)

Se proporciona una cepa HF derivada de HSV-1 en que está defectuosa una región que contiene el gen UL56 (proporcionada amablemente por el Dr. Shin Isomura, Department of Pediatrics, Nagoya University School of Medicine). La patogenicidad de esta cepa es significativamente baja cuando se inocula por vía intraperitoneal en un ratón en comparación con un tipo silvestre de la cepa. Además, la cepa causa fusión celular con células infectadas. Se infectaron células Vero con el virus UL39-deficiente descrito anteriormente y la cepa HF. Entre los virus descendientes, se recogieron virus que causan fusión celular y producen placas azules en presencia de X-gal. Después de clonar lo virus, se confirmó por PCR y transferencia de Western que UL39 y UL56 estaban defectuosos en los virus.

(Ejemplo 3: Preparación de cepa en que se incorpora carboxiesterasa en HSV con UL39-inactivado) (para referencia solamente)

Se insertó un gen de carboxiesterasa humana que tiene un promotor para el gen temprano inmediato de citomegalovirus humano en un gen lacZ (fase de lectura abierta) de modo que se preparó el ADN en que el gen lacZ estaba interrumpido por el gen de carboxiesterasa humana. Se transfectaron células Vero con este ADN y ADN infeccioso derivado del virus con UL39-inactivado que tiene lacZ. Se recogieron los virus producidos. Se recogieron virus que producían placas incoloras en presencia de X-gal, seguido de clonación en placa. Los virus resultantes se almacenaron como una reserva primaria. Se infectaron muestras celulares con clones obtenidos como reserva primaria. Las muestras celulares se sometieron a una técnica de anticuerpos fluorescentes usando anticuerpos marcados. Para los clones positivos, se preparó una reserva secundaria. Los clones obtenidos finalmente se confirmaron para la inducción de actividad carboxiesterasa en células infectadas.

(Ejemplo 4: Aislamiento de HSV-1 con UL56-inactivado)

Se aisló virus HSV-1 en que está defectuosa una región que incluye el gen UL56 de la cepa HF. Este HSV-1, clon 10 derivado de HF (MNO10: conservado en el Laboratory of Virology, Research Institute for Disease Mechanism and Control, Nagoya University School of Medicine) se sometió a PCR, determinación de secuencia de bases, y análisis de transferencia de Western para confirmar que el gen UL56 está defectuoso.

(Ejemplo 5: Preparación de HSV atenuado (HR522) capaz de formar una célula polinuclear gigante)

Se infectaron células Vero (RIKEN Cell Bank, Tsukuba Science CIty, 305 Ibaraki, Japón) con el HSV con UL39-atenuado preparado en el Ejemplo 1 y el clon 10 derivado de HF de HSV-1 aislado en el Ejemplo 4 en que la región que incluye el gen UL56 está defectuosa. Después de ello, se seleccionó un clon que era capaz tanto de producir una placa azul en presencia de X-gal (marcador para HSV con UL39-atenuado) como de producir una célula polinuclear gigante (marcador para HF MNO10). Para la confirmación, dicho clon se separó mediante el fenotipo del mismo. Aquellos que expresan LacZ (es decir, RR-), y que tienen una característica de producir célula gigante multinucleada en las células infectadas. El clon obtenido de esta infección mixta se denominó HR522.

(Ejemplo 6: Tratamiento de cáncer usando HSV atenuado)

Se trasplantó SW1990 derivado de cáncer de ovario humano en grupos de ratones desnudos (hembra, 6 semanas de edad, cada grupo incluye 10 ratones) por inyección intraperitoneal de $1x10^7$ células/ratón en las cercanías del páncreas con anestesia por éter. Después del trasplante, se inyectaron por vía intraperitoneal $1x10^7$ PFU/ratón del HSV con UL39-inactivado o HR522 en dos grupos en el día 7 y día 12. Después de la inoculación del HSV con UL39-inactivado o HR522, se administró ganciclovir de 0,4 mg/ratón a uno de cada grupo de inoculación de HSV con UL39-inactivado y HR522 en el día 10 (es decir, día 17 y 22 después del trasplante). Se observó la tasa de supervivencia de cada grupo hasta el día 60 después del trasplante. Los resultados se muestran en la Figura **1**.

Como puede observarse a partir del resultado de la Figura **1**, se reveló que el tiempo de supervivencia de los ratones desnudos se alargaba por la inoculación del HSV con UL39-inactivado o HR522. Además, también se reveló

que la administración de ganciclovir alarga adicionalmente el tiempo de supervivencia. Particularmente, el grupo al que se dio una combinación de la inoculación de HR522 y la administración de ganciclovir tuvo una alta tasa de supervivencia.

(Ejemplo 7: Comparación de HSV atenuado con agentes antineoplásicos conocidos)

Se trasplantó SW1990 derivado de cáncer de ovario humano en grupos de ratones desnudos (hembra, 6 semanas de edad, cada grupo incluye 10 ratones) por inyección intraperitoneal de $1x10^7$ células/ratón en las cercanías del páncreas con anestesia por éter. Después del trasplante, se inyectaron por vía intraperitoneal $5x10^7$ PFU/ratón del HSV con UL39-inactivado o HR522, o taxol (agente antineoplásico conocido) de 0,4 mg/ratón en el grupo respectivo en el día 7 y día 12. Se observó la tasa de supervivencia de cada grupo hasta el día 60 después del trasplante. Los resultados se muestran en la Figura **2**.

Como puede observarse a partir de los resultados mostrados en la Figura **2**, se reveló que los grupos a los que se había inoculado el HSV con UL39-inactivado o HR522 tienen un tiempo de supervivencia más largo que el del grupo al que se administró taxol.

(Ejemplo 8: Preparación de virus US3-deficiente) (ratones y virus) (para referencia solamente)

Se adquirieron ratones BALB/c hembra, de 8 a 10 semanas de edad al inicio del tratamiento, de Japan SLC (Hamamatsu, Japón). Todos los ratones se enjaularon y mantuvieron de acuerdo con las directrices recomendadas por las instituciones. Se preparó un recombinante génico de la cepa 186 de HSV-2 que no tiene US3 (a partir de ahora en este documento mencionada como L1BR1) por un método descrito en "Daikoku, T., Yamashita, Y., Tsurumi, T., Maeno, K., y Nishiyama, Y. (1993), Virology 197, 685-694". Como ejemplo comparativo, se usaron la cepa 186 de HSV-2 de tipo silvestre (a partir de ahora en este documento simplemente mencionada como 186 de tipo silvestre) y la cepa YY2 que es un mutante US2-deficiente. Estos tres virus se cultivaron en células Vero y después se almacenaron a -80ºC hasta su uso. Se midieron los títulos de infección viral usando las células Vero y se representaron como unidad formadora de placas (PFU)/ml.

(Método de infección con HSV)

Se inoculó a los ratones por vía intravaginal con los virus mediante un método descrito en "Parr, M. B., Kepple, L., McDermott, M. R., Drew, M. D., Bozzola, J. J., y Parr, E. R. (1994) Lab. Invest. 70, 369-380", y "Milligan, G. N., y Bernstein, D. I. (1997), Virol. 229, 259-268". Para sincronizar el ciclo estral en la fase dominada por progesterona antes de la inoculación viral, se inyectó a los ratones por vía subcutánea 0,1 μg/ratón de 17-cipionato de β-estradiol (a partir de ahora en este documento abreviado como E) (Sigma, St. Louis, MO) con un tratamiento de 2 mg/ratón of Depo-Provera (a partir de ahora en este documento abreviado como DP) (Sigma). Cinco días después de la administración de DP, los ratones se fritaron con gasa impregnada en pentobarbital sódico para anestesiar a los ratones. Los ratones se infectaron por vía intravaginal con 20 μl de una suspensión de 186 de tipo silvestre, YY2 de tipo silvestre, o L1BR1.

(Titulación viral)

Se colocó PBS (solución salina tamponada con fosfato) en la vagina usando una pipeta para causar devastación vaginal. Después de ello, la vagina se almacenó a -80ºC de acuerdo con un método descrito en "Milligan, G. N., y Bernstein, D. I. (1997), Virol. 229, 259-268", hasta la medición del título de infección por formación de placas en una capa monomolecular de células Vero.

(Preparación de células en la vagina)

Se obtuvieron células mononucleares (MNC) y células epiteliales (EC) derivadas de la vagina de acuerdo con un método descrito en "Inagaki-Ohara, K., Nishimura, H., Sakai, T., Lynch, D. H., y Yoshikai, Y. (1997) Lab. Invest. 77, 421-429" que está modificado a partir de "Rakasz, E., Hagen M., Sandor, M., y Lynch, R. G. (1997), Int. immunol. 9, 161-167". En resumen, los ratones se anestesiaron de forma letal y después de ello se escindieron las vaginas de los ratones. Las vaginas se cortaron en secciones de 2 mm de tamaño, seguido de incubación en solución salina equilibrada de Hank que contenía 4 U/ml de DNasa I a 37ºC durante 60 minutos. Después de agitar, las suspensiones celulares se pasaron a través de columnas de lana de nylon para retirar las secciones tisulares necrotizadas, de modo que se obtuvieron suspensiones de células individuales. Las células pasadas se centrifugaron a través de un gradiente discontinuo del 40%/75% o 25%/40% de PercolI (Pharmacia, Uppsala, Suecia) a una fuerza centrífuga de 600 xg a 20ºC durante 20 minutos. Se recogieron las MNC y EC de las superficies de contacto del 40%/75% y el 25%/40%, respectivamente. Las células aisladas de cinco ratones en cada día durante el curso de tiempo después de la infección con HSV se combinaron para los siguientes experimentos.

(Citometría de flujo)

Las células se tiñeron por un método descrito en "Inagaki-Ohara, K., Kobayashi, N., Nishimura, H., Sakai, T., Matsumoto, Y., Hiromatsu, K., Awaya, A., y Yoshikai, Y. (1996), Cell immunol. 171, 30-40". Se adquirieron anticuerpos monoclonales (mAb) usados en la presente invención de PharMingen (San Diego, CA): mAb anti-CD3 conjugado con FITC (145-2 Cell), mAb anti-CD11b (M1/70), mAb anti-CD40 (3/23), mAb anti-IAd (AMS-32.1), mAb anti-CD4 conjugado con PE (RM4-5), anti-CD45/B220 (RA3-6B2), mAb anti-CD40L (MR1), mAb anti-CD8α conjugado con biotina (53-6.7). Las células teñidas se analizaron en un citómetro de flujo EPICS XL (COULTAR, Miami, FL).

(Análisis histológico)

Los ratones se anestesiaron de forma letal y después se fijaron en PBS (solución salina tamponada con fosfato) que contiene formaldehído al 4%. La pared vaginal, el útero y el recto se cortaron de forma sagital en bloques y se incrustaron en parafina. Después de ello, las secciones de parafina cortadas a 3 μm de grosor se examinaron histológicamente tiñendo con hematoxilina-eosina. Además, las secciones de parafina se analizaron inmunohistoquímicamente usando un antisuero de conejo anti-HSV-2 de acuerdo con un método descrito en "Kurachi, R., Daikoku, T., Tsurumi, T., Maeno, K., Nishiyama, Y., Kurata, T. (1993), Arch Virol. 133, 259-273". En resumen, las secciones se desparafinizaron y después se trataron con PBS que contenía cloruro de calcio al 0,02%(v/v) y tripsina al 0,25%(v/v) (Difco, Detroit, MI) a 37ºC durante 30 minutos, y después se sumergieron en solución de metanol y peróxido de hidrógeno al 0,3% en volumen durante 30 minutos. Las secciones se hicieron reaccionar con antisuero anti-HSV-2 a 4ºC durante una noche. Se añadió anticuerpo biotinilado anti-IgG de conejo (DAKO Japan, Tokio, Japón) a las secciones, y se las dejó reaccionar a 37ºC durante 30 minutos. Después de ello, se añadió estreptavidina conjugada con peroxidasa (DAKO Japan) y después se dejó reaccionar a 37ºC durante 30 minutos. La reacción de peroxidasa se realizó en tampón Tris 0,05 M (pH 7,6) que contenía diaminobencidina al 0,02% (Chemical Dojin Inc., Kumamoto, Japón) y peróxido de hidrógeno al 0,015%. Los núcleos celulares se tiñeron con contraste con metilgreen al 2% (Chrome, Stuttgart, Alemania).

(Medición de citoquina en lavados vaginales por ELISA)

Se recogieron lavados vaginales diariamente después de la infección. Se analizó el contenido de citoquinas en los lavados vaginales usando IFN-γ, IL-4 (BioSourceInternational, Inc., Camarillo, Canadá) e IL-12 de ratón con un kit de medición usando ELISA (Amersham LIFE SCIENCE, Buckinghamshire, Inglaterra) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

(Análisis estadístico)

Se usó el ensayo t para determinar diferencias significativas. Un valor p de menos de 0,05 se considera significativo.

(Lesiones de órganos genitales y mortalidad inducida por 186 de tipo silvestre, YY2 (cepa 186 US2-deficiente) o L1BR1 (cepa 186 US3-deficiente))

Para determinar los efectos de la deleción de US2 y US3 sobre la patogenicidad, los ratones se infectaron por vía intravaginal con $2x10^4$ PFU de YY2 o L1BR1. La Figura **3** muestra el aspecto representativo de los ratones después de la infección vaginal. El órgano genital infectado con YY2 empezó a hincharse significativamente en el día 5 después de la inoculación (post inoculación; p.i.) así como los ratones infectados con 186 de tipo silvestre. Para los ratones infectados con L1BR1, no se observó sustancialmente ningún síntoma de inflamación vaginal. La tasa de supervivencia se mostró en la Figura **4**. Todos los ratones infectados con 186 de tipo silvestre o YY2 murieron en 10 días después de la inoculación intravaginal. En contraste, todos los ratones infectados con L1BR1 sobrevivieron tanto como tres semanas después de la inoculación.

(Eliminación de virus en la vagina)

Para comparar las tasas de eliminación viral en la mucosa vaginal, los ratones se infectaron por vía intravaginal con 186 de tipo silvestre, YY2, o L1BR1 y después de ello se midieron los títulos virales (Figura **5**). Los títulos virales de los ratones aumentaron rápidamente y alcanzaron los niveles máximos en un día post-infección (p. i.). Los títulos de los ratones infectados con YY2 y L1BR1 disminuyeron gradualmente hasta el día 5, mientras que los títulos de los ratones infectados con L1BR1 disminuyeron abruptamente después del día 5. Los títulos de los ratones infectados con 186 de tipo silvestre se mantuvieron hasta el día 3 y después de ello disminuyeron lentamente.

(Cambios histopatológicos de la vagina)

Se examinaron los cambios patológicos de la vagina y el útero en ratones sacrificados a 1, 3, 5 y 7 días post-infección (p.i.). Para todos los ratones, se observó infección viral en células escamosas en el tejido epitelial en el día 1 (Figuras 6A, 6B y 6C). Por análisis histológico, se observaron células gigantes multinucleadas e inclusiones intranucleares en células escamosas, y también se detectaron antígenos HSV-2 en estas células (Figuras 6D, 6E y

6F). Hasta el día 3, no se observaron cambios significativos en las lesiones. En este ejemplo, la infección viral se extendió hasta las células escamosas en el tejido epitelial de la vulva y la piel, y alcanzó el plexo nervioso en el subepitelio de los ratones infectados con 186 de tipo silvestre e YY2. Sin embargo, dicha propagación viral no se observó en los ratones infectados con L1BR1. En su lugar, se observó infiltración sub-epitelial de células mononucleares en el día 5 post inoculación (p.i.) (Figuras 6G, 6H y 6I).

(Reacción de células en la vagina)

A continuación, se midió la cantidad de células mononucleares (MNC) aisladas de la vagina. Como se muestra en la Figura 7A, la cantidad de MNC en los ratones infectados con L1BR1 aumentó hasta el día 5 y después de ello disminuyó rápidamente. Sin embargo, para los ratones infectados con 186 de tipo silvestre o YY2, las cantidades de MNC aumentaron en el día 1 pero después de ello no aumentaron. En el día 3 post inoculación (p.i.), se observó una lenta disminución. Dicha cinética de reacción específica está muy relacionada con los cambios histológicos en la pared vaginal. Como puede observarse a partir de estos resultados, un retardo en la eliminación de los virus en los ratones infectados con 186 de tipo silvestre o YY2 condujo a una elevada tasa de letalidad.

(Medición del nivel de expresión del antígeno Fas)

Como se muestra en la Figura 7B, la cantidad de células Fas^+ fue mayor en los ratones infectados con L1BR1 que los ratones infectados con 186 de tipo silvestre o YY2 hasta el día 5. La mayoría de las células Fas^+ fueron positivas para antígeno MHC clase II $I\text{-}A^d$ (datos no mostrados). De acuerdo con eso, se descubrió que la cantidad de EC vaginales Fas^+ era significativamente mayor en los ratones infectados con L1BR1 que en los ratones infectados con 186 de tipo silvestre o YY2 en la fase temprana de la infección.

(Medición de la cinética de reacción de aparición de APC y células T en la vagina)

Como puede observarse a partir de la Figura 8, se usaron CD40 y CD11b como marcadores representativos para DC y Mϕ, respectivamente. La cantidad de células $CD40^+$ aumentó rápidamente en los ratones infectados con L1BR1, y fue coherentemente mayor que en los ratones infectados con 186 de tipo silvestre o YY2 en todo el experimento. En el día 3, la cantidad de células $CD11b^+$ aumentó sólo ligeramente. Sin embargo, en el día 5, se observó un aumento significativo en los ratones infectados con L1BR1. Respecto a las células T, las cantidades de células T $CD4^+$, $CD8^+$, $CD40L^+$ y Fas^+ alcanzaron los respectivos niveles máximos en el día 5 y después de ello disminuyeron. CD40L así como Fas se expresaron en células T activadas. Las cantidades de células Fas^+ y $CD40L^+$ fueron mucho mayores en los ratones infectados con L1BR1 que en los ratones infectados con 186 de tipo silvestre o YY2. Las cantidades alcanzaron los respectivos niveles máximos en el día 5. Estos resultados indican que la inducción/activación de APC vaginales y células T en los ratones infectados con L1BR1 es más rápida y de mayor magnitud que en los ratones infectados con 186 de tipo silvestre o YY2.

(Secreción de citoquinas en lavados vaginales)

Se requiere producción de citoquinas para proteger a los hospedadores de patógenos virales. Se examinó el nivel de producción de citoquinas en el día 2 por ELISA. Como resultado, se detectó un aumento en la producción de IL-12. En el día 2 y 4, la producción de IL-12 fue significativamente mayor en los ratones infectados con L1BR1 que en los ratones infectados con 186 de tipo silvestre o YY2 (Figura 9). IFN-γ e IL-4 son citoquinas representativas de Th1 y Th2, respectivamente. El patrón de producción de IFN-γ fue significativamente mayor en los ratones infectados con L1BR1 que en los ratones infectados con la cepa 186 de tipo silvestre en el día 4. El nivel de producción de IL-4 tendió a ser inferior en los ratones infectados con L1BR1 que en los ratones infectados con la cepa 186 de tipo silvestre. Los patrones y niveles de producción de ambas citoquinas en los ratones infectados con YY2 fueron similar a los de los ratones infectados con 186 de tipo silvestre. Estos resultados indican que se inducía producción de citoquinas desviada hacia Th1 en los ratones infectados con L1BR1.

El recombinante génico de HSV US3-deficiente contenido en las vacunas de la presente invención estaba considerablemente atenuado. Por lo tanto, cuando se inocula el recombinante génico de HSV US3-deficiente en un organismo, el organismo muestra ninguno o sustancialmente ningún síntoma de la infección. No obstante, el recombinante génico de HSV US3-deficiente puede activar la función inmune de pacientes infectados contra infección por HSV. Por lo tanto, la gravedad y/o tasa de infección de la infección por HSV pueden reducirse, de modo que las enfermedades causadas por infección por HSV pueden prevenirse y/o tratarse. Como el gen US3 no es necesariamente esencial para la replicación del virus, el recombinante génico de HSV US3-deficiente puede multiplicarse dentro del cuerpo de un organismo en el cual se ha inoculado el recombinante génico, de modo que pueda mantenerse la actividad inmune contra infección por HSV durante un largo tiempo.

(Ejemplo 9: Comparación de HF (MNO10) con la función antitumoral de HSV con UL39-inactivado)

Se trasplantó la cepa de células tumorales NfSaY83 derivada de ratón C3H en grupos de ratones CH3 (6 semanas de edad, cada grupo incluye 10 ratones) por inyección intraperitoneal de $1x10^7$ células/ratón con anestesia con éter. Después del trasplante, se inyectaron por vía intraperitoneal $1x10^7$ PFU/ratón de virus con UL39-inactivado o clon 10

de la cepa HF (virus UL56-deficiente) en los respectivos grupos en el día 7. Se realizó una segunda inyección para el grupo al que se había administrado el virus con UL39-inactivado, en el día 12 después del trasplante. Se comparó el tiempo de supervivencia. Se inocularon solamente células cancerosas a los ratones como control. Los resultados se muestran en la Figura 11.

Los resultados de la Figura 11 indican claramente que todos los grupos mostraban una tasa de supervivencia del 100% hasta el día 13, después de ello el tiempo de supervivencia se ampliaba más cuando se inoculaba el clon 10 de la cepa HF una vez que cuando el virus con UL39-inactivado se inoculaba dos veces.

(Ejemplo 10: Efecto de la administración consecutiva de HF (MNO10))

Se trasplantó la cepa de células tumorales NfSaY83 derivada de ratón C3H en grupos de ratones CH3 (6 semanas de edad, cada grupo incluye 10 ratones) por inyección intraperitoneal de $5x10^6$ células/ratón con anestesia con éter. Después del trasplante, se inyectaron por vía intraperitoneal $1x10^7$ PFU/ratón de HF (virus UL56-deficiente) en un grupo en tres días consecutivos, es decir, día 7, 8 y 9. Se comparó el tiempo de supervivencia. Se inocularon solamente células cancerosas a los ratones como control. Los resultados se muestran en la Figura 12.

Los resultados de la Figura 12 indican que todos los grupos mostraron una tasa de supervivencia del 100% hasta el día 17 y después de ello, el tiempo de supervivencia se prolongó más por administración consecutiva del virus.

(Ejemplo 11)

Se disolvieron $1x10^7$ PFU del HSV atenuado de la presente invención (MNO10), 1,8 g de glucosa, y 0,06 g de citrato sódico en 80 ml de agua para inyección. La solución se ajustó a pH 6,3 añadiendo hidrato de sodio, y hasta un volumen total de 100 ml añadiendo agua para inyección. Después de ello, la solución resultante se sometió a filtración, y después se cargaron 500 ml de la misma en un recipiente de plástico permeable a gases (hecho de PP). Este recipiente se sometió a esterilización por vapor a alta presión a 116ºC durante 14 minutos. Después de ello, el recipiente se envolvió con un material de envoltura secundario (película de deposición de alúmina), seguido de envasado al vacío o llenado con gas nitrógeno, obtenido de ese modo una inyección.

Cuando se usa el HSV atenuado de la presente invención en que UL56 está inactivado, una única administración puede prolongar la vida más que cuando se administra consecutivamente el virus con UL39-inactivado, es decir, la cepa atenuada de HSV.

Además, si se administra consecutivamente el HSV atenuado de la presente invención, puede obtenerse un nivel mayor del efecto de prolongación de la vida. Por lo tanto, se demostró que el HSV atenuado de la presente invención es útil para composiciones farmacéuticas para tratar tumor maligno.

(Ejemplo 12: Acción antitumoral de virus HSV-2 US3-deficiente y HSV con US3 y UL56-inactivado (HL)) (para referencia solamente)

A continuación, se examinaron el virus HSV-2 US3-deficiente y el HSV con US y UL56-inactivado (HL) para sus funciones antitumorales.

(Virus usados)

Se usaron los siguientes virus en el Ejemplo 9. La estructura de los virus se muestra en la Figura **13**.

1) HSV-2 US3Δ (L1BR1)

Virus mutado derivado de HSV-2 de tipo silvestre (cepa 186), en que el gen US3 estaba inactivado por inserción de un casete lacZ. Este virus se preparó como se ha descrito en el Ejemplo 4.

2) HSV HL

Virus recombinante de HSV-1 HF y HSV-2 US3Δ. La región L del mismo deriva principalmente de HSV-1 HF, y la región S del mismo deriva de HSV-2. Este virus recombinante se prepara por infección mixta con los dos virus descritos anteriormente, formando fusión celular, y separando los virus que forman una placa azul en presencia de X-gal. Después de ello, la estructura del gen se confirmó por PCR. El virus HL carece de los genes US3 y UL56.

3) HSV-1 HSV con UL39-inactivado

Los virus usados en los ejemplos descritos anteriormente se usaron como controles.

(Ratones)

Se trasplantó la cepa de células tumorales NfSaK derivada de ratón C3H en grupos de ratones CH3 (6 semanas de edad, cada grupo incluye 10 ratones) por inyección intraperitoneal de $1x10^7$ células/ratón en sus espaldas y cuellos con anestesia con éter. En el día 7 después del trasplante, se inyectaron $1x10^7$ PFU/ratón de HSV-2 US3Δ, o PBS (control), en los ratones en que se habían inyectado células tumorales en las espaldas de los mismos, mientras que se inyectaron $1x10^7$ PFU/ratón de HL y HrR3, o PBS (control), en los ratones en que se habían inyectado células tumorales en los cuellos de los mismos. Se comparó el tiempo de supervivencia. Los resultados se muestran en la siguiente Tabla y las Figuras 14 y 15.

Tabla Acción de HSV-2 US3Δ sobre tumor sólido de melanoma (espalda)

(Cantidad de ratones supervivientes (tasa)) Control (inoculación con PBS)	
Día 1-16	5/5 (100%)
Día 17	4/5
Día 24	2/5
Día 25	1/5
Día 37	0/5 (0%)

Grupo inoculado con HSV-2 US3Δ	
Día 1-26	5/5 (100%)
Día 27	4/5
Día 32	3/5
Día 42	2/5
Día 60	2/5 (40%)

Acción de HSV sobre tumor sólido NfSak (cuello)

(Cantidad de ratones supervivientes (tasa)) Control (inoculación con PBS)	
Día 1-22	5/5 (100%)
Día 23	4/5
Día 25	3/5
Día 30	2/5
Día 31	0/5 (0%)

Grupo inoculado con HL	
Día 1-27	7/7 (100%)
Día 28	6/7
Día 30	5/7
Día 32	4/7
Día 60	4/7 (57%)

Grupo inoculado con HSV-1 HSV con UL39-inactivado	
Día 1-23	7/7 (100%)
Día 24	6/7
Día 25	5/7
Día 34	4/7
Día 35	3/7
Día 36	2/7
Día 60	2/7 (28%)

Se demostró que cuando se usa el HSV atenuado de la presente invención en que US3 está inactivado, una única administración puede prolongar la vida.

(Ejemplo 13: Efecto antitumoral de Hh) (para referencia solamente)

A continuación, se demostró el efecto antitumoral del HSV con UL39 y UL56-inactivado (Hh).

Se usaron ratones BALB/c (6 semanas de edad, cada grupo incluye 6 a 7 ratones) como sujetos animales. Se inoculó por vía intraperitoneal cáncer Colon26 (Dr. Shuji Hayashi, Department of Surgery, Nagoya University School of Medicine; una cepa celular derivada de cáncer de intestino grueso de ratones BALB/c) a $5x10^6$ células/ratón. Se usó HSV-1 Hh preparado en el Ejemplo 2 como el virus de control en inoculación con PBS.

(Modo 1)

Después de la inoculación de las células tumorales, se inocularon por vía intraperitoneal $1x10^7$ PFU de virus Hh en el día 7 y se comparó su curva de supervivencia con los controles (inoculación con PBS). Los resultados se muestran a continuación.

Tabla: Efecto antitumoral de Hh

Días después de la inoculación antitumoral	Día 15	Día 30	Día 45	Día 60	Día 75
Grupo de inoculación de Hh	6/6	5/6	4/6	4/6	4/6
Grupo de control	6/6	5/6	4/6	2/6	2/6

(Modo 2)

Después de la inoculación de las células tumorales, se inocularon consecutivamente $1x10^7$ PFU de virus Hh en el día 8, 9 y 10 y se comparó su curva de supervivencia con los controles. Los resultados se muestran a continuación.

Tabla 2: Efecto de tres administraciones consecutivas

Días después de la inoculación antitumoral	Día 30	Día 45	Día 60
Grupo de inoculación de Hh	7/7	7/7	7/7
Grupo de control	5/7	4/7	2/7

Como se ha descrito anteriormente, Hh mostró un efecto antitumoral significativo en comparación con el grupo de control. Particularmente, Hh que tiene una seguridad significativamente mejorada condujo al 100% de supervivencia cuando se administró tres veces consecutivas. Además, cuando estos ratones supervivientes se expusieron de nuevo a Colon26 a $1x10^7$ células/ratón, el 100% de los ratones sobrevivieron. Esto demostró establecimiento de inmunidad antitumoral.

(Ejemplo 14: L1BR1) (para referencia solamente)

En este ejemplo, se demostró el efecto del recombinante génico HSV-2 186, que no expresa US3, preparado en el Ejemplo 9 sobre tumor sólido.

Se usaron ratones C3H/He hembra (6 semanas; cada grupo incluye 5 ratones) como sujetos animales. Como células tumorales, se usó NfSaY83 usado en los ejemplos descritos anteriormente.

Se afeitó el pelo de la espalda y se inocularon $1,25x10^6$ células/0,1 ml de NfSa en la espalda.

Después de la inoculación de las células tumorales, se inoculó 0,1 ml de L1BR1 ($1x10^7$ PFU celular/0,1 ml) a una parte del tumor tres veces.

La evaluación se realizó basada en la cantidad de ratones supervivientes y el cambio en el tamaño del tumor (volumen). Los resultados se muestran en la siguiente tabla.

Tabla: Transición en el volumen (mm^3) del tumor después de inoculación del tumor (resultados individuales)

	Día 10	Día 20	Día 30	Día 40	Día 50
Grupo de inoculación de L1BR1	5	<5	<5	<5	<5
	9	54	150	545	Muerto
	<5	<5	<5	<5	<5
	24	<5	<5	<5	<5
	13	<5	<5	<5	<5
Cantidad de ratones supervivientes	5/5	5/5	5/5	5/5	4/5
Grupo de control	21	186	1210	Muerto	
	42	419	Muerto		
	73	420	Muerto		
	42	161	1346	4300	Muerto
	142	266	486	Muerto	
Cantidad de ratones supervivientes	5/5	5/5	3/5	1/5	0/5

Como se ha descrito anteriormente, L1BR1 (HSV-2 US-deficiente) mostró un excelente efecto antitumoral sobre tumor sólido.

(Ejemplo 15: Uso de HSV atenuado para terapia contra VIH)

A continuación, se demuestra que otra enfermedad puede tratarse o prevenirse usando el HSV atenuado de la presente invención.

Se inserta una secuencia de ácido nucleico que tiene un promotor para el gen temprano inmediato de citomegalovirus humano en su parte cadena arriba y una secuencia que codifica una proteína de envuelta, gp120 de VIH, en un gen lacZ (fase de lectura abierta) de modo que se prepara el ADN en que el gen lacZ está interrumpido por la secuencia de ácido nucleico.

Se transfectan células Vero con este ADN y ADN infeccioso derivado del virus con UL56 y UL39-inactivado (el HSV atenuado (HR522) preparado en el Ejemplo 5). Se recogen los virus producidos.

Se recogen los virus que producían placa incolora en presencia de X-gal, seguido de clonación en placa. Los virus resultantes se almacenan como una reserva primaria. Se infectan muestras celulares con clones obtenidos como reserva primaria. Las muestras celulares infectadas se someten a una técnica de anticuerpos fluorescentes usando anticuerpos marcados. Para los clones positivos, se prepara una reserva secundaria. Los clones finalmente obtenidos se someten a dot blot usando anticuerpos anti-gp120 disponibles en el mercado para ensayar la presencia de gp120. Se usa una cepa gp120-positiva en el siguiente experimento.

Después de ello, puede usarse el HSV atenuado que expresa gp120 de VIH para prevenir que un ser humano se infecte con VIH o para tratar a un ser humano infectado con VIH. El efecto del HSV atenuado de la presente invención puede ser ventajoso sobre terapias con fármacos convencionales.

Como antígeno de VIH descrito anteriormente, pueden usarse proteínas de matriz gp41 y gp17, proteína de cápsida p24, transcriptasa inversa (VIH pol), tat rev, y similares así como gp120.

Por lo tanto, se demuestra que el HSV atenuado es eficaz para una enfermedad infecciosa causada por un patógeno infeccioso diferente de un patógeno relacionado con el herpes virus.

Aplicabilidad industrial

En este documento se describe un método para tratar de forma eficaz diversas enfermedades (por ejemplo, enfermedades infecciosas o cáncer). El método proporciona un efecto de mantenimiento, con pocos efectos secundarios, contra enfermedades relacionadas con herpes virus, tumor, y similares, para las cuales no existe de forma convencional un método eficaz de tratamiento. Éstos se consideran efectos ventajosos. La producción de composiciones, construcciones de virus, kits, medicamentos, y similares para su uso en el método de tratamiento descrito en este documento es suficientemente aplicable de forma industrial. Las presentes composiciones y similares pueden utilizarse por los doctores y además, por ejemplo, compañías farmacéuticas en su actividad. Por lo tanto, la presente invención se considera suficientemente aplicable de forma industrial. El método es útil para un método terapéutico con fines puramente de terapia y además ensayo clínico con fines comerciales. Por lo tanto, el

método es industrialmente aplicable. El método terapéutico puede ponerse en práctica indirecta o directamente en las industrias marginales de negocios médicos, y por lo tanto es suficientemente aplicable de forma industrial.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> M's science Corporation

<120> COMPOSICIÓN Y MÉTODO PARA TRATAR EL CÁNCER USANDO HERPES VIRUS

<130> MS001 PCT

<140> PCT/JP 02/004547
<141> 09-05-2002

<150> JP P2001-139094
< 151> 09-05-2001

<150> JP P2001-300931
< 151> 28-09-2001

<160> 6

<170> PatentIn versión 3.1

<210> 1
< 211> 900
< 212> ADN
< 213> Herpes simple

<220>
< 221> CDS
< 222> (3)..(41)
< 223>

<400> 1

```
gg gag cag ggg gcg tcg acc cgg gac gag gga aaa caa taa gggacgcccc     51
   Glu Gln Gly Ala Ser Thr Arg Asp Glu Gly Lys Gln
   1               5                  10

ccgtgtttgt ggggaggggg gggtcgggcg ctgggtggtc tctggccgcg cccactacac    111

cagccaatcc gtgtcgggga ggggaaaagt gaaagacacg ggcaccacac accagcgggt    171

ctttagtgtt ggccctaata aaaaaaaact caggggattt ttgctgtcta ttgggaaata    231

aaggtttact tttgtatctt ttccctgtct gtgttggatg gatctcgggg gtgcgtggga    291

gtgggggtgc gtgggagtgg gggtgcgtgg gagtgagggt gcgtgggagt gagggtgcgt    351

gggagtgggg gtgcgtggga gtgggggtgc gtgggagtgg gggtgcgtgg gagtgggggt    411

gcgtgggagt gggggtgaca tgttgggcag gctctggtgt taaccacaga gtcgcggccc    471

gggctgcctg accaccgatc cccgaaagca tcctgccact ggcatggagc cagaaccaca    531

gtgggttggg tgtgggtgtt aagtttccgc gagcgcctgc ccgccgaggc tatgtcggac    591

caccccccaa cctatgccac tgtcgtggcc gttcgttcga ccgaacagcc gtccggggct    651

ttggcgcccg acgaccagcg acgaacgcaa aactcgggcg cgtggcggcc tcctagggtc    711

aattcgcgcg agctgtacag ggcccaacgc gcagcgcgcg gctcgtctga tcatgcccca    771

taccggcgac agggctgttg tggtgtggtg gggcgccatg ctgtatttgg ggtggtcgcg    831

atagtggtgg tcattattct ggtattcctg tggcggtaag cgcccctgtg agttaataaa    891

taaaagtat                                                            900
```

<210> 2
< 211> 12
< 212> PRT
< 213> Herpes simple

<400> 2

Glu Gln Gly Ala Ser Thr Arg Asp Glu Gly Lys Gln
1 5 10

<210> 3
< 211> 360
< 212> ADN
< 213> Herpes simple

<400> 3

gcctgtcccg tggggaccat ggatatccgg tagacgggca ggggagtctg caccgccgca 60
ttacggataa gcgccgcgat cgccgggggt gtggtgccct gctgttccgt ggcggccagt 120
ctcaggaggc gcttgacaat tccgcaggtc tgtgggggcg gcgtgccgcc cgccgtgtcc 180
tccccgggac tggcgggccc ccgtcgcggg tgtttgtgtt tgtttattcc gacattggtt 240
tatttaaata aacacagccg ttctgcgtgt ctgttcttgc gtgtggctgg gggcttatat 300
gtggggtccc gggggcggga tggggtttag cggcgggggg cggcgcgccg gacggggcgc 360

<210> 4
< 211> 898
< 212> ADN
< 213> Herpes simple

<400> 4

atacttttat ttattaactc acaggggcgc ttaccgccac aggaatacca gaataatgac 60
caccacaatc gcgaccaccc caaatacagc atggcgccac accacgccac aacagccctg 120
tcgccggtat ggggcatgat cagacgagcc gcgccgcgcg ttgggccctg tacagctcgc 180
gcgaattgac cctaggaggc cgccacgcgc ccgagttttg cgttcgtcgc tggtcgtcgg 240
gcgccaaagc cccggacggc tgttcggtcg aacgaacggc cacgacagtg gcataggttg 300
gggggtggtc cgacatagcc tcggcgggca ggcgctcgcg gaaacttaac acccacaccc 360
aacccactgt ggttctggct ccatgccagt ggcaggatgc tttcggggat cggtggtcag 420
gcagcccggg ccgcggctct gtggttaaca ccagagcctg cccaacatgg caccccccact 480
cccacgcacc cccactccca cgcaccccca ctcccacgca cccccactcc cacgcacccc 540
cactcccacg cacccccact cccacgcacc cccactccca cgcaccccca ctcccacgca 600
cccccactcc cacgcatccc cgcgatacat ccaacacaga cagggaaaag atacaaaagt 660
aaacctttat ttcccaacag acagcaaaaa tcccctgagt ttttttttat tagggccaac 720
acaaaagacc cgctggtgtg tggtgcccgt gtctttcact tttcccctcc ccgacacgga 780
ttggctggtg tagtgggcgc ggccagagac cacccagcgc ccgacccccc cctccccaca 840
aacacggggg gcgtccctta ttgttttccc tcgtcccggg tcgacgcccc ctgctccc 898

<210> 5
< 211> 900
< 212> ADN
< 213> Herpes simple

<400> 5

atacttttat ttattaactc acaggggcgc ttaccgccac aggaatacca gaataatgac 60
caccactatc gcgaccaccc caaatacagc atggcgcccc accacaccac aacagccctg 120
tcgccggtat ggggcatgat cagacgagcc gcgcgctgcg cgttgggccc tgtacagctc 180
gcgcgaattg accctaggag gccgccacgc gcccgagttt tgcgttcgtc gctggtcgtc 240
gggcgccaaa gccccggacg gctgttcggt cgaacgaacg gccacgacag tggcataggt 300
tgggggtgg tccgacatag cctcggcggg caggcgctcg cggaaactta acacccacac 360
ccaacccact gtggttctgg ctccatgcca gtggcaggat gctttcgggg atcggtggtc 420
aggcagcccg ggccgcgact ctgtggttaa caccagagcc tgcccaacat gtcaccccca 480
ctcccacgca cccccactcc cacgcacccc cactcccacg cacccccact cccacgcacc 540
cccactccca cgcaccctca ctcccacgca ccctcactcc cacgcacccc cactcccacg 600
cacccccact cccacgcacc cccgagatcc atccaacaca gacagggaaa agatacaaaa 660
gtaaaccttt atttcccaat agacagcaaa aatcccctga gtttttttt attagggcca 720
acactaaaga cccgctggtg tgtggtgccc gtgtctttca cttttccct ccccgacacg 780
gattggctgg tgtagtgggc gcggccagag accacccagc gcccgacccc ccctcccca 840
caaacacggg gggcgtccct tattgttttc cctcgtcccg ggtcgacgcc ccctgctccc 900

<210> 6
< 211> 12
< 212> PRT
< 213> Herpes simple

<400> 6

Glu Gln Gly Ala Ser Thr Arg Asp Glu Gly Lys Gln
1 5 10

REIVINDICACIONES

1. Un herpes virus, en el que al menos dos genes no esenciales para la replicación del mismo están inactivados, en el que el herpes virus es virus del herpes simple, en el que el primer gen no esencial es UL56 y el segundo gen no esencial para la replicación es UL43, y en el que dicho herpes virus incluye una deleción desde la posición 116515 a 120346 del genoma del herpes virus y una deleción en la parte del genoma que codifica UL56 de modo que se deleciona la secuencia que codifica 136 aminoácidos en el lado N terminal de un total de 197 aminoácidos de UL56, junto con su región cadena arriba.

2. Un herpes virus de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el virus tiene capacidad de seleccionar células cancerosas.

3. Un herpes virus de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la inactivación incluye al menos una sustitución, adición, deleción o modificación de nucleótido en la secuencia del gen no esencial para la replicación.

4. Un herpes virus de acuerdo con la reivindicación 1, en el que se inserta una señal para detener la traducción en la secuencia del gen no esencial para la replicación.

5. Un herpes virus de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el virus es un virus del herpes simple modificado.

6. Un herpes virus de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el virus es un HSV-1 o HSV-2 modificado.

7. Una composición farmacéutica para tratar o prevenir el cáncer, que comprende:

un herpes virus de acuerdo con cualquier reivindicación precedente; y
un vehículo farmacéuticamente aceptable.

8. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 7, en la que el cáncer se selecciona entre el grupo que consiste en cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer pancreático, cáncer de vejiga, cáncer de uretra, cáncer de intestino grueso, cáncer de piel, melanoma maligno, osteosarcoma, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de colon y cáncer de estómago.

9. Un herpes virus de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6 para tratar o prevenir el cáncer.

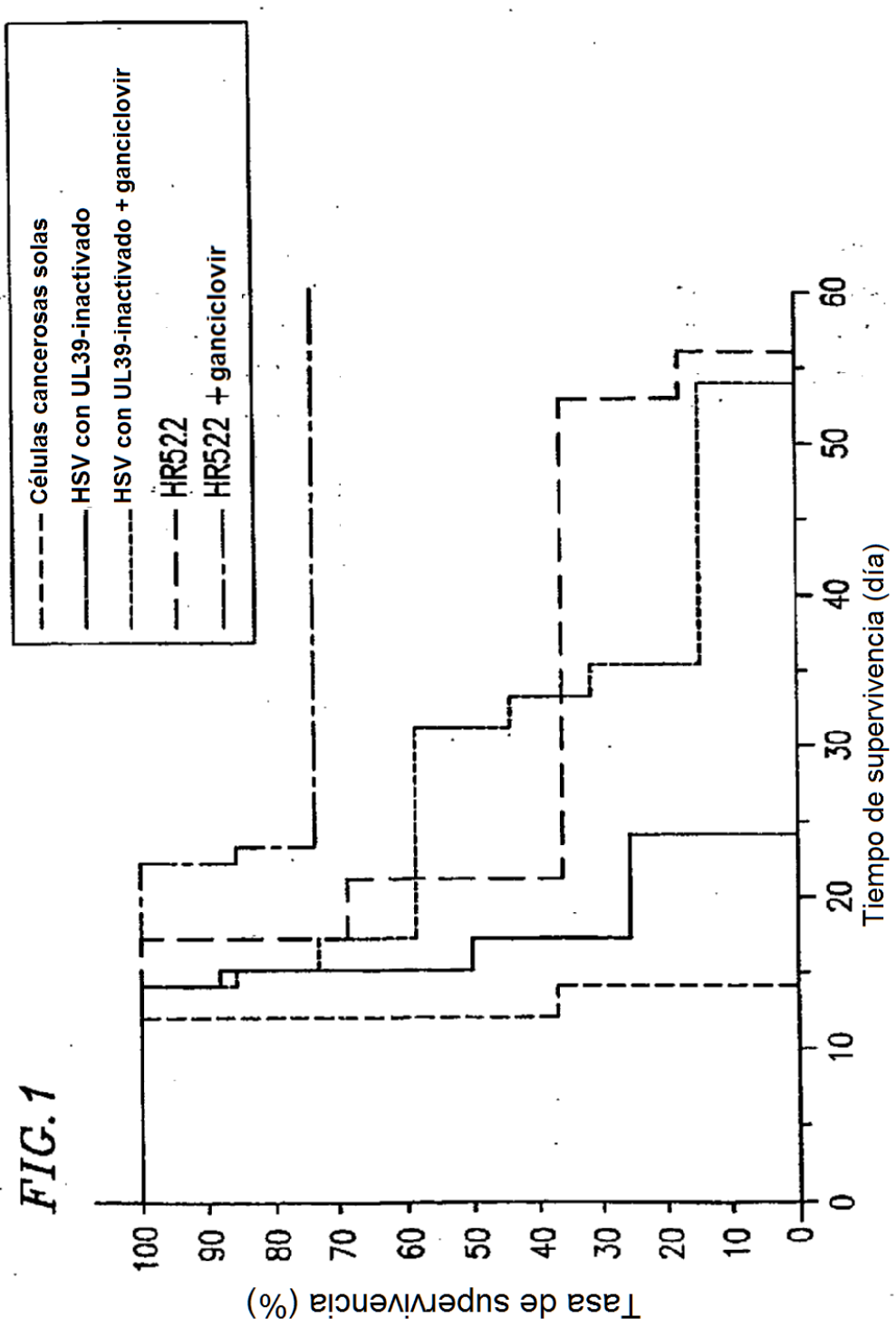

Células cancerosas solas
HSV con UL39-inactivado
HSV con UL39-inactivado + ganciclovir
HR522
HR522 + ganciclovir
Tasa de supervivencia (%)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0
10
20
30
40
50
60
Tiempo de supervivencia (día)

FIG. 1

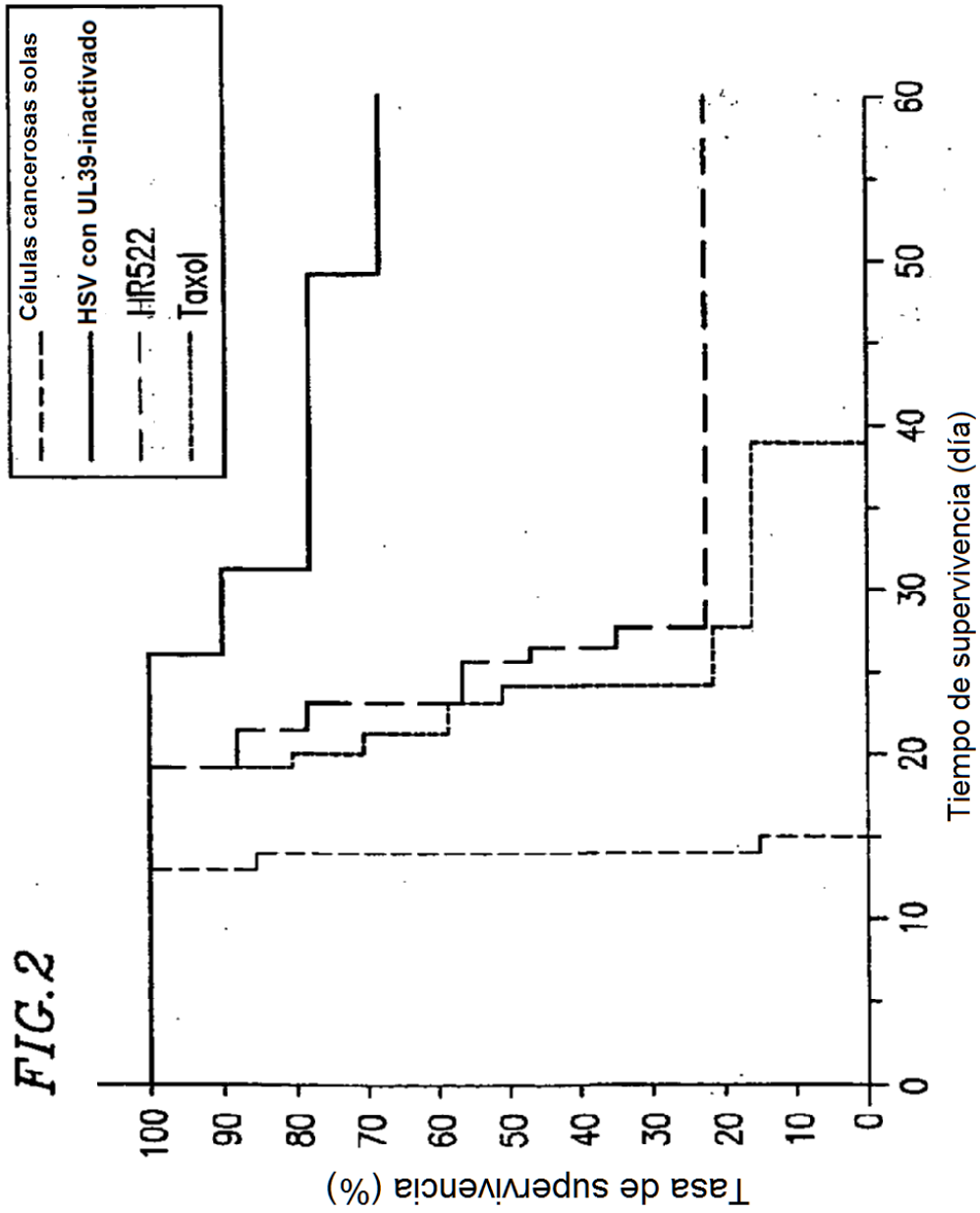
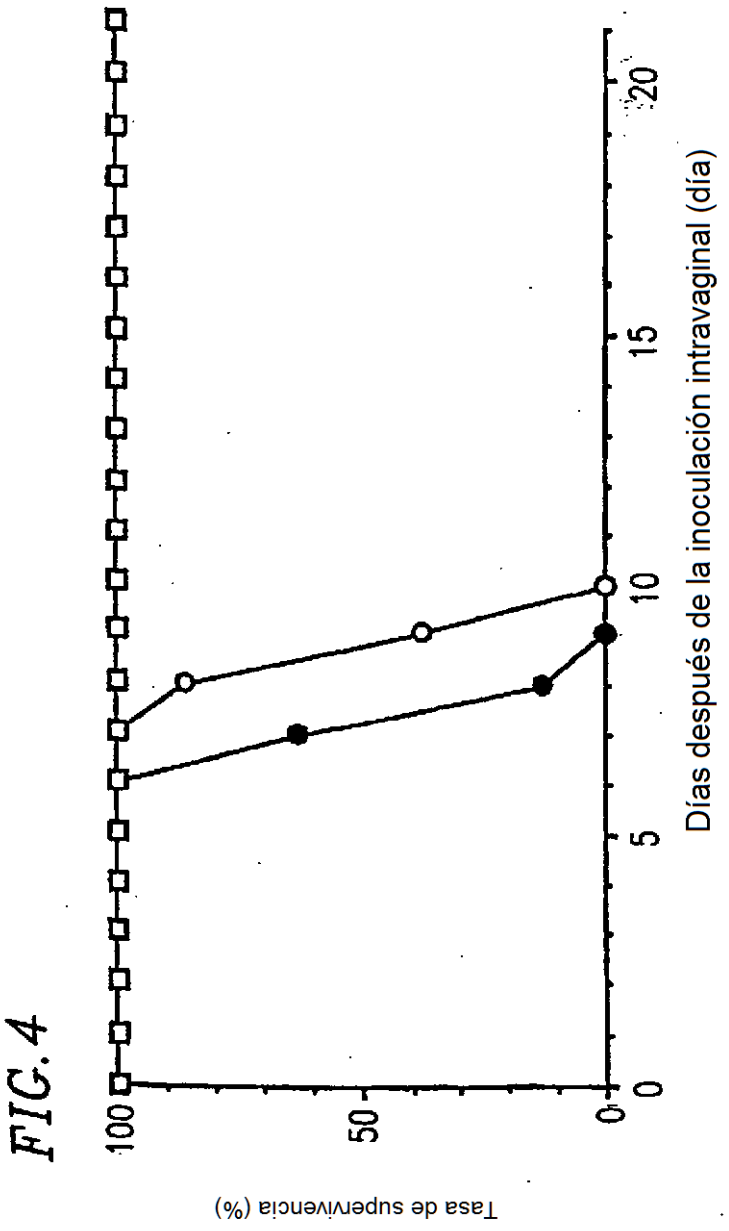

Células cancerosas solas
HSV con UL39-inactivado
HR522
Taxol
Tasa de supervivencia (%)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0
10
20
30
40
50
60
Tiempo de supervivencia (día)

FIG.2

FIG. 3

FIG. 4


Tasa de supervivencia (%)
100
50
0
0
5
10
15
20
Días después de la inoculación intravaginal (día)

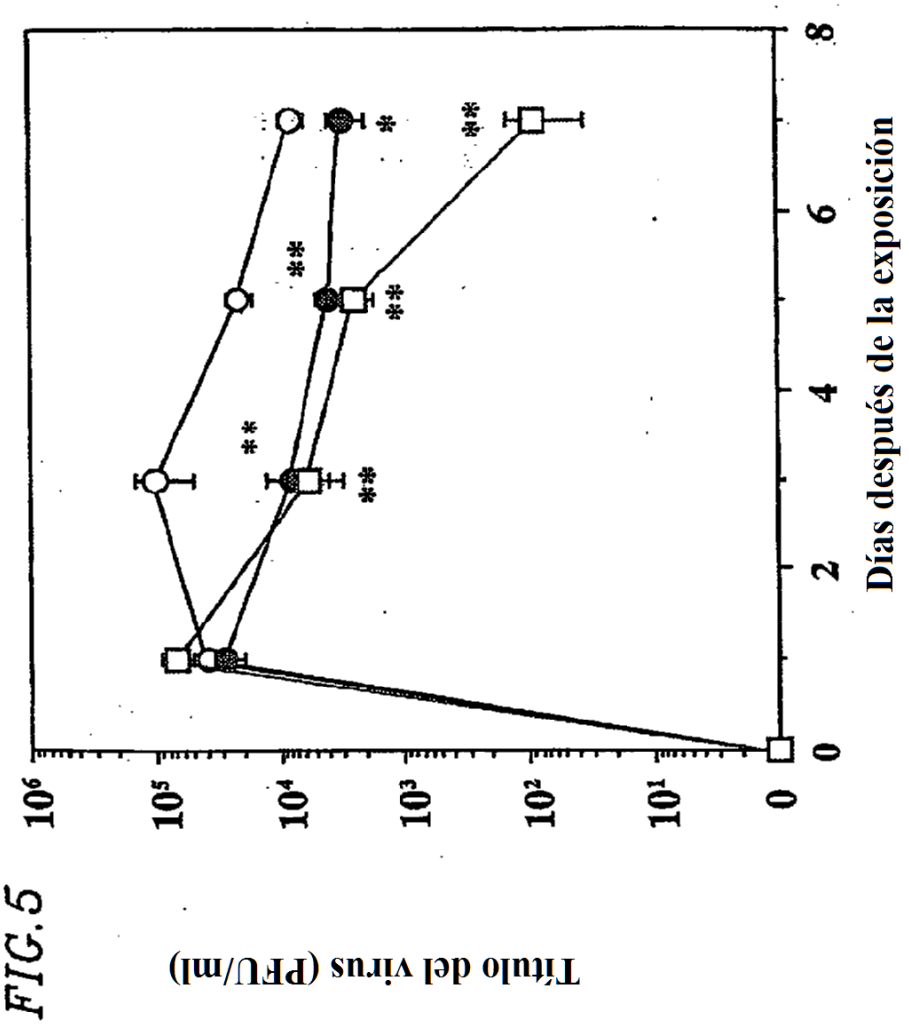

Título del virus (PFU/ml)
10^6
10^5
10^4
10^3
10^2
10^1
0
0
2
4
6
8
Días después de la exposición
*
**
**
**
**
**

FIG.5

FIG.6

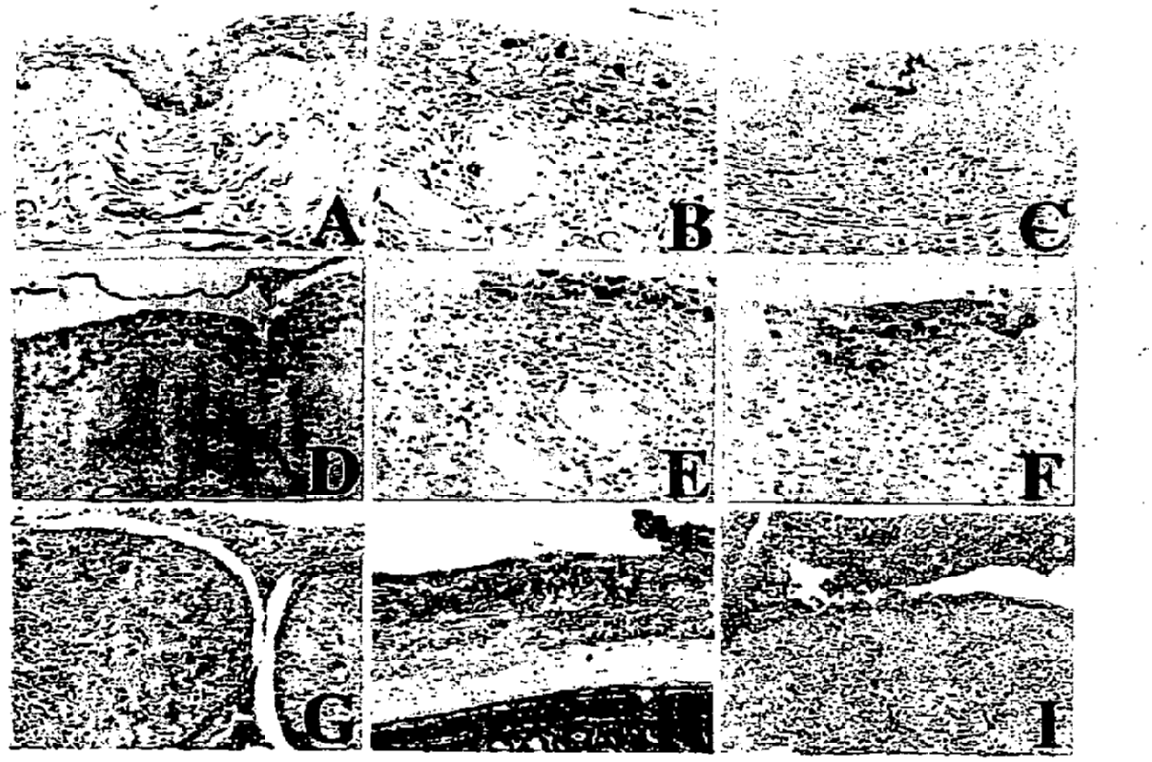


FIG. 7

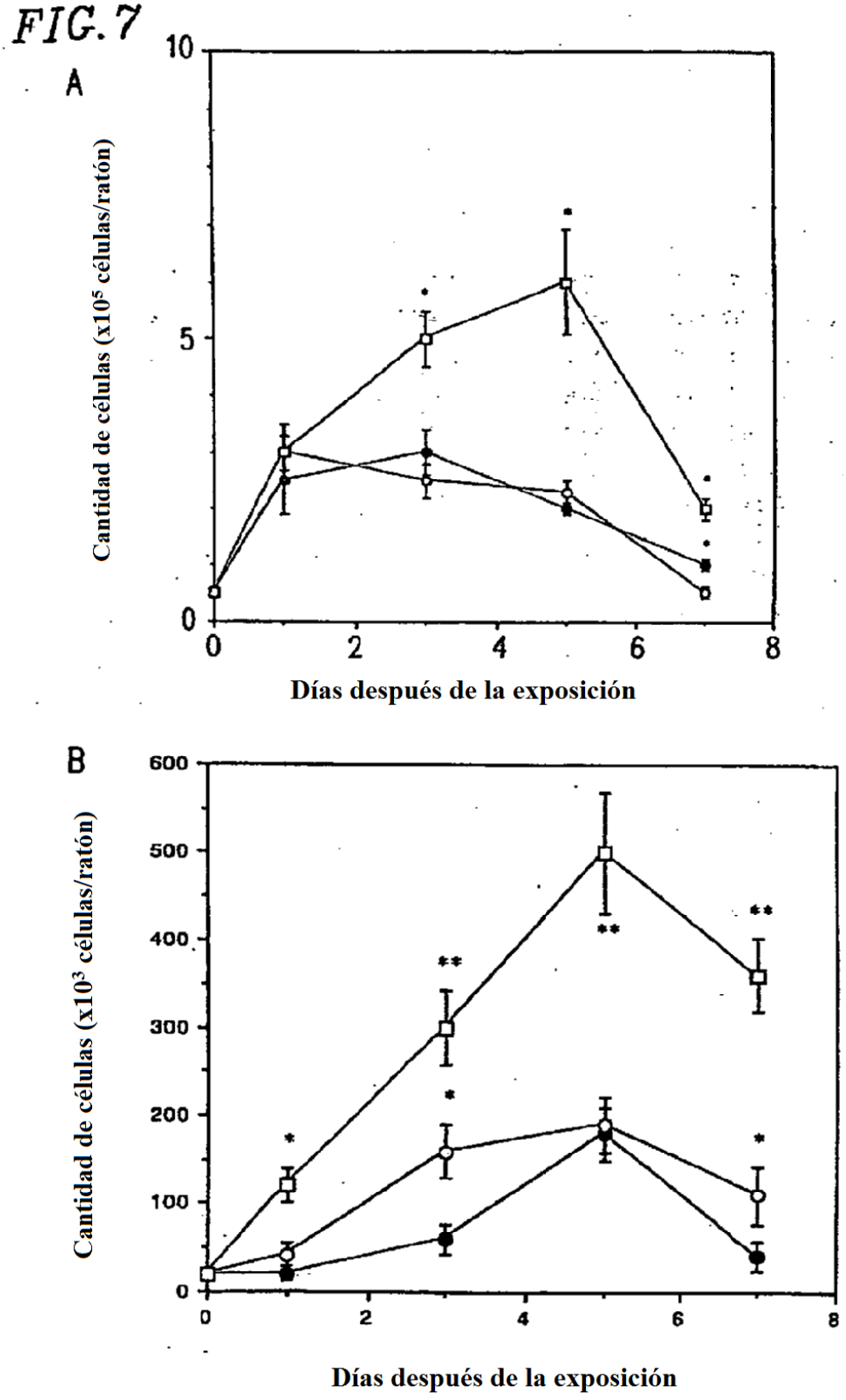

A
Cantidad de células (x10⁵ células/ratón)
10
5
0
0
2
4
6
8
Días después de la exposición
B
Cantidad de células (x10³ células/ratón)
600
500
400
300
200
100
0
0
2
4
6
8
Días después de la exposición

FIG.8

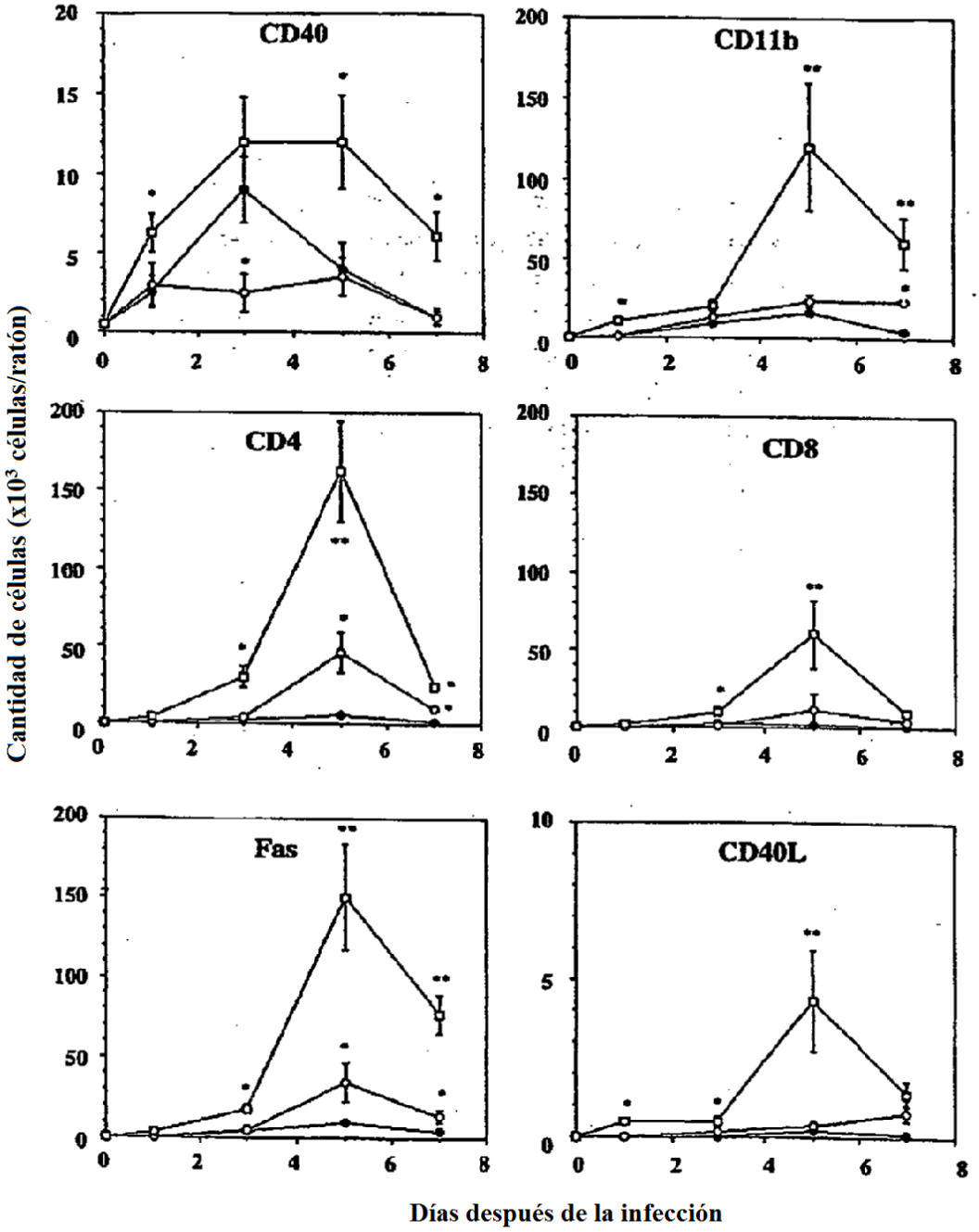

CD40
CD11b
CD4
CD8
Fas
CD40L
Cantidad de células (x10³ células/ratón)
Días después de la infección

FIG. 9

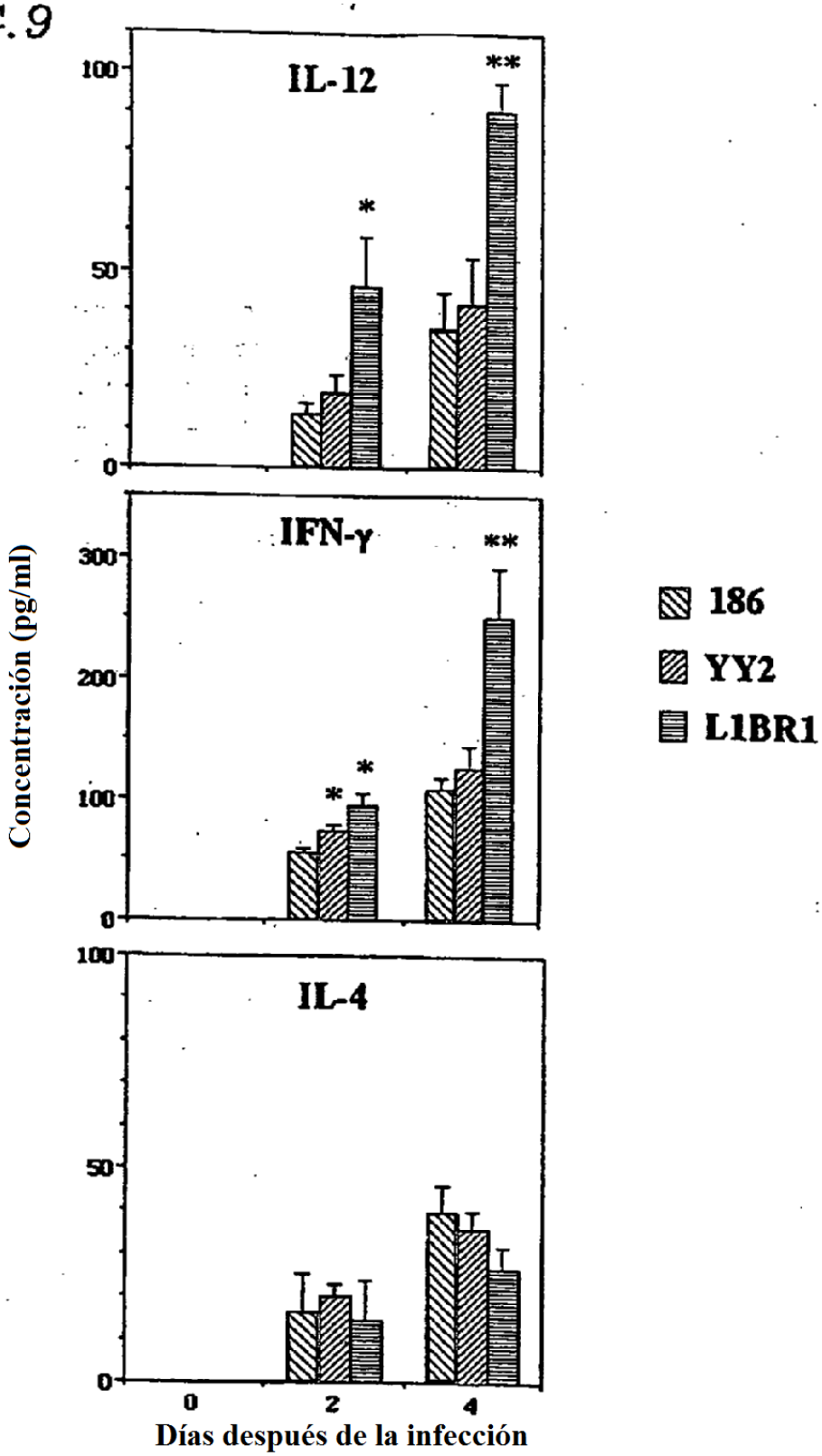

IL-12
IFN-γ
IL-4
Concentración (pg/ml)
100
50
0
300
200
100
0
100
50
0
*
**
0
2
4
Días después de la infección
186
YY2
L1BR1

FIG. 10

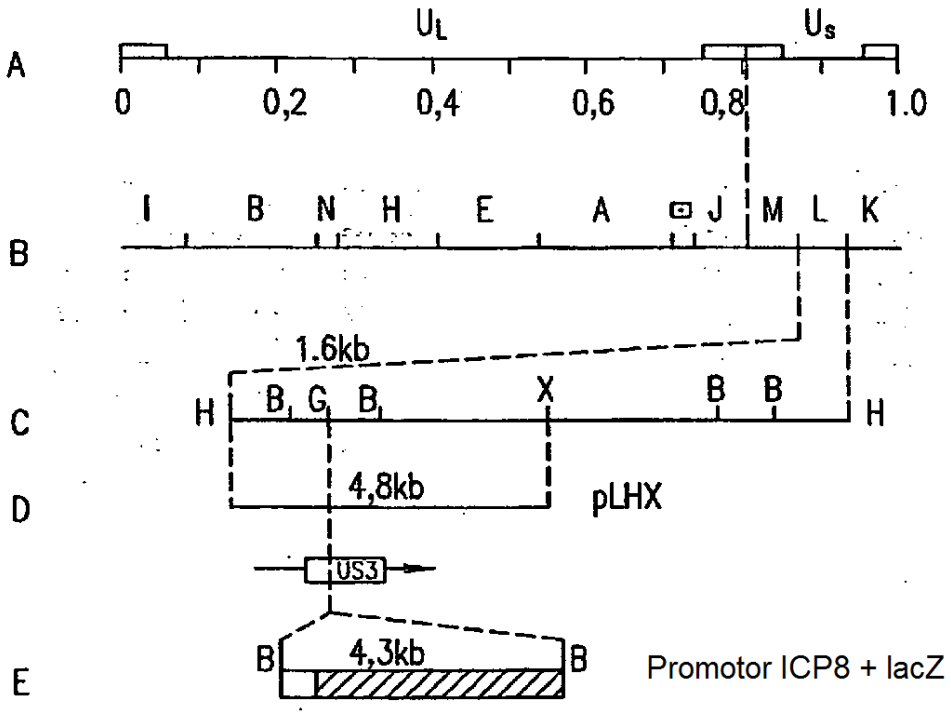

A
U_L
U_S
0
0,2
0,4
0,6
0,8
1.0
B
I
B
N
H
E
A
J
M
L
K
C
1.6kb
H
B
G
B
X
B
B
H
D
4,8kb
pLHX
US3
E
B
4,3kb
B
Promotor ICP8 + lacZ

FIG. 11

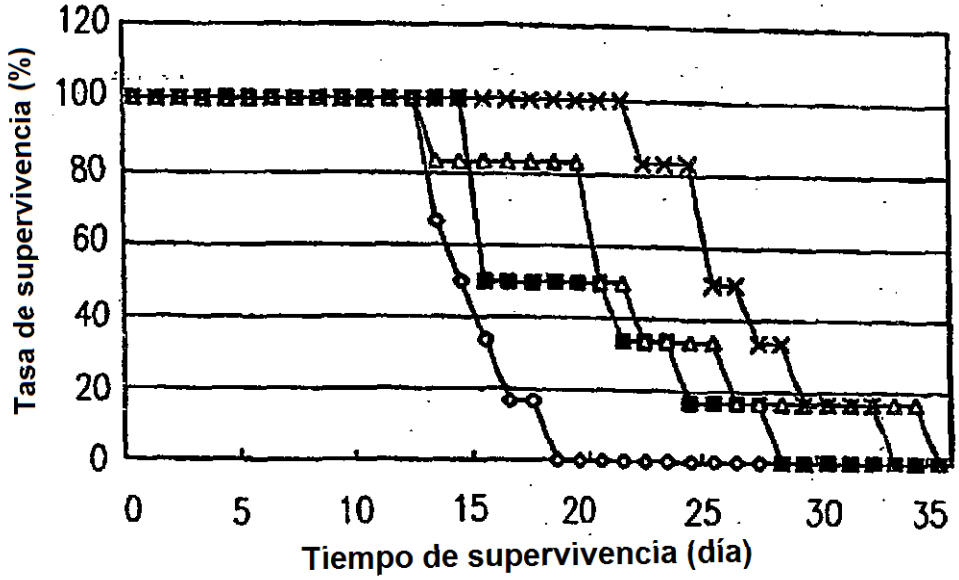
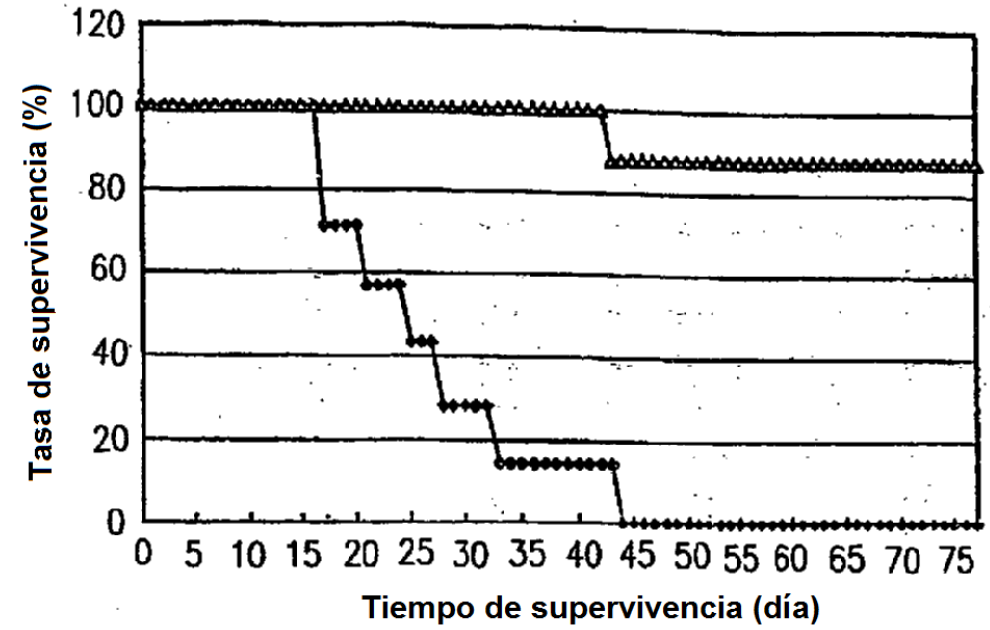

120
100
80
60
40
20
0
Tasa de supervivencia (%)
0
5
10
15
20
25
30
35
Tiempo de supervivencia (día)

FIG. 12


120
100
80
60
40
20
0
Tasa de supervivencia (%)
0 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65 70 75
Tiempo de supervivencia (día)

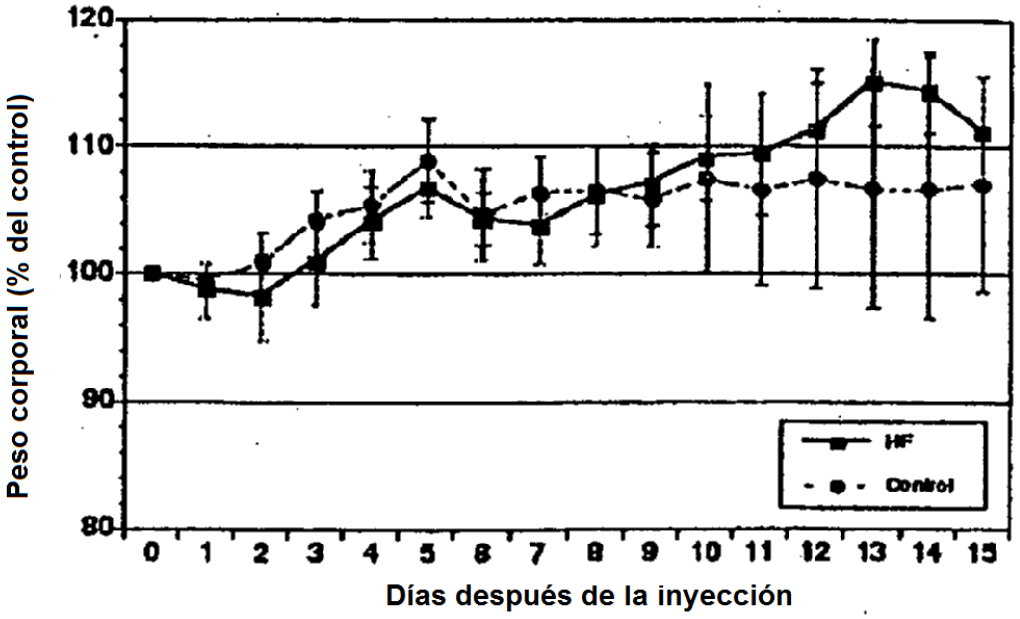
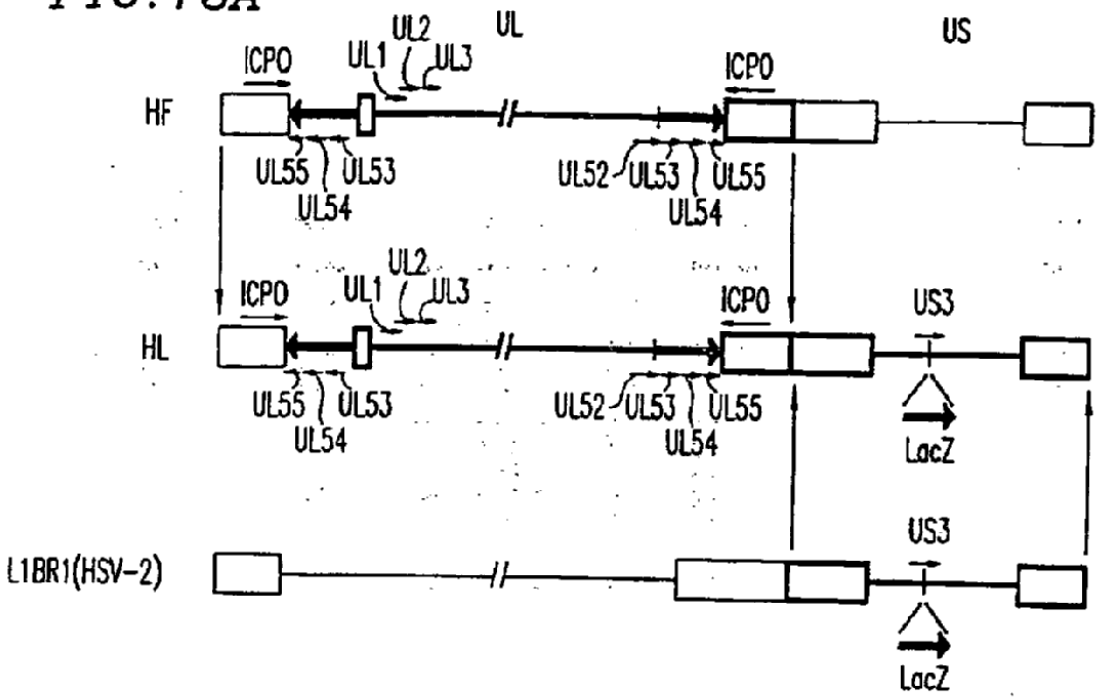

120
110
100
90
80
Peso corporal (% del control)
HF
Control
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15
Días después de la inyección

FIG. 13A


UL
US
UL2
UL1
UL3
ICP0
ICP0
HF
UL55
UL53
UL54
UL52
UL53
UL55
UL54
UL2
UL1
UL3
ICP0
ICP0
US3
HL
UL55
UL53
UL54
UL52
UL53
UL55
UL54
LacZ
US3
L1BR1(HSV-2)
LacZ

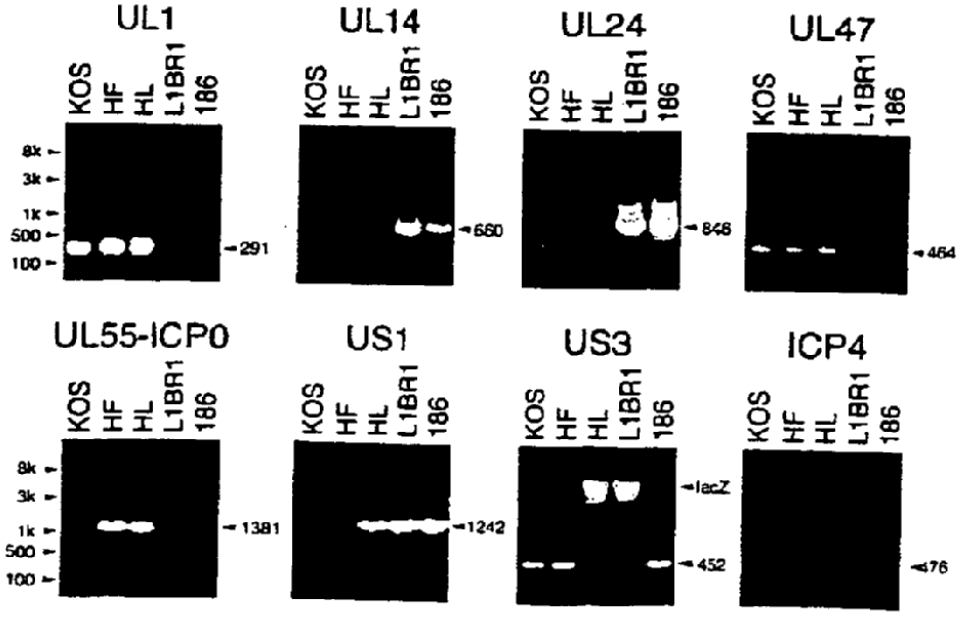
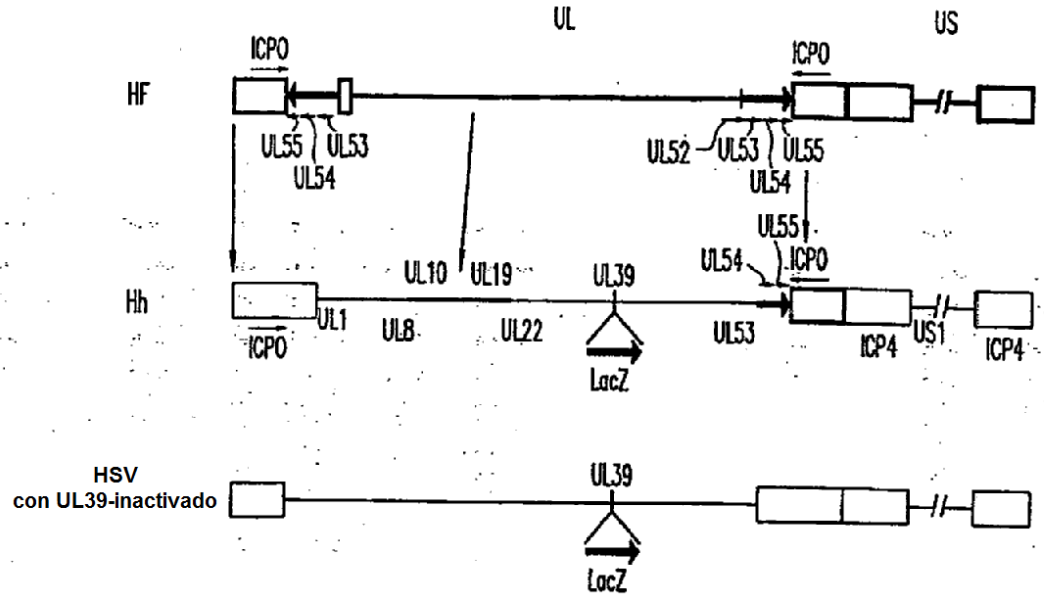

UL1
UL14
UL24
UL47
KOS
HF
HL
L1BR1
186
8k
3k
1k
500
100
291
660
848
464
UL55-ICP0
US1
US3
ICP4
1381
1242
lacZ
452
476

FIG. 13B



	UL1												UL6			UL8			
	261	269	273	294	299	310	327	343	489	503	511	541	1149	1197	1338	289	354	397	560
HF	C	G	G	G	G	T	T	G	C	T	A	T	G	T	G	G	A	C	C
Hh	T	A	A	A	T	C	C	A	A	C	G	C	T	G	A	A	C	G	T
hrR3	T	A	A	A	T	C	C	A	A	C	G	C	T	G	A	A	C	G	T

	UL10							UL12						UL19
	466	482	608	618	633	645	762	601	643	661	802	828	943	1152
HF	C	T	T	C	C	C	C	T	A	T	T	G	T	A
Hh	C	T	T	C	C	C	C	T	A	T	T	G	T	A
hrR3	T	C	C	T	T	A	A	C	G	C	C	A	C	G

	UL22	UL26						UL29	UL44			UL51	UL53					
	1393	1410	1467	1492	1512	1569	1704	2095	544	713	788	617	1044	1060	1098	1107	1120	1134
HF	G	T	A	A	G	A	A	A	G	T	C	G	T	T	T	C	G	C
Hh	A	G	G	C	A	G	G	G	A	C	T	A	G	C	T	T	T	T
hrR3	A	G	G	C	A	G	G	G	A	C	T	A	G	C	C	T	T	T

	UL54		UL55	ICP0				US1					US3						ICP4
	1155	118	65	2395	2427	2445	2471	347	399	483	494	516	118	184	189	222	360	406	2770
HF	T	G	-	G	-	-	G	A	G	A	T	A	A	A	G	T	T	T	A
Hh	T	G	-	G	-	-	G	G	T	C	C	C	G	G	T	G	C	C	G
hrR3	G	A	C	A	G	A	A	G	T	C	C	C	G	G	T	G	C	C	G

UL19 1094-1560
UL22 1057-1516
UL26 1405-1819
UL29 2028-2297

ICP0 2082-2517
US1 308-736
US3 89-458
ICP4 2540-2951

UL1 245-542
UL6 1088-1461
UL8 275-724
UL10 301-782
UL12 554-1017

UL51 403-62
UL53 952-R309
UL54 1128-1362
UL54 R97-187
UL55 R101-164

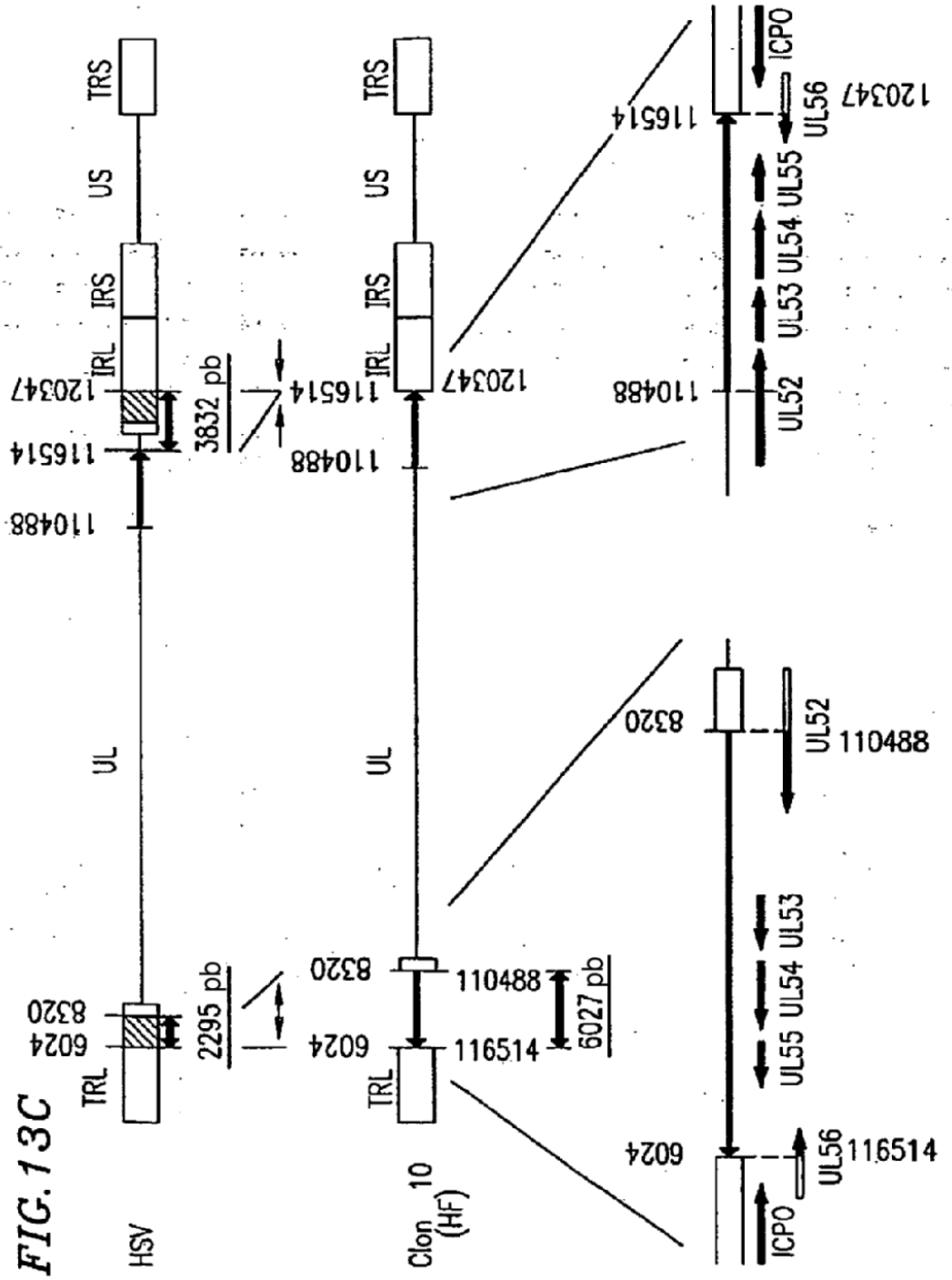

TRS
US
IRS
IRL
203547
116514
110488
3832 pb
UL
8320
6024
2295 pb
TRL
HSV
Clon 10 (HF)
6027 pb
ICPO
UL56
UL55
UL54
UL53
UL52

FIG. 13C

FIG. 13D

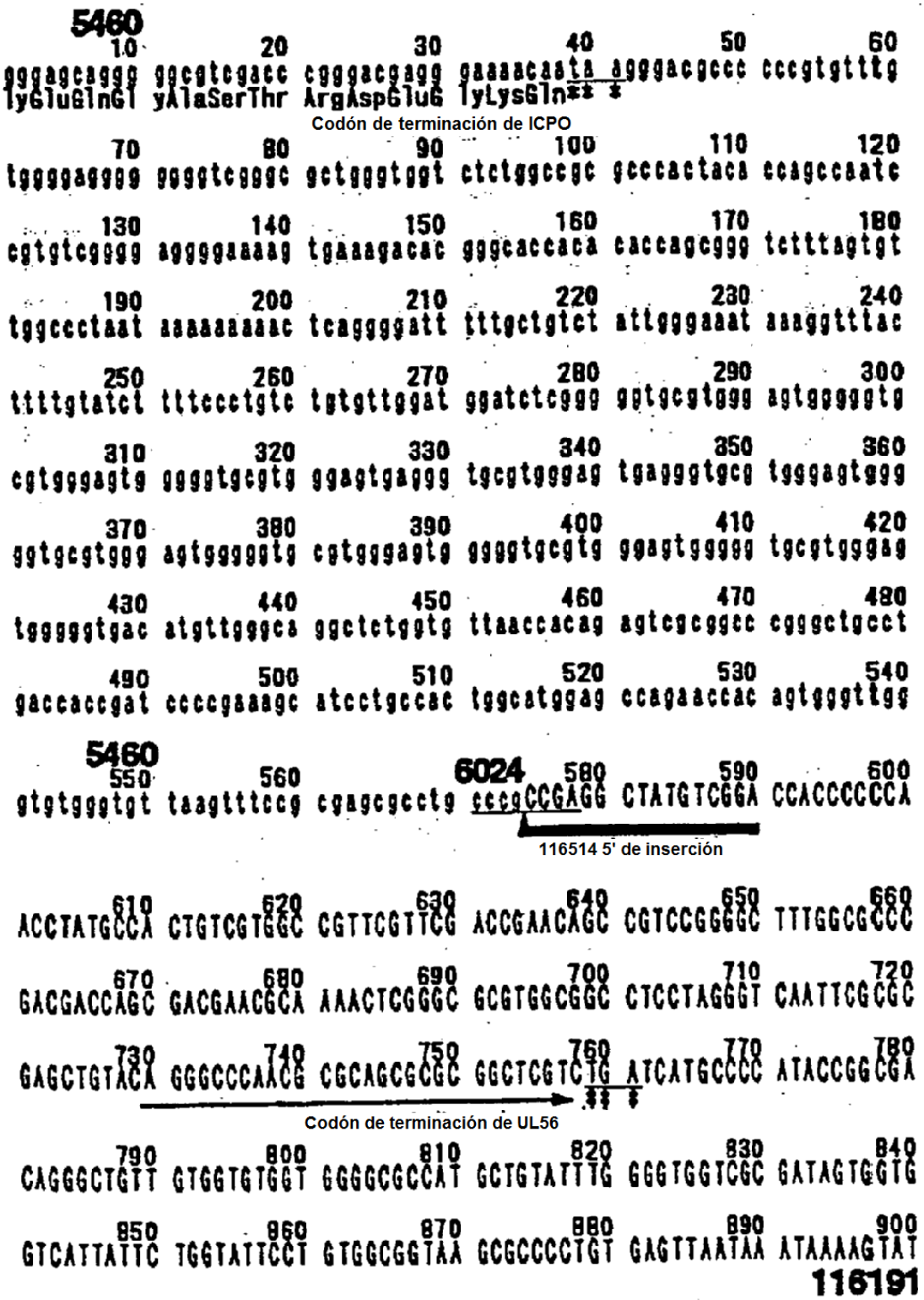

5460
10 20 30 40 50 60
gggagcaggg ggcgtcgacc cgggacgagg gaaaacaata agggacgccc cccgtgtttg
lyGluGlnGl yAlaSerThr ArgAspGluG lyLysGln
Codón de terminación de ICPO
70 80 90 100 110 120
tggggagggg ggggtcgggc gctgggtggt ctctggccgc gcccactaca ccagccaatc
130 140 150 160 170 180
cgtgtcgggg aggggaaaag tgaaagacac gggcaccaca caccagcggg tctttagtgt
190 200 210 220 230 240
tggccctaat aaaaaaaaac tcaggggatt tttgctgtct attgggaaat aaaggtttac
250 260 270 280 290 300
ttttgtatct ttttcctgtc tgtgttggat ggatctcggg ggtgcgtggg agtgggggtg
310 320 330 340 350 360
cgtgggagtg ggggtgcgtg ggagtgaggg tgcgtgggag tgagggtgcg tgggagtggg
370 380 390 400 410 420
ggtgcgtggg agtgggggtg cgtgggagtg ggggtgcgtg ggagtggggg tgcgtgggag
430 440 450 460 470 480
tgggggtgac atgttgggca ggctctggtg ttaaccacag agtcgcggcc cgggctgcct
490 500 510 520 530 540
gaccaccgat ccccgaaagc atcctgccac tggcatggag ccagaaccac agtgggttgg
5460
550 560 6024 580 590 600
gtgtgggtgt taagtttccg cgagcgcctg cccgCCGAGG CTATGTCGGA CCACCCCCCA
116514 5' de inserción
610 620 630 640 650 660
ACCTATGCCA CTGTCGTGGC CGTTCGTTCG ACCGAACAGC CGTCCGGGGC TTTGGCGCCC
670 680 690 700 710 720
GACGACCAGC GACGAACGCA AAACTCGGGC GCGTGGCGGC CTCCTAGGGT CAATTCGCGC
730 740 750 760 770 780
GAGCTGTACA GGGCCCAACG CGCAGCGCGC GGCTCGTCTG ATCATGCCCC ATACCGGCGA
Codón de terminación de UL56
790 800 810 820 830 840
CAGGGCTGTT GTGGTGTGGT GGGGCGCCAT GCTGTATTTG GGGTGGTCGC GATAGTGGTG
850 860 870 880 890 900
GTCATTATTC TGGTATTCCT GTGGCGGTAA GCGCCCCTGT GAGTTAATAA ATAAAAGTAT
116191

FIG. 13E

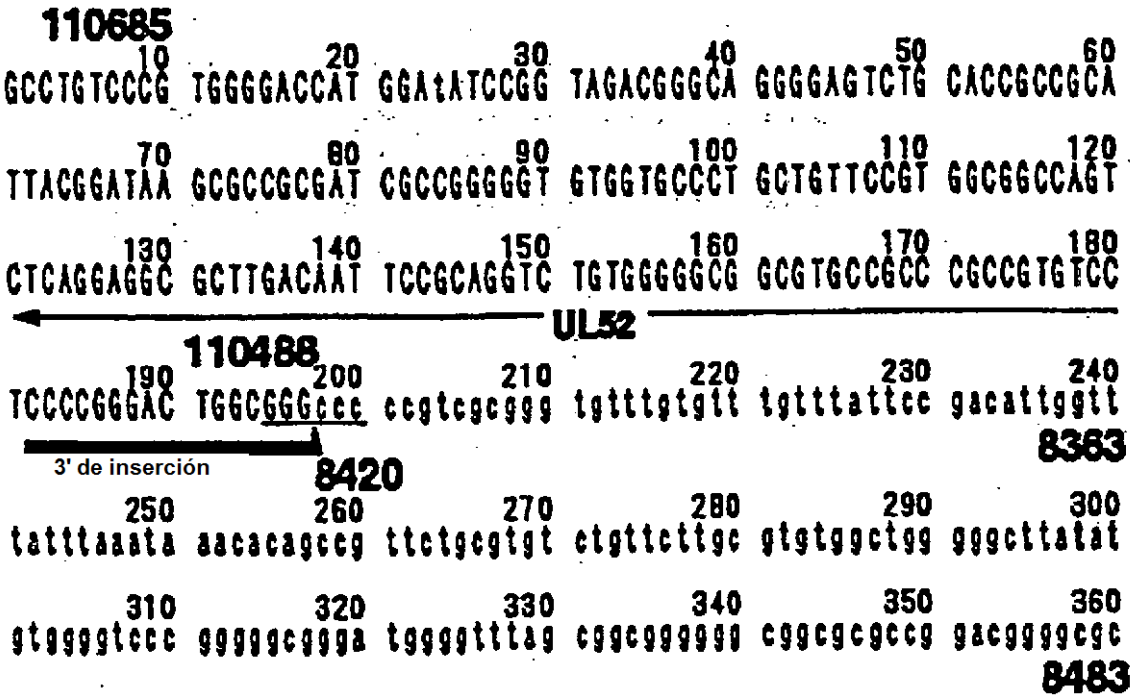

110685
10 20 30 40 50 60
GCCTGTCCCG TGGGGACCAT GGAtATCCGG TAGACGGGCA GGGGAGTCTG CACCGCCGCA
70 80 90 100 110 120
TTACGGATAA GCGCCGCGAT CGCCGGGGGT GTGGTGCCCT GCTGTTCCGT GGCGGCCAGT
130 140 150 160 170 180
CTCAGGAGGC GCTTGACAAT TCCGCAGGTC TGTGGGGGCG GCGTGCCGCC CGCCGTGTCC
UL52
110488
190 200 210 220 230 240
TCCCCGGGAC TGGCGGGccc ccgtcgcggg tgtttgtgtt tgtttattcc gacattggtt
8363
3' de inserción
8420
250 260 270 280 290 300
tatttaaata aacacagccg ttctgcgtgt ctgttcttgc gtgtggctgg gggcttatat
310 320 330 340 350 360
gtggggtccc gggggcggga tggggtttag cggcgggggg cggcgcgccg gacggggcgc
8483

FIG. 13F

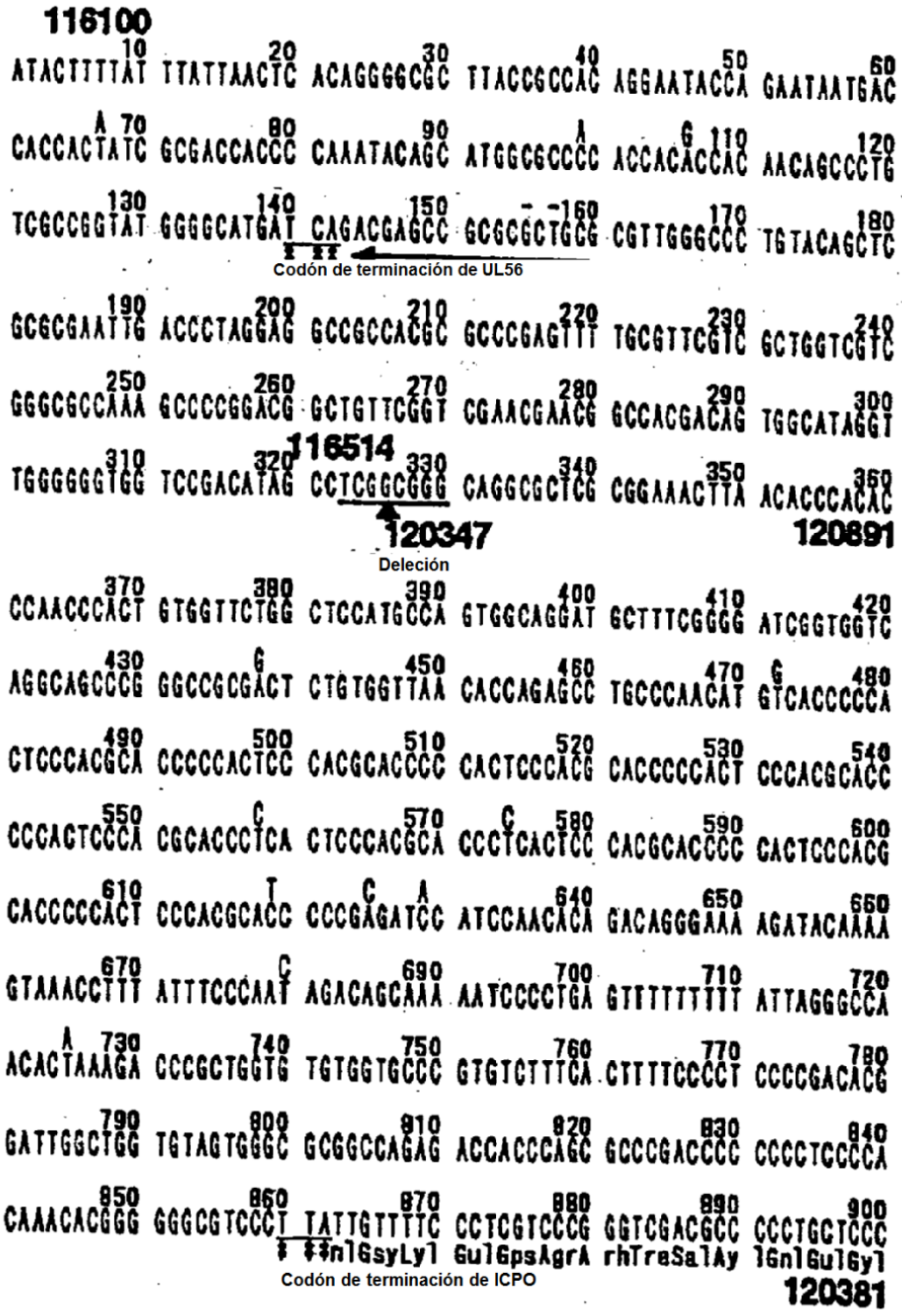

116100
Codón de terminación de UL56
116514
120347
120891
Deleción
Codón de terminación de ICPO
120381

FIG. 14

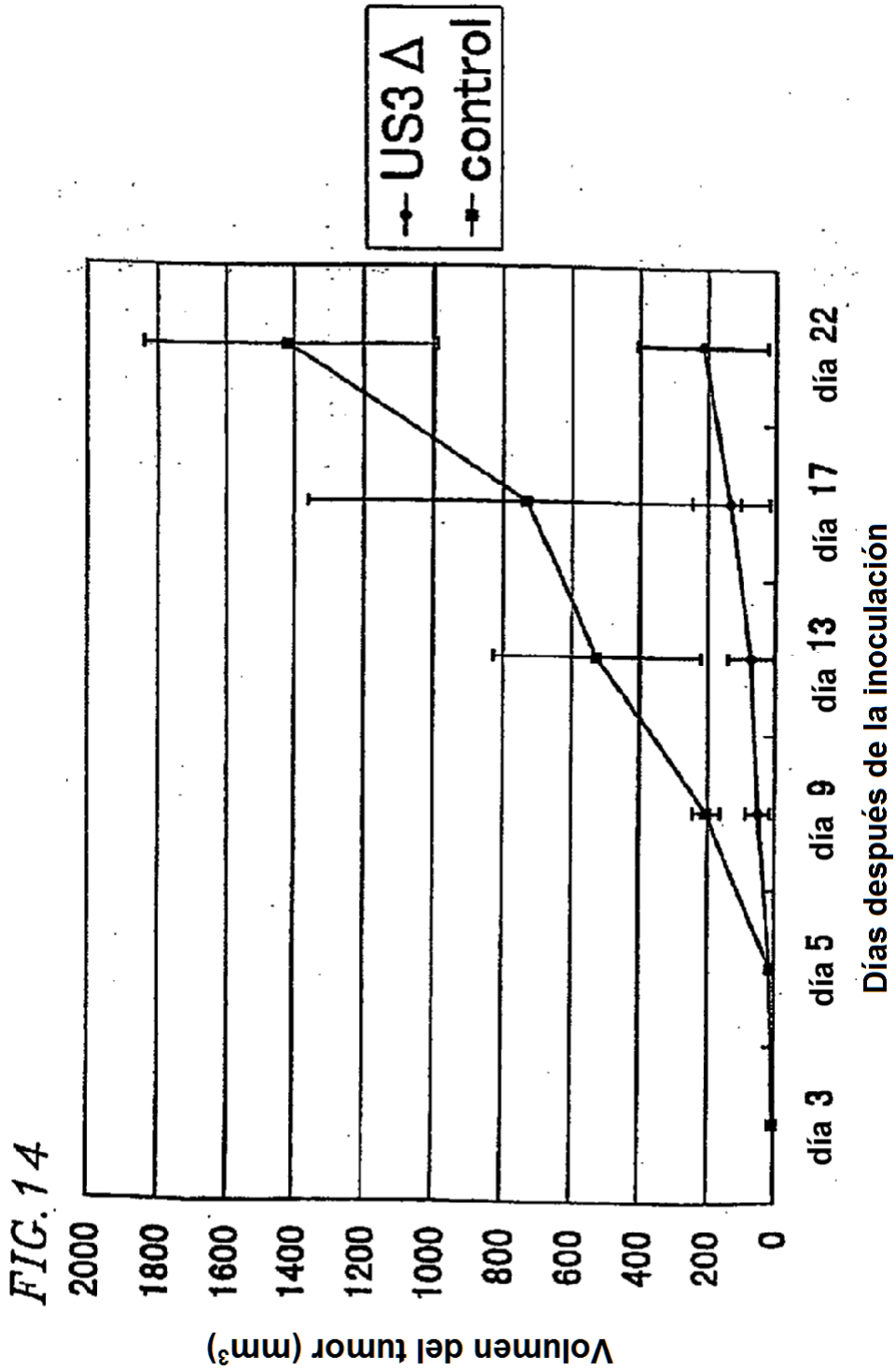
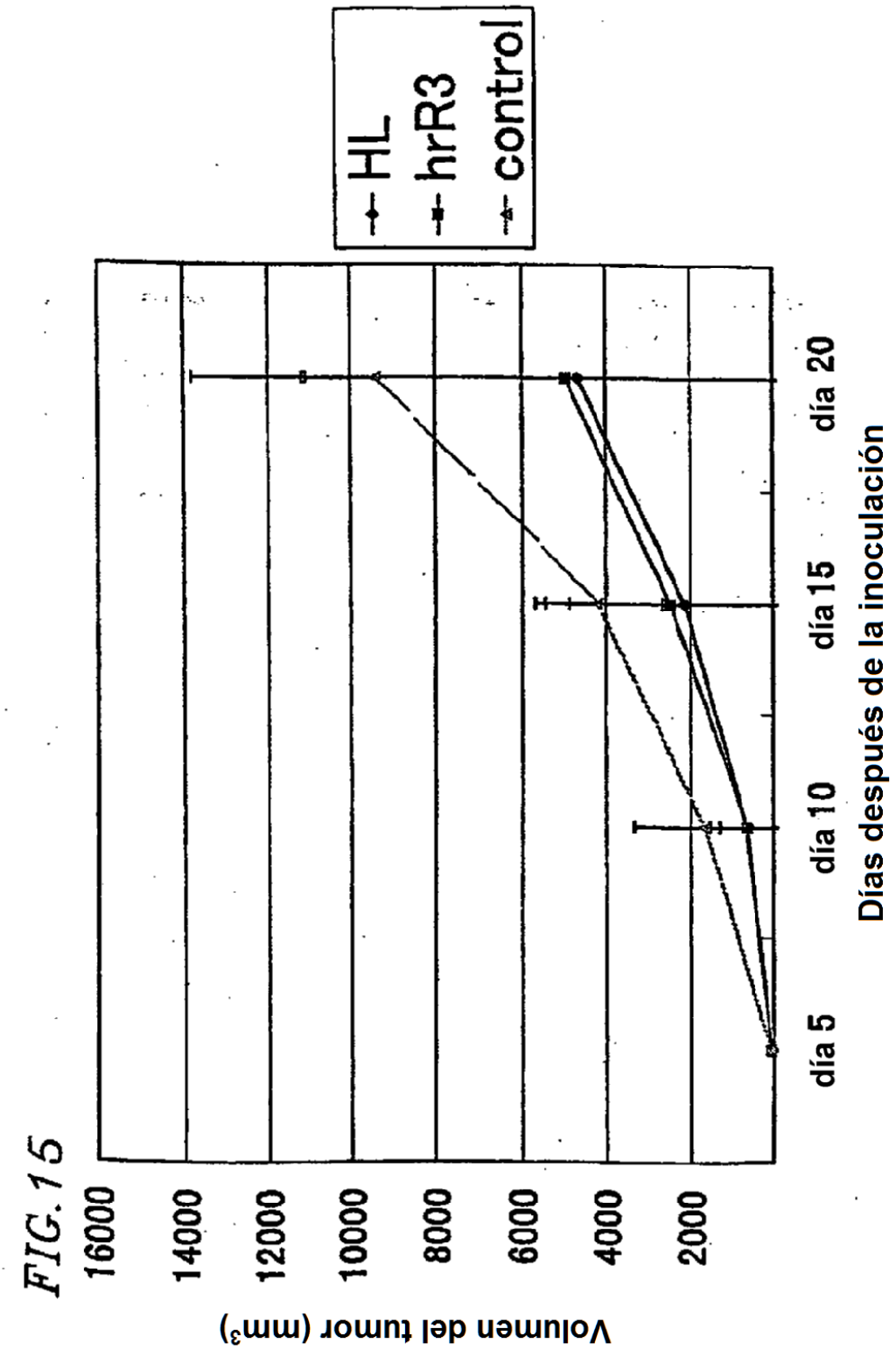

US3 Δ
control
Volumen del tumor (mm³)
2000
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
día 3
día 5
día 9
día 13
día 17
día 22
Días después de la inoculación

FIG. 15


HL
hrR3
control
16000
14000
12000
10000
8000
6000
4000
2000
Volumen del tumor (mm³)
día 5
día 10
día 15
día 20
Días después de la inoculación