

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 545 357**

51 Int. Cl.:

C12N 7/01 (2006.01)
A61K 31/7088 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C07K 14/565 (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01)
C12N 7/00 (2006.01)
C12N 15/86 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.09.2011 E 11822676 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.05.2015 EP 2611920**

54 Título: **Virus de la estomatitis vesicular**

30 Prioridad:

02.09.2010 US 379644 P

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

10.09.2015

73 Titular/es:

**MAYO FOUNDATION FOR MEDICAL EDUCATION
AND RESEARCH (100.0%)
200 First Street S.W.
Rochester, MN 55905, US**

72 Inventor/es:

**RUSSELL, STEPHEN JAMES y
NAIK, SHRUTHI**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 545 357 T3

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

DESCRIPCIÓN

Virus de la estomatitis vesicular

Información de Antecedentes

5 El virus de la estomatitis vesicular (VSV) es un miembro de la familia Rhabdoviridae. El genoma de VSV es una sola molécula de ARN de sentido negativo que codifica cinco polipéptidos principales: un polipéptido de la nucleocápside (N), un polipéptido de fosfoproteína (P), un polipéptido de la matriz (M), un polipéptido de una glicoproteína (G) y un polipéptido de la polimerasa viral (L).

10 Naik Shruti *et al.* informan en DATABASE BIOSIS [Online] BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, EE.UU. en noviembre de 2009 (11-2009) el tratamiento por ingeniería de un virus de la estomatitis vesicular genéticamente modificado, VSV-IFN-NIS, para el tratamiento del mieloma múltiple.

COMPENDIO

15 La presente invención se define por las reivindicaciones independientes 1, 6, 11 y 14, que están dirigidas a un virus de la estomatitis vesicular, a una composición que comprende virus de la estomatitis vesicular, a un ácido nucleico correspondiente y a una composición que comprende virus de la estomatitis vesicular para uso en el tratamiento del cáncer, respectivamente.

Este documento proporciona métodos y materiales relacionados con los virus de la estomatitis vesicular. Por ejemplo, este documento proporciona virus de la estomatitis vesicular, moléculas de ácido nucleico que codifican polipéptidos de VSV, métodos para preparar virus de la estomatitis vesicular y su uso para tratar el cáncer.

20 Tal como se describe en esta memoria, los virus de la estomatitis vesicular pueden ser diseñados para que tengan una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido N de VSV, un polipéptido P de VSV, un polipéptido M de VSV, un polipéptido G de VSV, un polipéptido L de VSV, un polipéptido de interferón (IFN) (p. ej., un polipéptido de IFN- β humano) y un polipéptido del simportador del yoduro de sodio (NIS) (p. ej., un polipéptido de NIS humano). El ácido nucleico que codifica el polipéptido de IFN puede estar situado entre el ácido nucleico que codifica el polipéptido M de VSV y el ácido nucleico que codifica el polipéptido G de VSV. Una posición de este tipo puede
25 permitir que los virus expresen una cantidad del polipéptido de IFN que sea eficaz para activar respuestas inmunes innatas anti-virales en tejidos no cancerosos, y así aliviar la potencial toxicidad viral, sin impedir la replicación viral eficaz en células cancerosas. El ácido nucleico que codifica el polipéptido de NIS puede estar situado entre el ácido nucleico que codifica el polipéptido G de VSV y el polipéptido L de VSV. Una posición de este tipo puede permitir
30 que los virus expresen una cantidad del polipéptido de NIS que (a) sea eficaz para permitir la acumulación selectiva de yoduro en células infectadas, permitiendo con ello tanto la formación de imágenes de la distribución viral utilizando radioisótopos como radioterapia dirigida a las células cancerosas infectadas, y (b) no sea tan alta como para ser tóxica para las células infectadas. El posicionamiento del ácido nucleico que codifica un polipéptido de IFN entre el ácido nucleico que codifica el polipéptido M de VSV y el ácido nucleico que codifica el polipéptido G de VSV y el posicionamiento del ácido nucleico que codifica un polipéptido de NIS entre el ácido nucleico que codifica el
35 polipéptido G de VSV y el polipéptido L de VSV dentro del genoma de un virus de la estomatitis vesicular puede resultar en virus de la estomatitis vesicular que sean viables, que tengan la capacidad de replicarse y extenderse, que expresen niveles apropiados de polipéptidos de IFN funcionales y que tengan niveles de expresión apropiados de polipéptidos de NIS funcionales para absorber radio-yodo tanto para la formación de imágenes como para la radioviroterapia.

40 En algunos casos, este documento presenta un virus de la estomatitis vesicular que comprende una molécula de ARN. La molécula de ARN comprende, o consiste esencialmente, en una dirección 3' a 5', en una secuencia de ácido nucleico que es un molde para un transcrito de sentido positivo que codifica un polipéptido N de VSV, una secuencia de ácido nucleico que es un molde para un transcrito de sentido positivo que codifica un polipéptido P de VSV, una secuencia de ácido nucleico que es un molde para un transcrito de sentido positivo que codifica un polipéptido M de VSV, una secuencia de ácido nucleico que es un molde para un transcrito de sentido positivo que codifica un polipéptido de IFN, una secuencia de ácido nucleico que es un molde para un transcrito de sentido positivo que codifica un polipéptido G de VSV, una secuencia de ácido nucleico que es un molde para un transcrito de sentido positivo que codifica un polipéptido de NIS y una secuencia de ácido nucleico que es un molde para un
45 transcrito de sentido positivo que codifica un polipéptido L de VSV. El polipéptido de IFN puede ser un polipéptido de IFN-beta humano. El polipéptido de NIS puede ser un polipéptido de NIS humano. El virus puede expresar el polipéptido de IFN cuando el virus infecta a una célula de mamífero. El virus puede expresar el polipéptido NIS cuando el virus infecta a una célula de mamífero.

En otro aspecto, este documento presenta una composición que comprende, o consiste esencialmente en un virus de la estomatitis vesicular que comprende una molécula de ARN. La molécula de ARN comprende, o consiste esencialmente, en una dirección 3' a 5', en una secuencia de ácido nucleico que es un molde para un transcrito de sentido positivo que codifica un polipéptido N de VSV, una secuencia de ácido nucleico que es un molde para un transcrito de sentido positivo que codifica un polipéptido P de VSV, una secuencia de ácido nucleico que es un molde para un transcrito de sentido positivo que codifica un polipéptido M de VSV, una secuencia de ácido nucleico que es un molde para un transcrito de sentido positivo que codifica un polipéptido de IFN, una secuencia de ácido nucleico que es un molde para un transcrito de sentido positivo que codifica un polipéptido G de VSV, una secuencia de ácido nucleico que es un molde para un transcrito de sentido positivo que codifica un polipéptido de NIS y una secuencia de ácido nucleico que es un molde para un transcrito de sentido positivo que codifica un polipéptido L de VSV. El polipéptido de IFN puede ser un polipéptido de IFN-beta humano. El polipéptido de NIS puede ser un polipéptido de NIS humano. El virus puede expresar el polipéptido IFN cuando el virus infecta a una célula de mamífero. El virus puede expresar el polipéptido de NIS cuando el virus infecta a una célula de mamífero.

En otro aspecto, este documento presenta una molécula de ácido nucleico que comprende una hebra de ácido nucleico que comprende, o consiste esencialmente, en una dirección 3' a 5', en una secuencia de ácido nucleico que es un molde para un transcrito de sentido positivo que codifica un polipéptido N de VSV, una secuencia de ácido nucleico que es un molde para un transcrito de sentido positivo que codifica un polipéptido P de VSV, una secuencia de ácido nucleico que es un molde para un transcrito de sentido positivo que codifica un polipéptido M de VSV, una secuencia de ácido nucleico que es un molde para un transcrito de sentido positivo que codifica un polipéptido de IFN, una secuencia de ácido nucleico que es un molde para un transcrito de sentido positivo que codifica un polipéptido G de VSV, una secuencia de ácido nucleico que es un molde para un transcrito de sentido positivo que codifica un polipéptido de NIS y una secuencia de ácido nucleico que es un molde para un transcrito de sentido positivo que codifica un polipéptido L de VSV. El polipéptido de IFN puede ser un polipéptido de IFN-beta humano. El polipéptido de NIS puede ser un polipéptido de NIS humano.

En otro aspecto, este documento presenta un método para tratar el cáncer. El método comprende, o consiste esencialmente en la administración de una composición que comprende virus de la estomatitis vesicular a un mamífero que comprende células cancerosas. Los virus de la estomatitis vesicular comprenden una molécula de ARN que comprende, o consiste esencialmente, en una dirección 3' a 5', en una secuencia de ácido nucleico que es un molde para un transcrito de sentido positivo que codifica un polipéptido N de VSV, una secuencia de ácido nucleico que es un molde para un transcrito de sentido positivo que codifica un polipéptido P de VSV, una secuencia de ácido nucleico que es un molde para un transcrito de sentido positivo que codifica un polipéptido M de VSV, una secuencia de ácido nucleico que es un molde para un transcrito de sentido positivo que codifica un polipéptido de IFN, una secuencia de ácido nucleico que es un molde para un transcrito de sentido positivo que codifica un polipéptido G de VSV, una secuencia de ácido nucleico que es un molde para un transcrito de sentido positivo que codifica un polipéptido de NIS y una secuencia de ácido nucleico que es un molde para un transcrito de sentido positivo que codifica un polipéptido L de VSV, en el que la administración de la composición al mamífero se realiza bajo condiciones en las que los virus de la estomatitis vesicular infectan a las células cancerosas para formar células cancerosas infectadas, en el que las células cancerosas infectadas expresan el polipéptido de IFN y el polipéptido de NIS, y en el que el número de las células cancerosas dentro del mamífero se reduce después de la administración. El mamífero puede ser un ser humano. El polipéptido de IFN puede ser un polipéptido de IFN-beta humano. El polipéptido de NIS puede ser un polipéptido de NIS humano.

Como un ejemplo, este documento presenta un método para inducir la regresión del tumor en un mamífero. El método comprende, o consiste esencialmente en la administración de una composición que comprende virus de la estomatitis vesicular a un mamífero que comprende un tumor. El virus de la estomatitis vesicular comprende una molécula de ARN que comprende, o consiste esencialmente en, en una dirección 3' a 5', en una secuencia de ácido nucleico que es un molde para un transcrito de sentido positivo que codifica un polipéptido N de VSV, una secuencia de ácido nucleico que es un molde para un transcrito de sentido positivo que codifica un polipéptido P de VSV, una secuencia de ácido nucleico que es un molde para un transcrito de sentido positivo que codifica un polipéptido M de VSV, una secuencia de ácido nucleico que es un molde para un transcrito de sentido positivo que codifica un polipéptido de IFN, una secuencia de ácido nucleico que es un molde para un transcrito de sentido positivo que codifica un polipéptido G de VSV, una secuencia de ácido nucleico que es un molde para un transcrito de sentido positivo que codifica un polipéptido de NIS y una secuencia de ácido nucleico que es un molde para un transcrito de sentido positivo que codifica un polipéptido L de VSV, en el que la administración de la composición al mamífero se realiza bajo condiciones en las que los virus de la estomatitis vesicular infectan a las células cancerosas para formar células tumorales infectadas, en el que las células tumorales infectadas expresan el polipéptido de IFN y el polipéptido de NIS. El mamífero puede ser un ser humano. El polipéptido de IFN puede ser un polipéptido de IFN-beta humano. El polipéptido de NIS puede ser un polipéptido de NIS humano.

A menos que se defina de otro modo, todos los términos y expresiones técnicos y científicos utilizados en esta memoria tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto ordinario en la técnica a la que pertenece

esta invención. Aunque métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en esta memoria pueden utilizarse para poner en práctica la invención, se describen a continuación métodos y materiales adecuados. En caso de conflicto, el control lo realizará la presente memoria descriptiva, incluyendo definiciones. Además, los materiales, métodos y ejemplos son únicamente ilustrativos y no pretenden ser limitativos.

- 5 Los detalles de una o más realizaciones de la invención se exponen en los dibujos que se acompañan y en la descripción siguiente. Otras características, objetos y ventajas de la invención resultarán evidentes a partir de la descripción y los dibujos, y de las reivindicaciones.

DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

10 La Figura 1A es un diagrama esquemático de la disposición del genoma de un virus de la estomatitis vesicular a modo de ejemplo que contiene ácido nucleico que codifica un polipéptido de IFN (p. ej., un polipéptido de IFN- β humano o de ratón) y el ácido nucleico que codifica un polipéptido de NIS (p. ej., un polipéptido de NIS humano). La Figura 1B es un gráfico que representa el título viral de virus de la estomatitis vesicular que contienen ácido nucleico que codifica un polipéptido de una proteína fluorescente verde (GFP) (VSV-GFP; (•)), VSV-mIFN-NIS (■), o VSV-hIFN-NIS (♦) determinado utilizando células BHK infectadas a una MOI (siglas inglesas de multiplicidad de infección) de 1,0. La Figura 1C es un gráfico que representa la absorción de yoduro de radio de células infectadas con VSV-mIFN-NIS o VSV-hIFN-NIS en presencia o ausencia de KCLO₄, un inhibidor de NIS (+ inh.). VSV-GFP se utilizó como control. La Figura 1D contiene histogramas que representa el nivel de secreción de IFN- β murino o humano medido mediante ELISA de las células infectadas simuladas o células infectadas con VSV-mIFN-NIS (VmN) o VSV-hIFN- S (VhN). La Figura 1E contiene histogramas que representan la capacidad de respuesta a IFN de células de mieloma murino 5TGM1 y MPC-11 en comparación con células de melanoma murino B-16 tal como se evaluó pre-tratando células con 100 U/mL de IFN- β murino durante 12 horas, seguido por la infección con VSV-GFP (MOI de 1,0). La Figura 1F contiene gráficos que representan los resultados de la proliferación de células viables evaluados mediante un ensayo de MTT a las 48 horas post-infección (representados como % de las células no tratadas). La oncolisis de 5TGM1 y MPC-11 se vigiló después de la infección con VSV-mIFN-NIS o VSV-hIFN-NIS (MOI de 1,0) midiendo la viabilidad celular a intervalos de 12 horas mediante el ensayo MTT.

La Figura 2A es un gráfico que representa el nivel de liberación del polipéptido de IFN a partir de células BHK infectadas con VSV-mIFN-NIS o VSV-mIFN y se vigiló a lo largo de un período de tiempo de 48 horas. Los niveles de polipéptido de IFN de ratón se midieron en el sobrenadante utilizando un ELISA diseñado para detectar niveles de expresión de polipéptidos de IFN de ratón. La Figura 2B es un gráfico que representa el nivel de la absorción de I-125 por parte de células BHK infectadas con VSV-mIFN- NIS o VSV-mIFN en el tiempo indicado (en horas).

La Figura 3 contiene los resultados de la vigilancia de la propagación intratumoral de VSV-IFN-NIS administrado por vía intravenosa. Ratones hembras C57B16/KaLwRij de 6-10 semanas de edad, portadores de tumores de mieloma 5TGM1 singénicos subcutáneos fueron tratados con una sola dosis intravenosa (IV) de 100 μ L de PBS (control) o 1×10^8 TCID₅₀ de VSV-mIFN-NIS. (A) la formación de imágenes SPECT-TAC se realizó a intervalos de 24 horas post-tratamiento después de la administración con 0,5 mCi de Tc-99m. La absorción de Tc-99m específica para el tumor se cuantificó en ratones tratados con PBS (n = 2) y ratones tratados con VSV-mIFN-NIS (n = 5). (B) la distribución viral intratumoral se vigiló recolectando tumores después de la formación de imágenes SPECT-CT y análisis corolario de la sección del tumor adyacente por autorradiografía, y se llevó a cabo una IF (inmunofluorescencia). Si se utilizó IF para detectar antígenos de VSV (que teñían rojo) y las células se sometieron a la muerte celular mediante tinción TUNEL (que teñía verde) en periodos de tiempo de 24 horas. (C) VSV intratumoral y TUNEL se cuantificaron utilizando 4 imágenes de n = 3 tumores (n = 2 a las 72 horas) utilizando el software ImageJ y que se muestran como un porcentaje del área del tumor. Hubo un aumento significativo tanto en VSV(+) como en TUNEL(+) entre 24 y 48 horas después del tratamiento utilizando el test-t (P = 0,0455 y P = 0,0163, respectivamente).

La Figura 4 contiene los resultados de la entrada viral intratumoral, la propagación y la oncolisis tras la administración intravenosa. (A) Tumores 5TGM1 se recolectaron y se analizaron mediante IF a (i) las 6 horas, (ii) las 12 horas, (iii) las 18 horas y (iv-vi) las 24 horas después de la administración intravenosa, indicando células infectadas con VSV (que tiñeron verde) y vasos sanguíneos tumorales por tinción de CD31 (que teñían rojo). Aumento 100x. (B) Vista de alto aumento de tumores tratados que muestran vasos sanguíneos tumorales intactos (que tiñen rojo) a la proximidad de (i) células tumorales infectadas con VSV (que teñían verde) y (ii) células TUNEL positivas sometidas a la muerte celular (que teñían verde) con núcleos teñidos con Hoescht (que teñían azul). (C) focos intratumoral (n = 8) de tumores recolectados a intervalos de 6 horas se midieron utilizando el software ImageJ, y el diámetro medio se representó gráficamente a lo largo del tiempo. Se midió la significancia del crecimiento en diámetro mediante el test-t, y los valores de P se muestran a lo largo de la parte superior de la gráfica. Los diámetros se utilizaron para medir el volumen medio de focos a lo largo del tiempo. (D) Se utilizaron imágenes de tumor a las 48 horas post- tratamiento con VSV-mIFN-NIS para cuantificar el borde viable de células infectadas para obtener una media de ~ 10 células infectadas en cada ronda de infección previa a la muerte celular.

La Figura 5 contiene un conjunto de tres imágenes de un tumor del mismo ratón, que se someten a la formación de imágenes SPECT-CT de cuerpo entero para vigilar la distribución viral (arriba, a la izquierda), una autorradiografía del tumor para mostrar regiones específicas de la absorción de radio-isótopos (arriba, a la derecha) y tinción anti-VSV y DAPI para mostrar que las regiones de expresión de NIS corresponden a la tinción intratumoral con VSV (parte inferior).

La Figura 6 contiene los resultados que demuestran una potente eficacia terapéutica de la administración sistémica de VSV-IFN-NIS. Ratones portadores de tumores 5TGM1 subcutáneos fueron tratados con una dosis intravenosa única de PBS, VSV-mIFN-NIS o VSV-hIFN-NIS. (A) Se midió la carga tumoral mediante mediciones del calibrador en serie para calcular el volumen del tumor a lo largo del tiempo. (B) Las respuestas de los tumores se clasificaron en progreso del tumor, regresión o regresión con recaída. La diferencia estadística en la incidencia de recaída como proporción de los ratones con regresión del tumor se midió con el ensayo Fischer Exact, indicando una tasa de recaída del tumor significativamente más alta en los ratones tratados con VSV-hIFN-NIS frente a ratones tratados con VSV-mIFN-NIS ($P = 0,009$). (C) Se midió la generación de anticuerpos neutralizantes de VSV en el suero de $n = 2$ (tratados con PBS) y $n = 3$ (tratados con VSV-IFN-NIS) ratones en los primeros 5 días post-tratamiento y se representó como la dilución múltiple mínima que protege frente a la infección con VSV 500 TCID₅₀.

La Figura 7 contiene los resultados que demuestran que la eliminación mediada inmune de las células tumorales previene la recaída del tumor. (A) La cuantificación de IFN β murino en el suero de ratones portadores de tumores 5TGM1 subcutáneos tratados por vía intravenosa con PBS, VSV-mIFN-NIS, o VSV-hIFN-NIS medido mediante ELISA. (B) Ratones que tenían una regresión completa del tumor en respuesta al tratamiento con VSV-mIFN-NIS y ratones singénicos sin tratamiento previo, de la misma edad ($n = 6$ en cada caso) se expusieron a 1×10^7 células 5TGM1 por vía subcutánea, y se muestra la aparición de tumores el día 21 post-exposición. (C) Eficacia inmunoterapéutica de células 5TGM1 infectadas con VSV de dosis única, administradas por vía subcutánea (1×10^7 células 5TGM1 infectadas con VSV-mIFN-NIS a una MOI de 10, implantadas en el flanco izquierdo) 1 día después o 5 días antes de la implantación del tumor (5×10^6 células 5TGM1 subcutáneas en el flanco derecho). Una comparación del análisis de supervivencia de rango logarítmico reveló que la vacunación (-5) días prolonga la supervivencia de los ratones después de la implantación del tumor en comparación con los ratones no vacunados ($P = 0,0253$). (D) Los ratones portadores de tumores 5TGM1 subcutáneos fueron tratados con una dosis intravenosa única de (i) PBS, (ii) VSV-mIFN-NIS o (iii) VSV-hIFN-NIS en presencia o ausencia de anticuerpos para agotar células T CD4 $^+$ o CD8 $^+$. La carga tumoral se midió mediante mediciones del calibrador en serie. (E) Las respuestas tumorales de los ratones descritos en la Figura 7D se clasificaron en progreso, regresión o regresión + recaída. Las tasas de recaída se compararon mediante el ensayo de Fischer Exact que indica que el agotamiento de células T VSV-mIFN-NIS + exhibió una mayor tasa de recidiva tumoral en comparación con el tratamiento con VSV-mIFN-NIS solo ($P = 0,0498$).

Las Figuras 8A y B son imágenes detalladas por inmunofluorescencia de los focos de infección intratumoral. Un tumor 5TGM1 se recolectó 24 horas después de la inyección intravenosa de VSV-mIFN-NIS, se congeló en OCT y se seccionó. Se realizó una IF para detectar VSV (que teñía rojo), células moribundas mediante tinción TUNEL (que teñía verde) y los núcleos de células tumorales mediante tinción Hoescht (que teñía azul). Focos intratumorales más o menos esféricos distintos de la infección por VSV contienen una región central de células infectadas con VSV sometidos a la muerte celular y un borde de células infectadas viables en la periferia.

La Figura 9 contiene imágenes que demuestran que la actividad NIS funcional se limita a regiones de células viables infectadas con VSV. Se recolectaron tumores 5TGM1 a las 48 horas (A) o 72 horas (B) después de la inyección intravenosa de VSV-IFN-NIS y se seccionaron. Las secciones adyacentes estaban sujetas a (i) autorradiografía, (ii) IF mostrada a 20 aumentos y (iii) IF mostradas a 100 aumentos para detectar VSV (que teñía rojo) y células moribundas mediante tinción TUNEL (que teñía verde).

La Figura 10 es un diagrama de regiones intragénicas a modo de ejemplo de virus de la estomatitis vesicular que contienen transgenes insertados. Los transgenes están flanqueados por secuencias de inicio y parada virales implicadas en la transcripción. El ácido nucleico de IFN se inserta en un sitio de clonación NotI introducido mediante ingeniería genética entre las secuencias M y G de ácido nucleico de VSV. El ácido nucleico de NIS se inserta en sitios de restricción XhoI y NheI introducidos mediante ingeniería genética entre las secuencias G y L de ácido nucleico VSV.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Este documento proporciona métodos y materiales relacionados con los virus de la estomatitis vesicular. Por ejemplo, este documento proporciona virus de la estomatitis vesicular, moléculas de ácido nucleico que codifican polipéptidos de VSV, métodos para preparar virus de la estomatitis vesicular y su uso para tratar el cáncer.

Tal como se describe en esta memoria, un virus de la estomatitis vesicular se puede diseñar para tener una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido N de VSV, un polipéptido P de VSV, un polipéptido M de VSV, un polipéptido G de VSV, un polipéptido L de VSV, un polipéptido IFN y un polipéptido de NIS. Se apreciará que las secuencias descritas en esta memoria con respecto a un virus de la estomatitis vesicular se incorporan en un plásmido que codifica el ADNc de sentido positivo del genoma viral que permite la generación del genoma de sentido negativo de virus de la estomatitis vesicular. Por lo tanto, se apreciará que una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido de VSV, por ejemplo, puede referirse a una secuencia de ARN que es el molde para el transcrito de sentido positivo que codifica (p. ej., a través de traducción directa) ese polipéptido.

El ácido nucleico que codifica el polipéptido de IFN puede estar dispuesto aguas abajo del ácido nucleico que codifica el polipéptido M de VSV (Figura 1A). Por ejemplo, el ácido nucleico que codifica el polipéptido de IFN puede estar dispuesto entre el ácido nucleico que codifica el polipéptido M de VSV y el ácido nucleico que codifica el polipéptido G de VSV. Una posición de este tipo puede permitir que los virus expresen una cantidad del polipéptido IFN que sea eficaz para activar respuestas inmunes innatas anti-virales en tejidos no cancerosos, y así aliviar la potencial toxicidad viral, sin impedir una replicación viral eficaz en células cancerosas.

Cualquier ácido nucleico apropiada que codifique un polipéptido de IFN se puede insertar en el genoma de un virus de la estomatitis vesicular. Por ejemplo, el ácido nucleico que codifica un polipéptido de IFN-beta se puede insertar en el genoma de un virus de la estomatitis vesicular. Ejemplos de un ácido nucleico que codifica polipéptidos de IFN-beta que se pueden insertar en el genoma de un virus de la estomatitis vesicular incluyen, sin limitación, ácido nucleico que codifica un polipéptido de IFN-beta humano de la secuencia de ácido nucleico recogida en GenBank® N° de Acceso NM_002176.2 (GI N° 50593016), ácido nucleico que codifica un polipéptido de IFN-beta de ratón de la secuencia de ácido nucleico recogida en GenBank® N°s de acceso NM_010510.1 (GI N° 6754303), BC119395.1 (GI N° 111601321) o BC119397.1 (GI N° 111601034) y ácido nucleico que codifica un polipéptido de IFN-beta de rata de la secuencia de ácido nucleico recogida en GenBank® N° de Acceso NM_019127.1 (GI N° 9506800).

El ácido nucleico que codifica el polipéptido de NIS puede estar dispuesto aguas abajo del ácido nucleico que codifica el polipéptido G de VSV (Figura 1A). Por ejemplo, el ácido nucleico que codifica el polipéptido de NIS puede estar dispuesto entre el ácido nucleico que codifica el polipéptido G de VSV y el ácido nucleico que codifica el polipéptido L de VSV. Una posición de este tipo puede permitir que los virus expresen una cantidad del polipéptido de NIS que (a) sea eficaz para permitir la acumulación selectiva de yoduro en las células infectadas, permitiendo con ello tanto una formación de imágenes de la distribución viral utilizando radioisótopos como una radioterapia dirigida a las células cancerosas infectadas, y (b) no sea tan alta como para ser tóxica para las células infectadas.

Cualquier ácido nucleico apropiado que codifica un polipéptido de NIS se puede insertar en el genoma de un virus de la estomatitis vesicular. Por ejemplo, el ácido nucleico que codifica un polipéptido de NIS humano puede ser insertado en el genoma de un virus de la estomatitis vesicular. Ejemplos de polipéptidos de NIS que codifican ácido nucleico que se pueden insertar en el genoma de un virus de la estomatitis vesicular incluyen, sin limitación, ácido nucleico que codifica un polipéptido de NIS humano de la secuencia de ácido nucleico recogida en GenBank® N°s de Acceso NM_000453.2 (GI N°164663746), BC105049.1 (GI N° 85397913) o BC105047.1 (GI N° 85397519), ácido nucleico que codifica un polipéptido de NIS de ratón de la secuencia de ácido nucleico recogida en GenBank® N°s Acceso NM_053248.2 (GI N° 162138896), AF380353.1 (GI N° 14290144) o AF235001.1 (GI N° 12642413), el ácido nucleico que codifica un polipéptido de NIS de chimpancé de la secuencia de ácido nucleico recogida en GenBank® N° de Acceso XM_524154 (GI N° 114676080), el ácido nucleico que codifica un polipéptido de NIS de perro de la secuencia de ácido nucleico recogida en GenBank® N° de Acceso XM_541946 (GI N° 73986161), el ácido nucleico que codifica un polipéptido de NIS de vaca de la secuencia de ácido nucleico recogida en GenBank® N° de Acceso XM_581578 (GI N° 297466916), el ácido nucleico que codifica un polipéptido de NIS de cerdo de la secuencia de ácido nucleico recogida en GenBank® N° de Acceso NM_214410 (GI N° 47523871) y el ácido nucleico que codifica un polipéptido de NIS rata de la secuencia de ácido nucleico recogida en GenBank® n° de Acceso NM_052983 (GI N° 158138504).

El ácido nucleico insertado en el genoma de un virus de la estomatitis vesicular (p. ej., el ácido nucleico que codifica un polipéptido de NIS y/o el ácido nucleico que codifica un polipéptido de IFN) puede estar flanqueado por regiones intragénicas virales que contienen los códigos de inicio y parada de la transcripción de genes, requeridos para la transcripción de las secuencias de ácidos nucleicos insertadas por parte de la polimerasa viral. Ejemplos de regiones intragénicas virales de este tipo incluyen, sin limitación, las recogidas en la Figura 10.

Las secuencias de ácido nucleico de un virus de la estomatitis vesicular proporcionadas en esta memoria que codifican un polipéptido N de VSV, un polipéptido P de VSV, un polipéptido M de VSV, un polipéptido G de VSV y un polipéptido L de VSV pueden ser de una cepa Indiana de VSV como la recogida en GenBank® N°s de Acceso NC_001560 (GI N° 9627229), o puede ser de una cepa New Jersey de VSV.

En un aspecto, este documento proporciona virus de la estomatitis vesicular que contienen una molécula de ácido nucleico (p. ej., una molécula de ARN) que tiene, en una dirección 3' a 5', una secuencia de ácido nucleico que es un molde para un transcrito de sentido positivo que codifica un polipéptido N de VSV, una secuencia de ácido nucleico que es un molde para un transcrito de sentido positivo que codifica un polipéptido P de VSV, una secuencia de ácido nucleico que es un molde para un transcrito de sentido positivo que codifica un polipéptido M de VSV, una secuencia de ácido nucleico que es un molde para un transcrito de sentido positivo que codifica un polipéptido de IFN, una secuencia de ácido nucleico que es un molde para un transcrito de sentido positivo que codifica un polipéptido G de VSV, una secuencia de ácido nucleico que es un molde para un transcrito de sentido positivo que codifica un polipéptido de NIS, y una secuencia de ácido nucleico que es un molde para un transcrito de sentido positivo que codifica un polipéptido L de VSV. Virus de la estomatitis vesicular de este tipo pueden infectar células (p. ej., células cancerosas) y dirigir la expresión del polipéptido de IFN y el polipéptido de NIS por parte de las células infectadas.

Se puede utilizar cualquier método apropiado para insertar ácido nucleico (p. ej., ácido nucleico que codifica un polipéptido de IFN y/o ácido nucleico que codifica un polipéptido de NIS) en el genoma de un virus de la estomatitis vesicular. Por ejemplo, los métodos descritos en otra parte (Obuchi *et al*, *J. Virol.*, 77(16):8843-56 (2003)); Goel *et al*, *Blood*, 110(7):2342-50 (2007)); y Kelly *et al*, *J. Virol.*, 84(3):1550-1562 (2010)) se pueden utilizar para insertar ácido nucleico en el genoma de un virus de la estomatitis vesicular. Se puede utilizar cualquier método adecuado para identificar virus de la estomatitis vesicular que contienen una molécula de ácido nucleico descrita en esta memoria. Métodos de este tipo incluyen, sin limitación, la PCR y técnicas de hibridación de ácidos nucleicos tales como análisis Northern y Southern. En algunos casos, se pueden utilizar la inmunohistoquímica y técnicas bioquímicas para determinar si un virus de la estomatitis vesicular contiene una molécula de ácido nucleico particular detectando la expresión de un polipéptido codificado por esa molécula de ácido nucleico particular.

En otro aspecto, este documento proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido N de VSV, un polipéptido P de VSV, un polipéptido M de VSV, un polipéptido de IFN, un polipéptido G de VSV, un polipéptido de NIS y un polipéptido L de VSV. Por ejemplo, una molécula de ácido nucleico proporcionada en esta memoria puede ser una molécula de ácido nucleico sencilla que incluye una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido N de VSV, una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido P de VSV, una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido M de VSV, una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido de IFN, una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido G de VSV, una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido de NIS y una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido L de VSV.

La expresión "ácido nucleico", tal como se utiliza en esta memoria, abarca tanto ARN (p. ej., ARN viral) como ADN, incluyendo ADNc, ADN genómico y ADN sintético (p. ej., sintetizado químicamente). Un ácido nucleico puede ser de doble cadena o de cadena sencilla. Un ácido nucleico de cadena sencilla puede ser la cadena sentido o la cadena anti-sentido. Además, un ácido nucleico puede ser circular o lineal.

Este documento también proporciona un método para tratar el cáncer (p. ej., para reducir el tamaño del tumor, inhibir el crecimiento del tumor o reducir el número de células tumorales viables). Por ejemplo, un virus de la estomatitis vesicular proporcionado en esta memoria se puede administrar a un mamífero que tiene cáncer para reducir el tamaño del tumor, para inhibir el crecimiento de células cancerosas o del tumor y/o para reducir el número de células cancerosas viables dentro del mamífero. Un virus de la estomatitis vesicular proporcionado en esta memoria puede ser propagado en células huésped con el fin de aumentar el número disponible de copias de ese virus, típicamente en al menos 2 veces (p. ej., de 5 a 10 veces, de 50 a 100 veces, de 500 a 1000 veces, o incluso en tanto como 5.000 a 10.000 veces). En algunos casos, un virus de la estomatitis vesicular proporcionado en esta memoria puede ser propagado hasta que se obtenga una concentración deseada en los medios de cultivo celular estándares (p. ej., DMEM o RPMI-1640 suplementado con suero bovino fetal al 5-10% a 37°C en 5% de CO₂). Un título viral se somete a ensayo típicamente mediante la inoculación de células (p. ej., células BHK-21) en cultivo.

Virus de la estomatitis vesicular proporcionados en esta memoria pueden administrarse a un paciente de cáncer, por ejemplo, mediante inyección directa en un grupo de células cancerosas (p. ej., un tumor) o administración intravenosa a células cancerosas. Un virus de la estomatitis vesicular proporcionado en esta memoria se puede utilizar para tratar diferentes tipos de cáncer, incluyendo, sin limitación, mieloma (p. ej., mieloma múltiple), melanoma, glioma, linfoma, mesotelioma y cánceres de pulmón, cerebro, estómago, colon, recto, riñón, próstata, ovario, mama, páncreas, hígado y de cabeza y cuello.

Virus de la estomatitis vesicular proporcionados en esta memoria se pueden administrar a un paciente en una disolución biológicamente compatible o un vehículo de administración farmacéuticamente aceptable, mediante administración ya sea directamente en un grupo de células cancerosas (p. ej., por vía intratumoral) o sistémicamente (p. ej., por vía intravenosa). Formulaciones farmacéuticas adecuadas dependen, en parte, del uso y la vía de entrada, p. ej., transdérmica o por inyección. Estas formas no deberían impedir que la composición o formulación alcance una célula diana (es decir, una célula a la que se desea el virus a ser suministrado) o ejerza su efecto. Por ejemplo, las composiciones farmacológicas inyectadas en el torrente sanguíneo deberían ser solubles.

Mientras que las dosificaciones administradas variarán de paciente a paciente (p. ej., dependiendo del tamaño de un tumor), se puede determinar una dosis eficaz estableciendo como límite inferior la concentración de virus que ha demostrado ser segura y aumentando a dosis más altas de hasta 10^{12} pfu, al tiempo que se monitoriza para una reducción en el crecimiento de células cancerosas junto con la presencia de cualesquiera efectos secundarios perjudiciales. Una dosis terapéuticamente eficaz proporciona típicamente al menos una reducción del 10% en el número de células cancerosas o en el tamaño del tumor. Se pueden utilizar estudios de aumento de la dosis para obtener un efecto deseado para un tratamiento viral dado (véase, p. ej., Nies y Spielberg, "Principles of Therapeutics," En Goodman y Gilman *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, comps. Hardman, et al, McGraw-Hill, NY, 1996, págs. 43-62).

Virus de la estomatitis vesicular proporcionados en esta memoria pueden ser suministrados en una dosis que oscila, por ejemplo, entre aproximadamente 10^3 pfu y aproximadamente 10^{12} pfu (p. ej., entre aproximadamente 10^5 pfu y aproximadamente 10^{12} pfu, entre aproximadamente 10^6 pfu y aproximadamente 10^{11} pfu o entre aproximadamente 10^6 pfu y aproximadamente 10^{10} pfu). Una dosis terapéuticamente eficaz puede ser proporcionada en dosis repetidas. La dosificación repetida es apropiada en los casos en los que las observaciones de síntomas clínicos o ensayos de tamaño del tumor o de vigilancia indiquen que un grupo de células cancerosas o tumor ha dejado de disminuir o que el grado de actividad viral está disminuyendo mientras que el tumor todavía está presente. Dosis repetidas pueden ser administradas por la misma vía que la utilizada inicialmente o por otra vía. Una dosis terapéuticamente eficaz puede ser suministrada en varias dosis discretas (p. ej., días o semanas de diferencia), y en una realización, se proporcionan de una a aproximadamente doce dosis. Alternativamente, una dosis terapéuticamente eficaz de virus de la estomatitis vesicular proporcionada en esta memoria puede ser suministrada por una formulación de liberación sostenida. En algunos casos, un virus de la estomatitis vesicular proporcionado en esta memoria puede ser suministrado en combinación con agentes farmacológicos que facilitan la replicación viral y se propagan dentro de las células cancerosas o agentes que protegen a células no cancerosas frente a una toxicidad viral. Ejemplos de este tipo de agentes se describen en otro lugar (Alvarez-Breckenridge *et al*, *Chem. Rev.*, 109(7):3125-40 (2009)).

Virus de la estomatitis vesicular proporcionados en esta memoria pueden administrarse utilizando un dispositivo para proporcionar una liberación sostenida. Una formulación para la liberación sostenida de virus de la estomatitis vesicular puede incluir, por ejemplo, un excipiente polimérico (p. ej., un gel expandible o no expandible, o colágeno). Una dosis terapéuticamente eficaz de virus de la estomatitis vesicular se puede proporcionar dentro de un excipiente polimérico, en el que la composición del excipiente/virus se implanta en un sitio de las células cancerosas (p. ej., en la proximidad de o dentro de un tumor). La acción de los fluidos corporales disuelve gradualmente el excipiente y libera continuamente la dosis eficaz de virus a lo largo de un período de tiempo. Alternativamente, un dispositivo de liberación sostenida puede contener una serie de capas activas y de espaciador alternantes. Cada una de las capas activas de un dispositivo de este tipo contiene típicamente una dosis de virus embebido en excipiente, mientras que cada una de las capas de espaciador contiene sólo excipiente o concentraciones bajas de virus (es decir, inferiores a la dosis eficaz). A medida que se disuelve cada una de las capas sucesivas del dispositivo, se suministran dosis pulsadas de virus. El tamaño/formulación de las capas de espaciador determina el intervalo de tiempo entre dosis y se optimiza de acuerdo con el régimen terapéutico que se esté utilizando.

Virus de la estomatitis vesicular proporcionados en esta memoria pueden administrarse directamente. Por ejemplo, un virus puede inyectarse directamente en un tumor (p. ej., un tumor de cáncer de mama) que es palpable a través de la piel. La guía por ultrasonidos también puede ser utilizada en un método de este tipo. Alternativamente, la administración directa de un virus se puede lograr a través de una línea de catéter u otro dispositivo de acceso médico, y se puede utilizar en unión con un sistema de formación de imágenes para localizar un grupo de células cancerosas. Mediante este método, un dispositivo de dosificación implantable se dispone típicamente en proximidad a un grupo de células cancerosas utilizando un alambre de guía insertado en el dispositivo de acceso médico. Una dosis eficaz de un virus de la estomatitis vesicular proporcionado en esta memoria se puede administrar directamente a un grupo de células cancerosas que es visible en un campo quirúrgico expuesto.

En algunos casos, los virus de la estomatitis vesicular proporcionados en esta memoria pueden ser suministrados por vía sistémica. Por ejemplo, la administración sistémica se puede conseguir por vía intravenosa a través de inyección o por medio de un dispositivo de administración intravenosa diseñado para la administración de dosis múltiples de un medicamento. Dispositivos de este tipo incluyen, pero no se limitan a agujas de infusión con alas, catéteres intravenosos periféricos, catéteres de línea media, catéteres centrales insertados periféricamente y catéteres o puertos colocados quirúrgicamente.

El curso de la terapia con un virus de la estomatitis vesicular proporcionada en esta memoria puede ser monitorizado evaluando los cambios en los síntomas clínicos o mediante monitorización directa del número de células cancerosas o el tamaño de un tumor. Para un tumor sólido, la eficacia del tratamiento con virus se puede evaluar midiendo el tamaño o peso del tumor antes y después del tratamiento. El tamaño del tumor se puede medir ya sea directamente (p. ej., utilizando calibres) o utilizando técnicas de formación de imágenes (p. ej., rayos X, formación de imágenes

por resonancia magnética o tomografía computarizada) o evaluando los datos ópticos sin formación de imágenes (p. ej., datos espectrales). Para un grupo de células cancerosas (por ejemplo, células de leucemia), la eficacia del tratamiento viral puede ser determinada midiendo el número absoluto de células de leucemia en la circulación de un paciente antes y después del tratamiento. La eficacia del tratamiento viral también se puede evaluar mediante el control de los niveles de un antígeno específico para el cáncer. Antígenos específicos para el cáncer incluyen, por ejemplo, antígeno carcinoembrionario (CEA), antígeno específico para la próstata (PSA), fosfatasa ácida prostática (PAP), CA 125, alfa-fetoproteína (AFP), antígeno de carbohidrato 15-3 y antígeno de carbohidrato 19-4.

La invención se describirá adicionalmente en los siguientes Ejemplos, que no limitan el alcance de la invención descrita en las reivindicaciones.

10 EJEMPLOS

Ejemplo 1- La viroterapia intravenosa de dosis única utilizando virus de la estomatitis vesicular que expresan un polipéptido de IFN y/o un polipéptido de NIS media en la citorreducción tumoral oncolítica y en la erradicación inmunoterapéutica de la enfermedad residual

Se crearon virus de la estomatitis vesicular diseñados para expresar un polipéptido de IFN-beta de ratón (VSV-mIFN) y virus de la estomatitis vesicular diseñados para expresar tanto un polipéptido de IFN-beta de ratón como un polipéptido de NIS humana (VSV-mIFN-NIS; Figura 1A) utilizando métodos similares a los descritos en otra parte (Obuchi *et al.*, *J. Virol*, 77(16):8843- 56 (2003)); Goel *et al.*, *Blood*, 110(7): 2342-50 (2007)); Kelly *et al.*, *J. Virol*, 84(3):1550- 62 (2010); y Lawson *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 92(10):4477-81 (1995) Erratum en: *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 92(19):9009 (1995)). Del mismo modo, se crearon los virus de la estomatitis vesicular diseñados para expresar un polipéptido de IFN-beta humano y un polipéptido de NIS humano (VSV-hIFN-NIS; Figura 1A). En síntesis, se generaron las secuencias de ácido nucleico de transgenes deseados con sitios de restricción específicos utilizando la PCR. Los transgenes se insertaron en los sitios de inserción específicos en un plásmido que codifica la cadena positiva del genoma de VSV en una orientación 5' a 3'. El plásmido modificado se propagó y se recuperó virus infeccioso mediante la infección con virus vacuna que codifican la polimerasa T7 requerida y la transfección de proteínas virales N, P y L de VSV. Esto permitió la producción de polipéptidos virales requeridos que permiten la generación del genoma viral de sentido negativo que estaba ensamblado en viriones infecciosos. El virus recuperado se amplificó, y la dosis infecciosa se midió en una línea celular adecuada en cultivo (p. ej., células BHK-21). La secuencia de ácido nucleico del polipéptido de IFN-beta de ratón utilizado para hacer estos virus de la estomatitis vesicular se recoge en GenBank® N° de Acceso NM_010510.1 (GI N° 6754303). La secuencia de ácido nucleico del polipéptido de IFN-beta humano utilizado para hacer estos virus de la estomatitis vesicular se recoge en GenBank® N° de Acceso NM_002176.2 (GI N° 50593016). La secuencia de ácido nucleico del polipéptido de NIS humano utilizado para hacer estos virus de la estomatitis vesicular se recoge en GenBank® N° de Acceso NM_000453.2 (GI N°164663746).

Cuando se insertó el ácido nucleico que codifica el polipéptido de NIS humano aguas arriba del ácido nucleico que codifica el polipéptido G de VSV, no se generaron los viriones funcionales, debido a que los niveles de expresión de NIS parecen haber sido demasiado elevados para que las células permanezcan siendo viables y permitan la propagación viral. La inserción de ácido nucleico que codifica el polipéptido de NIS aguas abajo del ácido nucleico que codifica el polipéptido G de VSV resultó en la generación de viriones que expresan NIS funcionales debido a que se están produciendo menores cantidades de polipéptido de NIS, permitiendo de este modo no sólo una propagación viral eficiente, sino también cantidades suficientes de polipéptido de NIS para la absorción de yoduro funcional en las células infectadas (Figura 2B).

La inserción de ácido nucleico que codifica un polipéptido de IFN entre el ácido nucleico que codifica el polipéptido M de VSV y el ácido nucleico que codifica el polipéptido G de VSV dio como resultado virus que infectaban células y producían un nivel de expresión significativamente incrementado del polipéptido de IFN que se observó en el sobrenadante de las células infectadas (Figura 2A). Los virus VSV-IFN-NIS eran capaces de replicarse eficientemente *in vitro* en células infectadas y también de expresar elevados niveles de NIS funcional, según se muestra por la capacidad de las células infectadas a absorber yoduro de radio (Figura 2B).

Materiales purificados de los dos virus VSV-IFN-NIS se titularon en células BHK (de hámster) (Figura 1B), y los sobrenadantes celulares se recolectaron para confirmar la secreción de IFN- β codificada viralmente. Se detectaron altas concentraciones de IFN- β humano o murino en sobrenadantes de células BHK infectadas con VSV-hIFN-NIS y VSV-mIFN-NIS, respectivamente (Figura 1D), y estudios de absorción de radioyodo confirmaron la concentración sensible a perclorato (es decir, mediada por NIS) de yodo radiactivo en las células infectadas por virus (Figura 1C), como máximo a las 24 horas después de la infección alta multiplicidad.

Para evaluar la actividad *in vivo* de los virus VSV-IFN-NIS, se eligieron las líneas celulares de mieloma murinas 5TGM1 y MPC-11, porque forman de manera fiable tumores subcutáneos u ortotópicos en ratones singénicos inmunocompetentes (Lichty *et al.*, *Hum. Gene Ther.*, 15:821-831 (2004) y Turner *et al.*, *Human Gene Therapy*, 9:1121-1130 (1998)). Se confirmó que ambas líneas eran susceptibles a la infección por VSV-IFN-NIS (Figura 1E), resultando en la expresión funcional de NIS, la liberación de IFN- β y la subsiguiente muerte celular. Para determinar si los virus VSV-IFN-NIS administrados por vía intravenosa podrían extravasarse de los vasos sanguíneos del tumor y propagarse a través del parénquima del tumor, se hicieron crecer tumores 5TGM1 o MPC-11 subcutáneos (~ 5 mm de diámetro) en ratones singénicos, se administró una dosis intravenosa única de virus 10^8 TCID₅₀ de VSV-IFN-NIS, y la biodistribución de la expresión de NIS viralmente codificada se vigiló de forma no invasiva mediante la formación de imágenes SPECT/CT diariamente utilizando ^{99m}TcO₄ (semivida de 6 horas) como trazador (Figura 3A). Estos estudios de absorción del trazador indicaron que el virus se estaba extravasando eficientemente de los vasos sanguíneos del tumor y sugirieron que puede propagarse rápidamente en los tumores subcutáneos.

Para confirmar que el virus se estaba realmente replicando y propagando en el parénquima del tumor, los tumores seleccionados se recolectaron inmediatamente después de la formación de imágenes SPECT/CT a las 24, 48 y 72 horas post-administración del virus VSV-IFN-NIS y se sometieron a (i) autorradiografía para detectar células tumorales que expresan NIS viables; (ii) inmunofluorescencia (IF) para detectar antígenos de VSV y (iii) tinción TUNEL para identificar células muertas o moribundas.

El análisis cuidadoso de los datos mostrados en la Figura 3B indica la existencia de grandes zonas, aproximadamente esféricas, de la infección por VSV, en donde las células tumorales en el centro eran apoptóticas y las de la periferia permanecieron siendo viables (véase también la Figura 8), expresan NIS (Figura 5) y concentrar ^{99m}TcO₄ (Figura 9). El análisis cuantitativo de los datos de IF y TUNEL indica un aumento significativo en el número de células infectadas por virus y apoptóticas entre las 24 y 48 horas post-administración del virus (Figura 3C). Cerca de 72 horas después de la infección, las zonas crecientes de la infección por VSV se unieron en gran medida, dando como resultado la destrucción total del tumor (Figura 3B y Figura 8).

Se llevaron a cabo experimentos adicionales para caracterizar la cinética de propagación del virus en instantes muy tempranos, durante las primeras 24 horas después de la administración de virus (Figura 4A). El análisis de las secciones del tumor recolectadas 6 horas después de la administración IV de virus y teñidas para vasos sanguíneos tanto VSV- como CD31-positivos reveló células infectadas por VSV dispersadas individuales, particularmente cerca de los vasos sanguíneos del tumor. Hacia 12 horas, eran visibles pequeños racimos de células infectadas por virus y hacia 18 horas crecieron significativamente hasta que hacia 24 horas exhibieron la apariencia típica apoptótica descrita anteriormente en el centro y viable en la periferia. El análisis de estas secciones teñidas duales CD31/VSV (Figura 4A, paneles i-vi) indicó que las células endoteliales que recubren los vasos sanguíneos del tumor no sucumbieron a la infección por VSV, aun cuando está completamente rodeada por las células tumorales infectadas con VSV, mostrado en una elevada ampliación en la Figura 4B. Trazando diámetros medios de centros infecciosos (medidos como número de células a través) en los instantes de 6, 12, 18 y 24 horas (Figura 4C), parecía que el virus se propagó por centrifugación a una velocidad constante, tardando aproximadamente 2 horas para infectar cada una de las capas sucesivas de células en la esfera en expansión. Por lo tanto, la tasa de acumulación de nuevas células en cada uno de los centros infecciosos, aumentó a medida que la infección avanzaba, y se estimó que cada uno de los centros contenía aproximadamente 10.000 células hacia 24 horas después del suministro de virus.

Para determinar el tiempo aproximado desde la infección hasta la muerte de las células tumorales infectadas *in vivo*, se midió que el diámetro medio del borde de células viables, infectadas por VSV (es decir, TUNEL-negativas, VSV-positivas) en el borde de avance de la infección intratumoral, era aproximadamente 10 células (Figura 4D). Así, el virus se propagó de forma centrífuga y tardó aproximadamente 2 horas para hacer pasar el virus a una célula adyacente (Figura 4C), mientras que la muerte celular no se producía hasta que el borde de las células infectadas avanzaba en 10 diámetros celulares (Figura 4D). Combinando estas observaciones, se concluyó que se tarda aproximadamente 20 horas para que una célula infectada se convierta en apoptótica.

Para determinar si la extravasación eficiente y la rápida propagación intratumoral del virus se asocia con la regresión del tumor, grupos adicionales de ratones C57KaLwRij con tumores 5TGM1 subcutáneos fueron tratados con una dosis intravenosa única de 10^8 TCID₅₀ de VSV-IFN-NIS y fue seguido a más largo plazo con controles del estado de salud diarios y mediciones del tumor. Los tumores retrocedieron rápidamente en la mayoría de los animales tratados con VSV-mIFN-NIS y VSV- hIFN-NIS (Figura 6A). Muertes muy tempranas ocasionales no fueron asociadas a una neurotoxicidad y se presume que se debieron al síndrome de lisis rápida del tumor, aunque esto no se demostró formalmente. Curiosamente, dos a tres semanas después de la administración de la terapia viral, se observó una recurrencia del tumor en la mayoría de los animales tratados con VSV-hIFN-NIS, pero no en los tratados con VSV-mIFN-NIS (Figuras 6A y 6B), lo que sugiere que el IFN- β de ratón codificado viralmente, pero no el IFN- β humano era capaz de activar mecanismos que conducen a la erradicación completa de la enfermedad residual en este modelo de ratón inmunocompetente singénico. No se intentó una repetición del tratamiento de las recaídas de

tumores con VSV-IFN-NIS, ya que todos los ratones habían desarrollado en ese momento altos títulos de anticuerpos anti-VSV (Figura 6C).

5 La medición de los niveles de IFN- β en suero en animales tratados con virus indicó que esta citocina codificada por el virus es liberada en el torrente sanguíneo por células tumorales infectadas por virus en los instantes tempranos tras la administración de virus (Figura 7A). Acciones antitumorales de interferón beta incluyen la inhibición directa de la proliferación de células tumorales, la activación de las células asesinas naturales, una anti-angiogénesis y la potenciación de las respuestas de células T antitumorales. Sin embargo, la proliferación de células de mieloma 5TGM1 y MPC11 *in vitro* no se vio afectada negativamente incluso a altas concentraciones de IFN- β (figura 1F). Además de ello, el análisis de CD31 o secciones teñidas de CD3 de tumores tratados con virus no revelaron evidencia alguna de una inhibición de la actividad anti-angiogénica, ni para la infiltración del tumor por parte de linfocitos T huésped (Figura 4B). Sin embargo, los animales tratados con virus, cuyos tumores no se repetían, resultaron ser resistentes a la re-estimulación con células tumorales 5TGM1 (Figura 7B), indicando que los ratones habían desarrollado una inmunidad antitumoral específica contra 5TGM1. Para determinar si células de mieloma singénicas infectadas por VSV podrían provocar una respuesta inmune específica anti-mieloma, los ratones singénicos se inmunizaron con una sola inyección subcutánea de 10^7 células 5TGM1 infectadas con VSV, ya sea un día después o cinco días antes de la implantación subcutánea de células tumorales. Se retrasó el crecimiento del tumor, resultando en una mejora significativa de la supervivencia en ratones que se inmunizaron 5 días antes del enfrentamiento con el tumor (Figura 7C), indicando que las células tumorales infectadas con VSV provocaron una respuesta inmune antitumoral modesta. Sin embargo, la vacuna de células tumorales infectadas con VSV no exhibió actividad antitumoral detectable alguna en ratones portadores de incluso pequeños tumores establecidos, lo que sugiere que la inmunidad antitumoral era eficaz sólo en el contexto de la carga de enfermedad mínima.

Para determinar si las tasas más bajas de recaída del tumor en los ratones tratados con VSV-mIFN-NIS podrían atribuirse a IFN- β codificada viralmente que potencia la respuesta antitumoral de células T, se usó un cóctel de anticuerpos anti-CD8 y anti-CD4 para agotar las células T. Los tumores respondieron igualmente bien a la terapia intravenosa con VSV-mIFN-NIS, independientemente del estado de agotamiento de las células T, pero la tasa de recurrencia del tumor era significativamente mayor en ratones agotados en células T (Figuras 7D y 7E). Estos resultados indican que la erradicación de células tumorales residuales después de la citorreducción oncolítica por VSV-mIFN-NIS estaba mediada por células T específicas para tumores, cuya amplificación fue estimulada por el IFN- β de ratón codificado viralmente.

30 Cuando se compara con el virus VSV-A51-NIS descrito en la referencia de Goel *et al.* (Blood, 110(7):2342-50 (2007)), que exhibió una débil eficacia oncolítica en el modelo de ratón de mieloma 5TGM1 múltiple singénico inmunocompetente (C57BL/KalwRijHsd), los virus VSV-IFN y VSV-IFN-NIS exhibieron cinéticas de replicación enormemente superiores. Además, en comparación con el virus VSV- Δ 51-NIS, los virus VSV-IFN-NIS inducían una mayor expresión del polipéptido de NIS *in vitro*. En la terapia *in vivo* estudios demostraron que una dosis intravenosa única de cada uno de los virus VSV-IFN y VSV-IFN-NIS fomentaba una regresión del tumor y prolongaba significativamente la supervivencia de los ratones inmunocompetentes portadores de tumores de mieloma 5TGM1 subcutáneas o ortotópicas. Estudios de formación de imágenes con Tc-99m realizados en ratones tratados con virus VSV-IFN-NIS exhibían una expresión del polipéptido de NIS viral específica para el tumor y una absorción de radioisótopos que aumentaba simultáneamente con la propagación viral intratumoral. Además, no había indicios de neurotoxicidad tras el tratamiento con los virus VSV-IFN y VSV-IFN-NIS. Estos resultados indican que los virus VSV-IFN-NIS se pueden utilizar como un agente terapéutico para el cáncer (p. ej., mieloma múltiple) que se puede combinar con radio-isótopos tanto para formación de imágenes no invasiva de la biodistribución viral como para la radioviroterapia.

45 Los resultados proporcionados en esta memoria demuestran que los virus de la estomatitis vesicular que codifican IFN- β humano exhiben una eficacia oncolítica de NIS humana *in vivo* en un modelo de ratón inmunocompetente del mieloma múltiple. Virus administrado de modo sistémico era capaz de replicarse en el tumor, de expresar niveles suficientes de polipéptidos de NIS funcionales, de ejercer una actividad oncolítica para inducir la regresión del tumor y de mejorar la supervivencia, y exhiben una expresión de NIS y una actividad oncolítica superiores, en comparación con el virus VSV Δ 51-NIS.

50 *Cultivo celular y Virus*

Las líneas celulares se cultivaron en medios suplementados con suero bovino fetal (FBS) al 10%, 100 U/mL de penicilina y 100 mg/mL de estreptomycin. Células BHK-21 y MPC-11, obtenidas American Type cell culture (ATCC), se cultivaron en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM). Las células 5TGM1 se obtuvieron del Dr. Babatunde Oyajobi (UT Health Sciences Center, San Antonio, TX) y se cultivaron en medio de Dulbecco modificado por Iscove (IMDM). Células de melanoma murino B-16 se obtuvieron de R. Vile y se cultivaron en DMEM. Todas las líneas celulares dieron negativo para la contaminación por micoplasma.

Los sitios de restricción fueron introducidos por ingeniería genética en un plásmido pVSV-XN2, que contiene el antígenoma de la hebra VSV-positivo, en las uniones del gen M/G y G/L precedidas por la supuesta secuencia intergénica de VSV (TATG(A)₇CTAACAG) requerido para la expresión del transgen funcional (Schnell *et al.*, *J. Virol.*, 70: 2318-2323 (1996)). ADNc flanqueado por el sitio de restricción que codifica IFN-β murino, IFN-β humano y genes NIS fue generado mediante PCR. IFN-β murino o humano se incorporó en un solo sitio NotI (unión M/G), mientras que NIS se incorporó en los sitios XhoI y NheI (unión G/L) para generar el plásmido VSV- IFN-NIS. El virus VSV-IFN-NIS fue rescatado utilizando métodos descritos en otra parte (Whelan *et al*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92:8388-8392 (1995)). Los virus se amplificaron subsiguientemente en células BHK-21, se purificaron mediante filtración del sobrenadante de células y se sedimentaron por centrifugación a través de sacarosa al 10% p/p. El título viral se midió en células BHK-21 después de la infección utilizando material de virus diluido en serie para medir la dosis infecciosa de cultivo de tejidos (TCID₅₀) determinada utilizando la ecuación de Spearman y Karber.

Caracterización viral in vitro

El título viral se midió en el sobrenadante después de la infección de células BHK-21 (MOI de 1,0, 1 hora a 37°C). Para medir la absorción de yoduro de radio *in vitro*, las células se incubaron en solución salina tamponada de Hanks (HBSS) con HEPES 10 mM (ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfónico, pH 7,3) en presencia de NaI radio-marcado (¹²⁵I a 1x10⁵ cpm), perclorato de potasio (KClO₄) +/- 100 μM. La secreción de IFN-β en el sobrenadante de las células infectadas se determinó utilizando un ensayo con enzima unida a inmunosorbente (ELISA) contra IFN-β murina o humana (PBL Interferonsource). Para comparar la capacidad de respuesta de IFN, las células fueron pre-incubadas con 100 U/mL de IFN-β murino durante 12 horas, seguido por la infección con VSV-GFP. La proliferación de células viables se evaluó mediante ensayo MTT (ATCC). El exterminio de 5TGM1 y MPC-11 por parte de VSV-IFN-NIS (MOI de 1,0) se monitorizó de manera similar en los instantes específicos después de la infección mediante el ensayo MTT, mostrado como un porcentaje de células no tratadas.

Estudios in vivo

5x10⁶ células de mieloma 5TGM1 o MPC-11 murino se implantaron subcutáneamente en el flanco derecho de ratones hembras C57B16/KaLwRij (Harlan, Países Bajos) o Balb/c (Taconic) singénicos, de 6-10 semanas de edad, respectivamente. La carga tumoral se midió mediante mediciones del calibrador en serie. A los ratones se les administró una dosis única, intravenosa de 1x10⁸/0,1 mL de VSV-IFN-NIS o un volumen igual de PBS mediante inyección en la vena de la cola. La formación de imágenes SPECT-CT se realizó después de la administración intraperitoneal (IP) de 0,5 mCi de Tc-99m y se cuantificó como se describe en otra parte (Penheiter *et al.*, *AJR Am J. Roentgenol.*, 195:341-349 (2010)).

Análisis del tumor de alta resolución

Los tumores recolectados a intervalos de 24 horas se congelaron en OCT para el seccionamiento. Las secciones de los tumores se analizaron mediante autorradiografía e inmunofluorescencia (IF) para (i) antígenos de VSV, utilizando anti-VSV policlonal de conejo generado internamente en los laboratorios de producción de vectores virales de la Clínica Mayo, seguido por anticuerpo secundario IgG anti-conejo marcado con Alexa (Invitrogen, Molecular Probes), (ii) la muerte celular mediante tinción TUNEL (kit DeadEnd™ Fluorometric TUNEL, Promega) y (iii) los núcleos celulares utilizando Hoescht 33342 (Invitrogen). La Cuantificación de imágenes se realizó en cuatro imágenes aleatorias de n = 3 tumores tratados con VSV-mIFN-NIS (excepto n = 2 tumores a las 72 horas post-tratamiento) utilizando el software ImageJ para obtener regiones VSV o TUNEL(+) como porcentaje de la superficie del tumor. El análisis por IF de los tumores recolectados a intervalos de 6 horas detectó antígenos de VSV y vasos sanguíneos del tumor utilizando un anticuerpo CD31 anti-ratón de rata (BD Pharmingen). El tamaño de los focos intratumorales se cuantificó midiendo 7-8 focos de 2 tumores y dividiendo el diámetro por el tamaño medio de las células tumorales (basado en mediciones de diámetro de 50 células individuales) para obtener el diámetro de focos en números de células. El volumen de focos aproximadamente esféricos se estimó utilizando la fórmula, $v = 4/3 (\pi * r^3)$. La anchura media del borde de células viables, infectadas por VSV, se cuantificó de manera similar a partir de las imágenes de IF de n = 3 tumores recolectados a las 48 horas post-administración de VSV-IFN-NIS.

Estudios inmunes en ratones inmunocompetentes

Para medir la generación de anticuerpos antivirales, diluciones dobles en serie de suero inactivado por calor se pre-incubaron con 500 TCTID₅₀ de VSV-GFP, y subsiguientemente se utilizaron para infectar células BHK-21. Se representó gráficamente la dilución de suero mínima permitiendo la CPE inducida por VSV. La secreción de IFN-β *in vivo* se midió en el suero mediante ELISA. Vacunas de 5TGM1 se administraron por inyección de 1x10⁷ células infectadas con VSV-mIFN-NIS (MOI de 10,0) por vía subcutánea en el flanco izquierdo de ratones singénicos. Se realizaron estudios de agotamiento de células T en ratones C57B16/KaLwRij mediante la administración

intraperitoneal de anticuerpos anti-CD8 y anti-CD4 (50 µg en cada caso) 3 veces/semana, seguido de una dosis de mantenimiento semanal.

Métodos estadísticos

5 Se utilizaron displays visuales de los datos para evaluar los valores atípicos o que se apartan sustancialmente de la normalidad, y se utilizó el test-t en los casos en los que se describe. En todos los casos, se proporcionaron los valores P de dos colas que no se ajustan para comparaciones múltiples. La comparación de las diferencias de supervivencia se realizó utilizando el ensayo de rango logarítmico de curvas de supervivencia de Kaplan Meier. Para la comparación de las tasas de recaída del tumor en estudios con animales, se utilizó el test de Fischer exact debido al pequeño tamaño de la muestra.

10 **OTRAS REALIZACIONES**

Ha de entenderse que aunque la invención se ha descrito junto con la descripción detallada de la misma, la descripción que antecede pretende ilustrar y no limitar el alcance de la invención, que se define por el alcance de las reivindicaciones adjuntas. Otros aspectos, ventajas y modificaciones están dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

15

REIVINDICACIONES

1. Un virus de la estomatitis vesicular que comprende una molécula de ARN, en donde dicha molécula de ARN comprende, en una dirección 3' a 5', una secuencia de ácido nucleico que es un molde para un transcrito de sentido positivo que codifica un polipéptido N de VSV, una secuencia de ácido nucleico que es un molde para un transcrito de sentido positivo que codifica un polipéptido P de VSV, una secuencia de ácido nucleico que es un molde para un transcrito de sentido positivo que codifica un polipéptido M de VSV, una secuencia de ácido nucleico que es un molde para un transcrito de sentido positivo que codifica un polipéptido de IFN, una secuencia de ácido nucleico que es un molde para un transcrito de sentido positivo que codifica un polipéptido G de VSV, una secuencia de ácido nucleico que es un molde para un transcrito de sentido positivo que codifica un polipéptido NIS y una secuencia de ácido nucleico que es un molde para un transcrito de sentido positivo que codifica un polipéptido L de VSV.
2. El virus de la reivindicación 1, en donde dicho polipéptido de IFN es un polipéptido de IFN-beta humano.
3. El virus de la reivindicación 1, en donde dicho polipéptido de NIS es un polipéptido de NIS humano.
4. El virus de la reivindicación 1, en donde dicho virus expresa dicho polipéptido de IFN cuando dicho virus infecta una célula de mamífero.
5. El virus de la reivindicación 1, en donde dicho virus expresa dicho polipéptido de NIS cuando dicho virus infecta una célula de mamífero.
6. Una composición que comprende un virus de la estomatitis vesicular que comprende una molécula de ARN, en donde dicha molécula de ARN comprende, en una dirección 3' a 5', una secuencia de ácido nucleico que es un molde para un transcrito de sentido positivo que codifica un polipéptido N de VSV, una secuencia de ácido nucleico que es un molde para un transcrito de sentido positivo que codifica un polipéptido P de VSV, una secuencia de ácido nucleico que es un molde para un transcrito de sentido positivo que codifica un polipéptido M de VSV, una secuencia de ácido nucleico que es un molde para un transcrito de sentido positivo que codifica un polipéptido de IFN, una secuencia de ácido nucleico que es un molde para un transcrito de sentido positivo que codifica un polipéptido G de VSV, una secuencia de ácido nucleico que es un molde para un transcrito de sentido positivo que codifica un polipéptido NIS y una secuencia de ácido nucleico que es un molde para un transcrito de sentido positivo que codifica un polipéptido L de VSV.
7. La composición de la reivindicación 6, en donde dicho polipéptido de IFN es un polipéptido de IFN-beta humano.
8. La composición de la reivindicación 6, en donde dicho polipéptido de NIS es un polipéptido de NIS humano.
9. La composición de la reivindicación 6, en donde dicho virus expresa dicho polipéptido de IFN cuando dicho virus infecta una célula de mamífero.
10. La composición de la reivindicación 6, en donde dicho virus expresa dicho polipéptido de NIS cuando dicho virus infecta una célula de mamífero.
11. Una molécula de ácido nucleico que comprende una hebra de ácido nucleico que comprende, en una dirección 3' a 5', una secuencia de ácido nucleico que es un molde para un transcrito de sentido positivo que codifica un polipéptido N de VSV, una secuencia de ácido nucleico que es un molde para un transcrito de sentido positivo que codifica un polipéptido P de VSV, una secuencia de ácido nucleico que es un molde para un transcrito de sentido positivo que codifica un polipéptido M de VSV, una secuencia de ácido nucleico que es un molde para un transcrito de sentido positivo que codifica un polipéptido de IFN, una secuencia de ácido nucleico que es un molde para un transcrito de sentido positivo que codifica un polipéptido G de VSV, una secuencia de ácido nucleico que es un molde para un transcrito de sentido positivo que codifica un polipéptido NIS y una secuencia de ácido nucleico que es un molde para un transcrito de sentido positivo que codifica un polipéptido L de VSV.
12. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 11, en donde dicho polipéptido de IFN es un polipéptido de IFN-beta humano.
13. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 11, en donde dicho polipéptido de S es un polipéptido de NIS humano.
14. Una composición que comprende virus de la estomatitis vesicular para uso en el tratamiento del cáncer, en donde dichos virus de la estomatitis vesicular comprenden una molécula de ARN que comprende, en una dirección

- 3' a 5', una secuencia de ácido nucleico que es un molde para un transcrito de sentido positivo que codifica un polipéptido N de VSV, una secuencia de ácido nucleico que es un molde para un transcrito de sentido positivo que codifica un polipéptido P de VSV, una secuencia de ácido nucleico que es un molde para un transcrito de sentido positivo que codifica un polipéptido M de VSV, una secuencia de ácido nucleico que es un molde para un transcrito de sentido positivo que codifica un polipéptido de IFN, una secuencia de ácido nucleico que es un molde para un transcrito de sentido positivo que codifica un polipéptido G de VSV, una secuencia de ácido nucleico que es un molde para un transcrito de sentido positivo que codifica un polipéptido NIS y una secuencia de ácido nucleico que es un molde para un transcrito de sentido positivo que codifica un polipéptido L de VSV.
- 5
15. La composición para uso de la reivindicación 14, en donde dicho polipéptido de IFN es un polipéptido de IFN-beta humano, o en donde dicho polipéptido de NIS es un polipéptido de NIS humano.
- 10

Figura 1

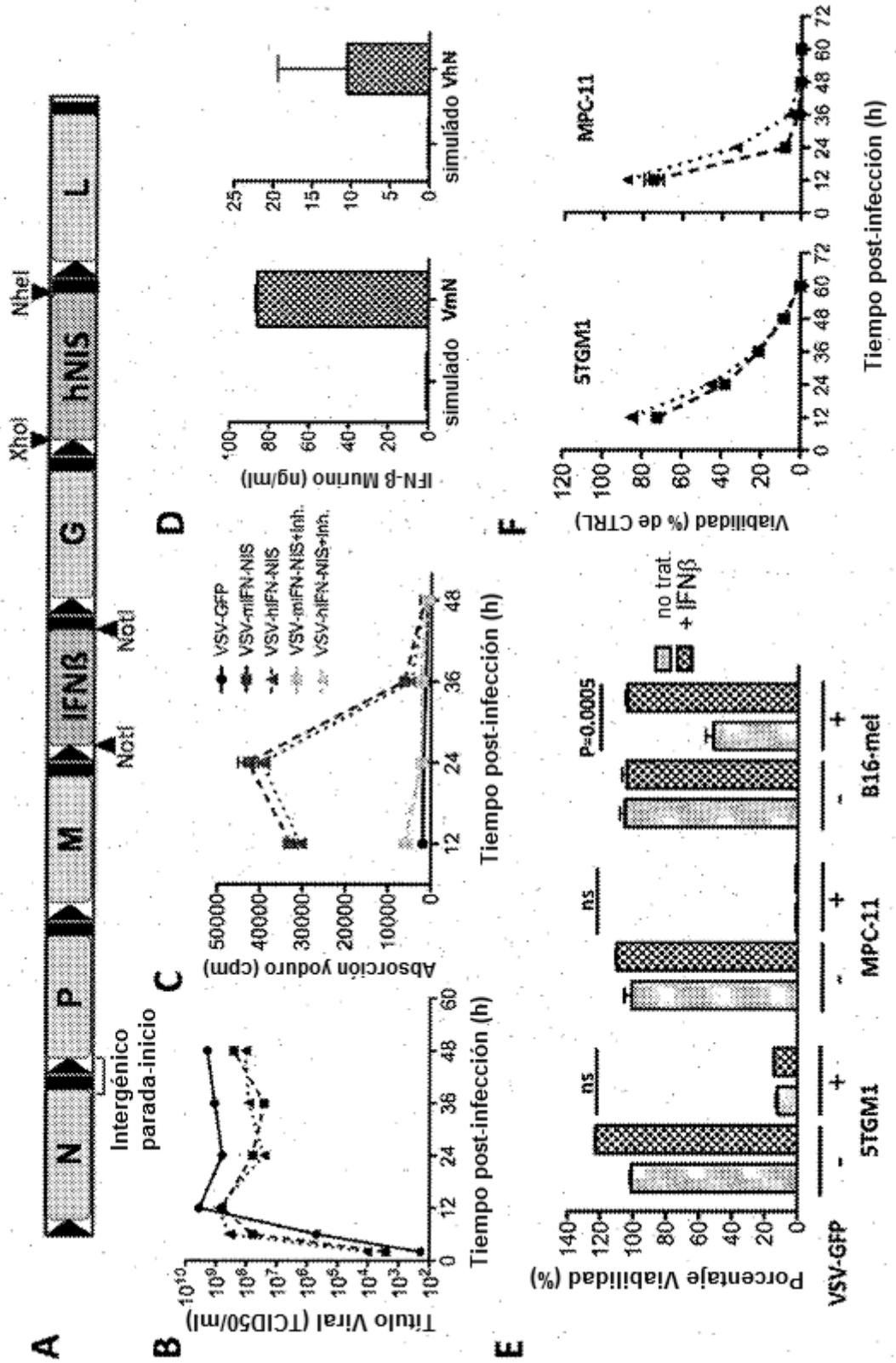


Figura 2

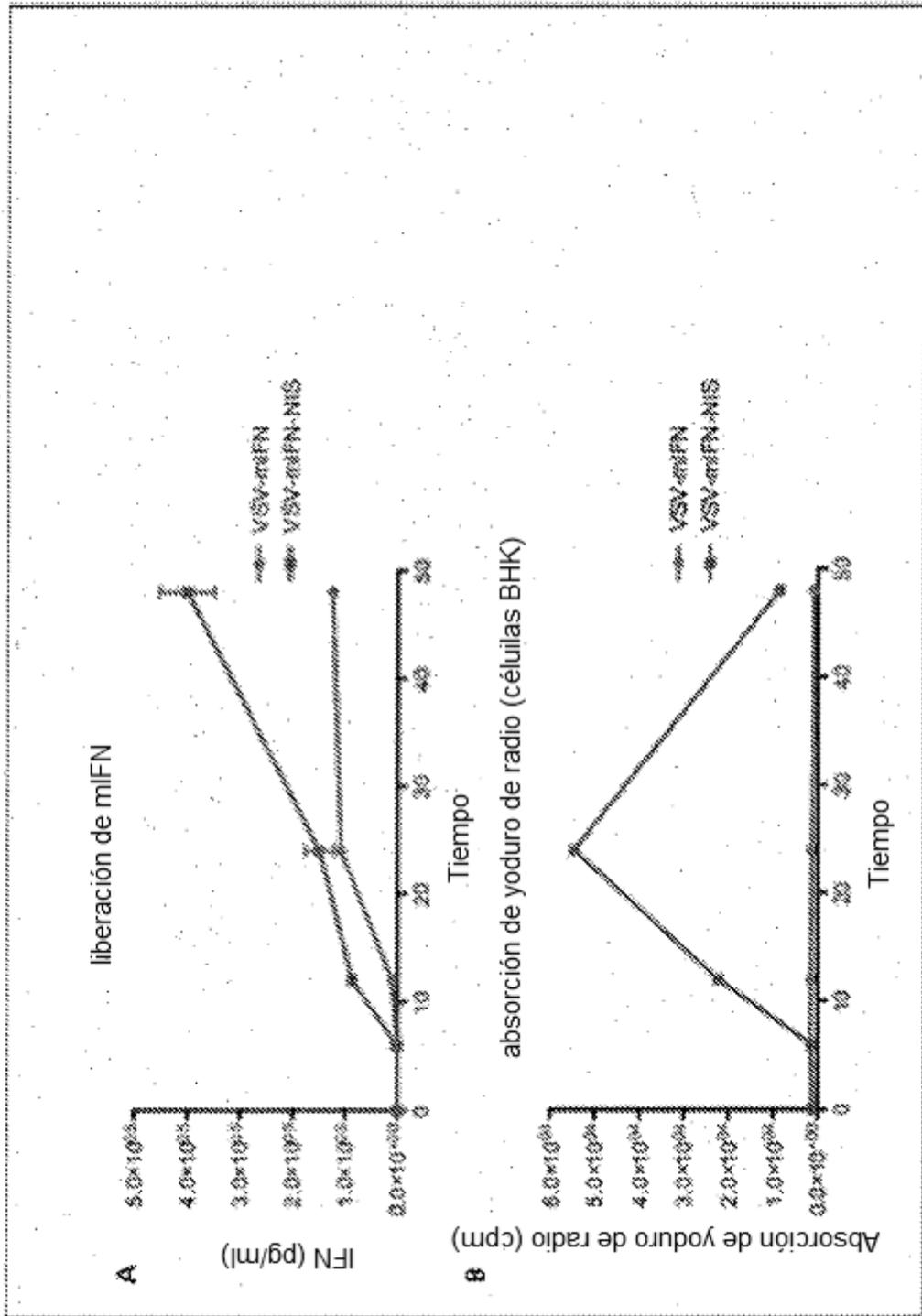


Figura 3

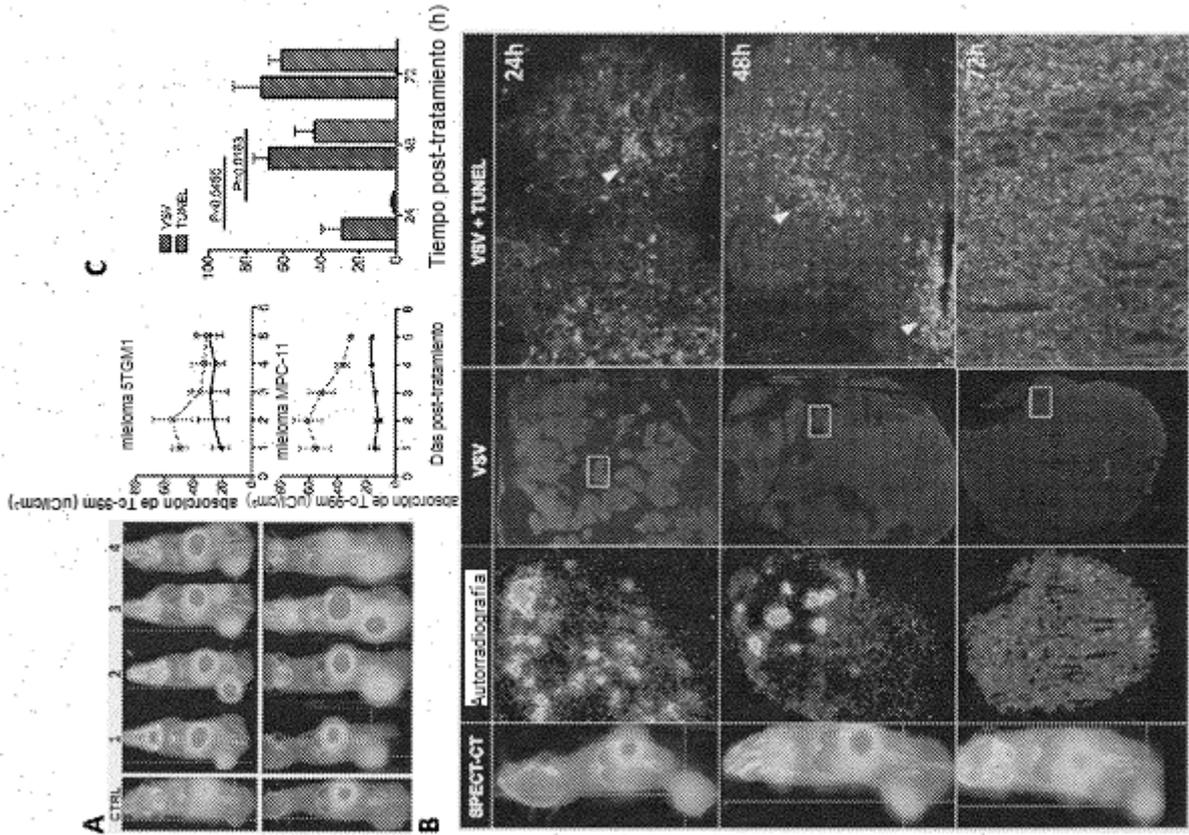


Figura 4

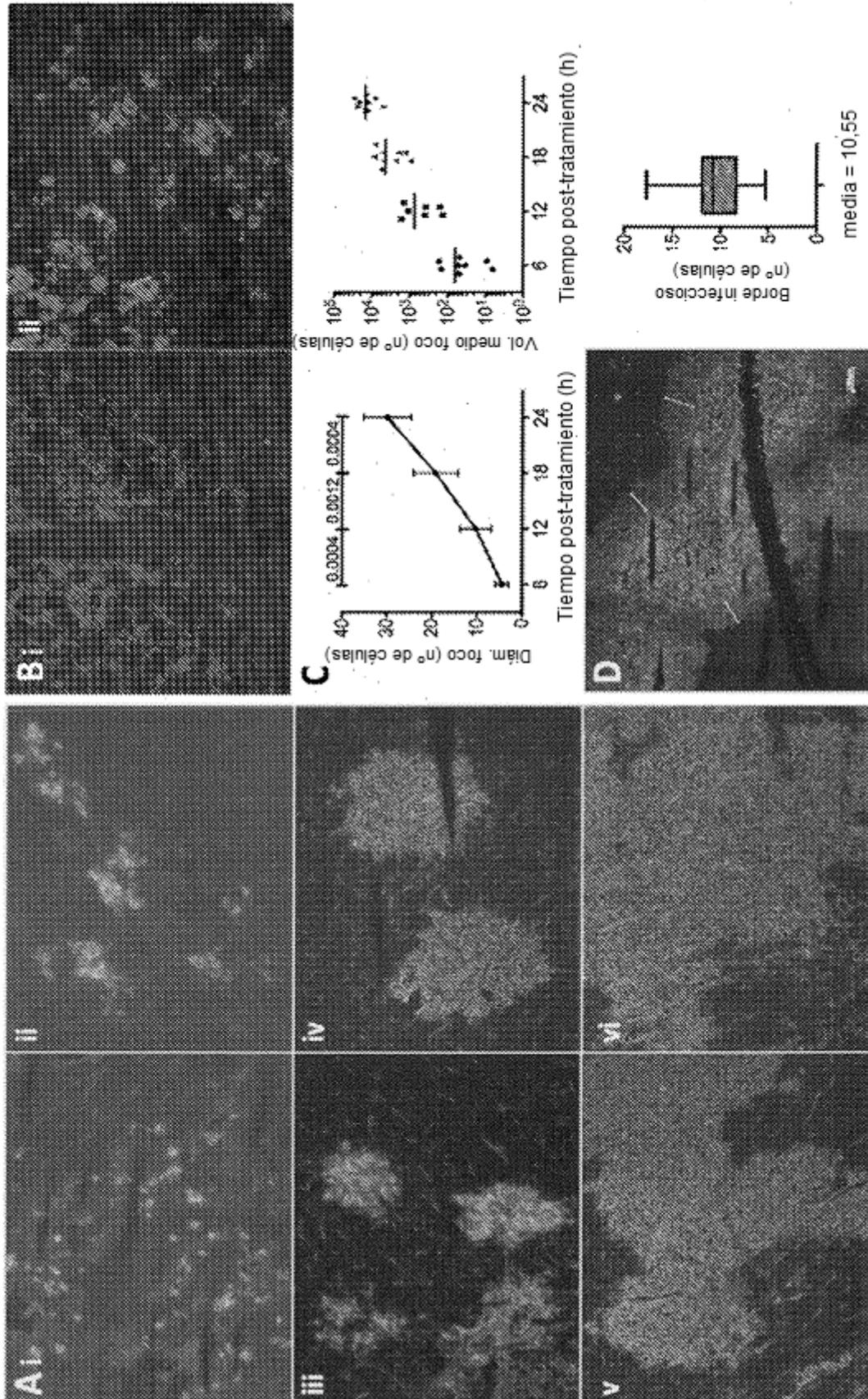


Figura 5

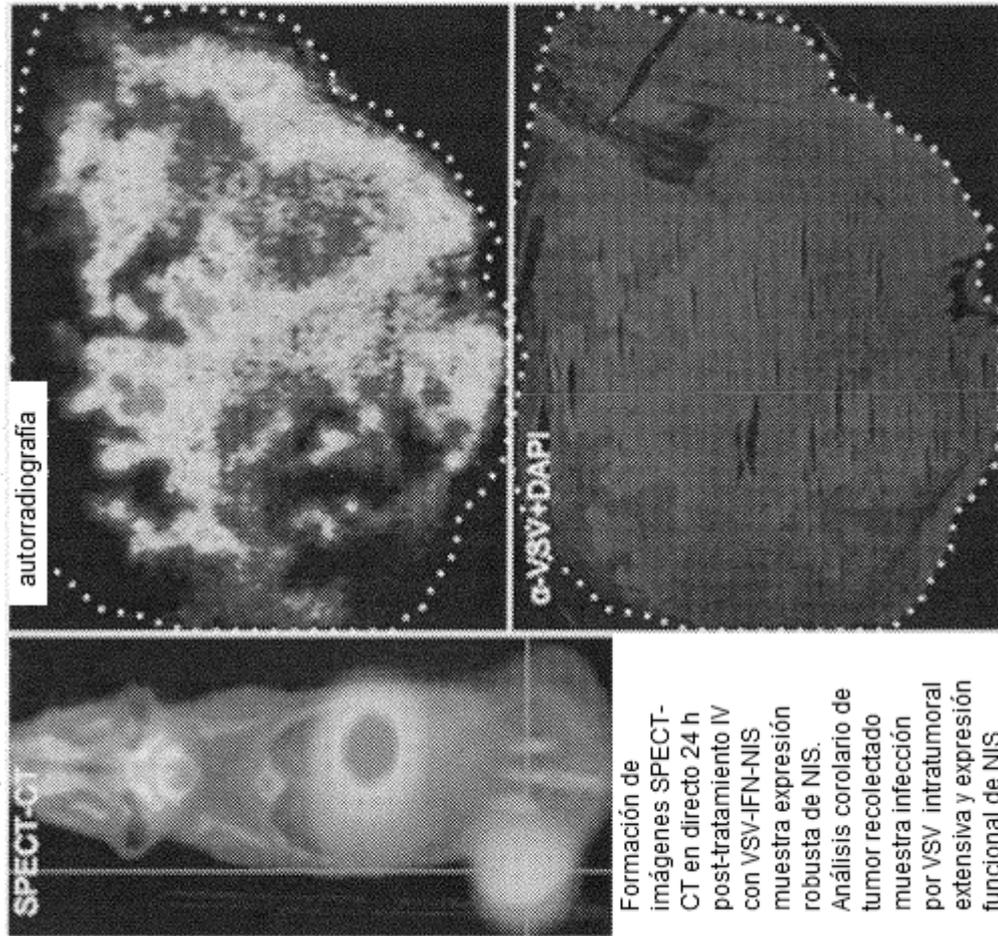


Figura 6

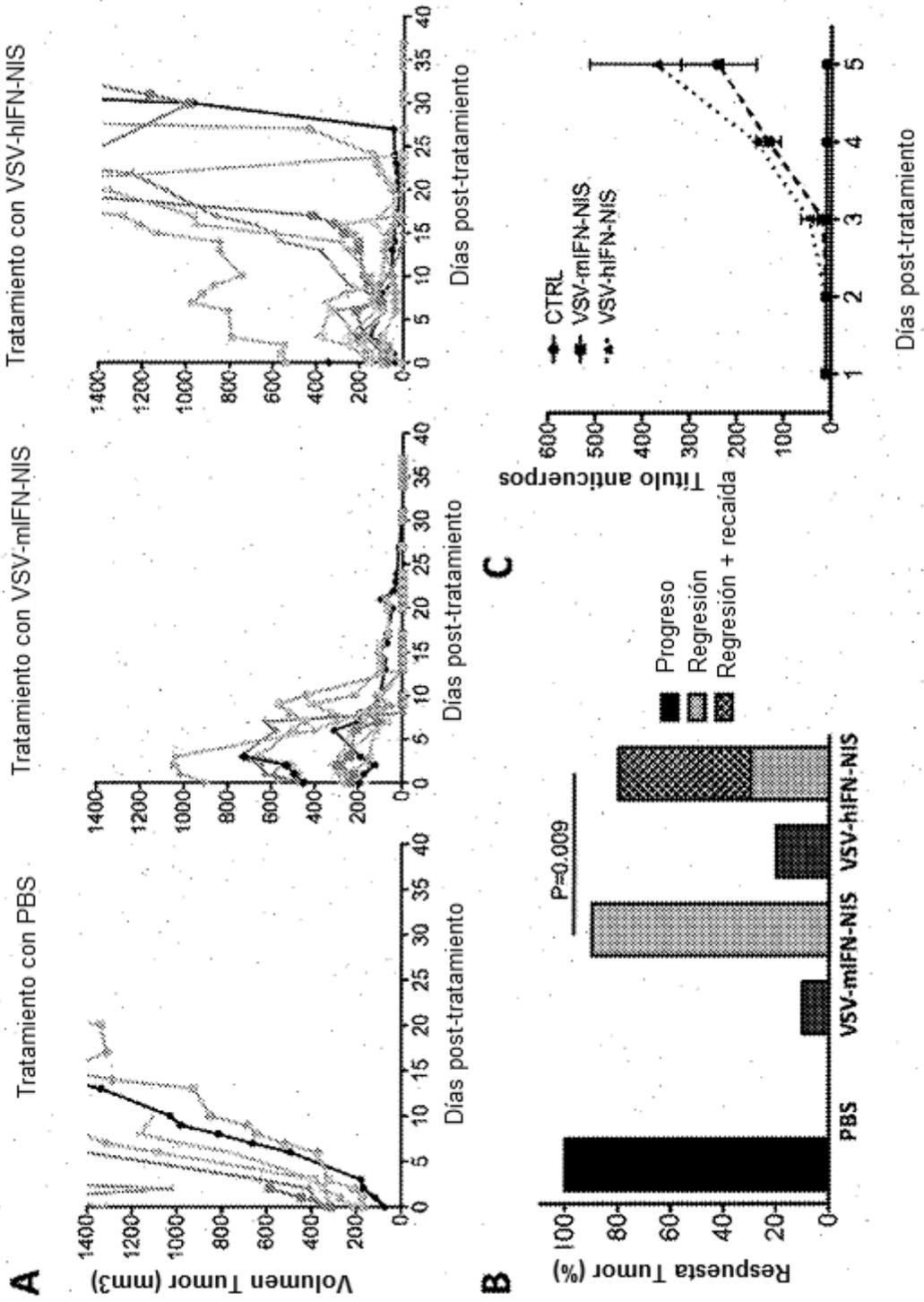


Figura 7

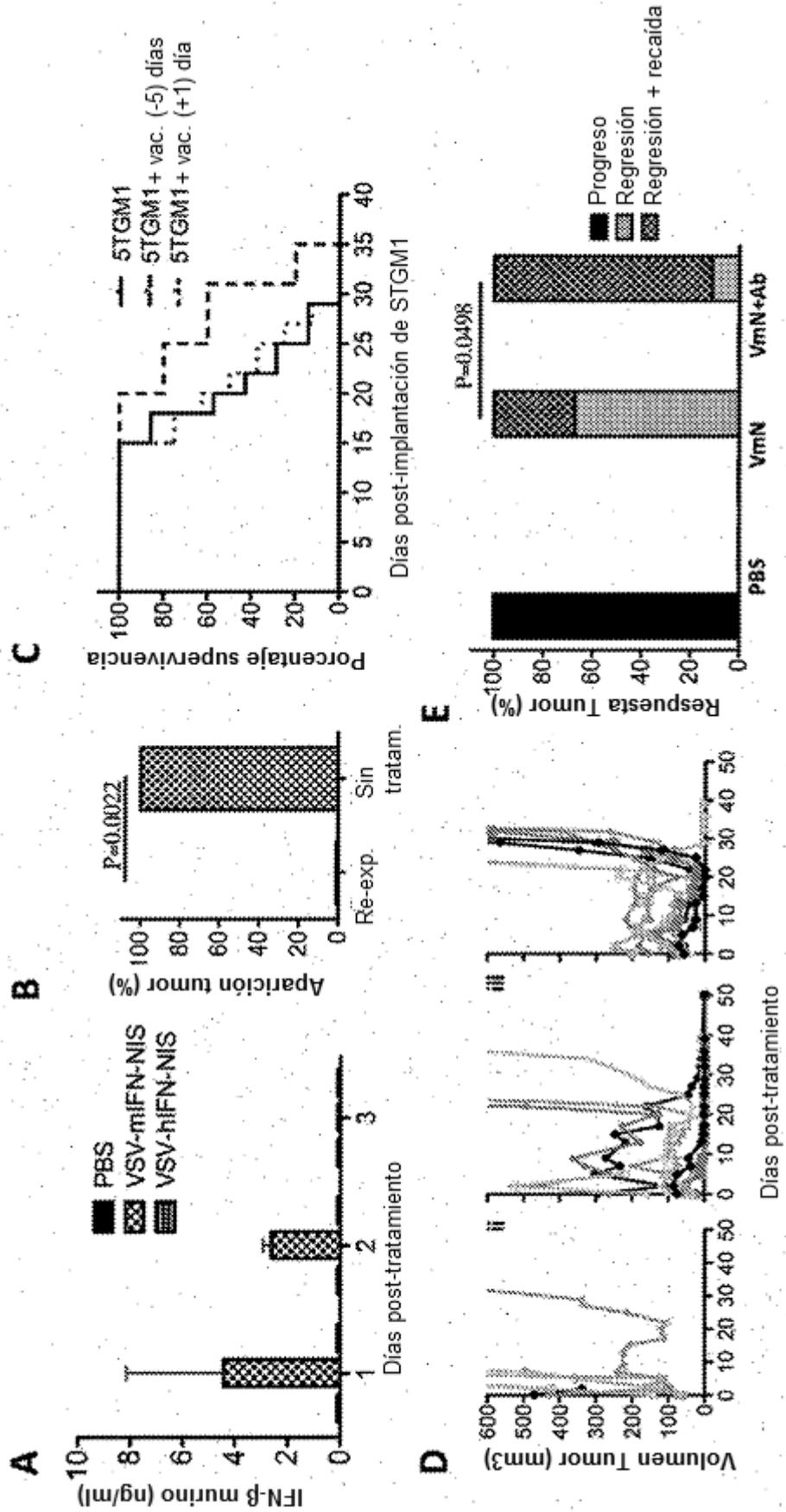


Figura 8B

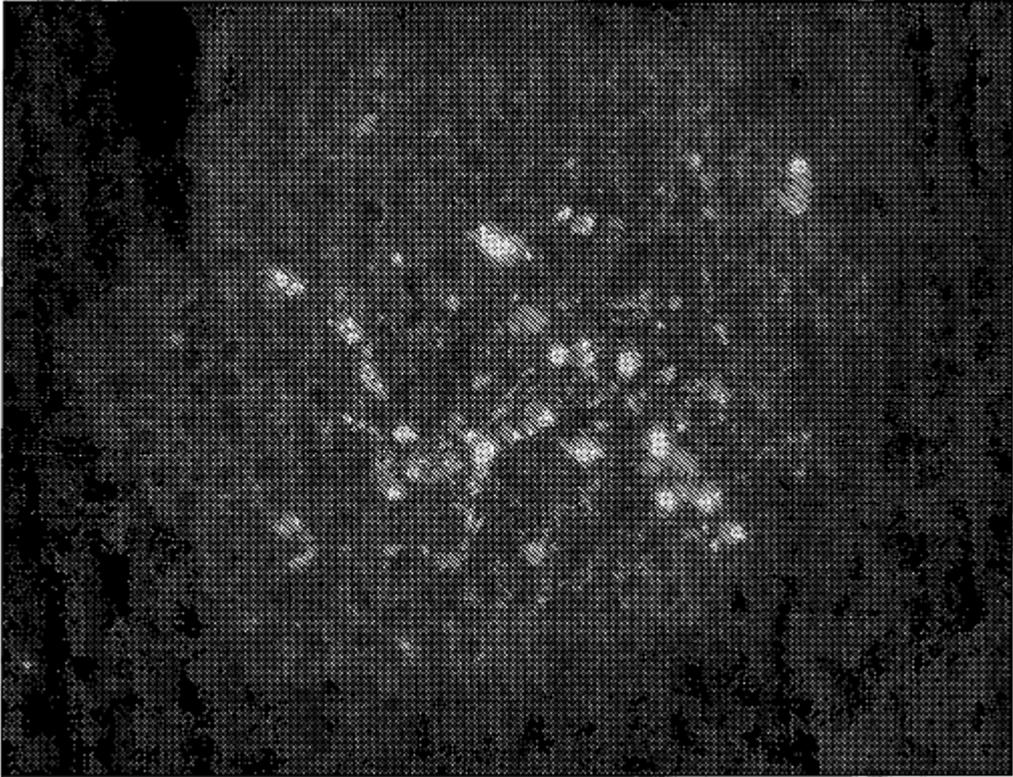


Figura 8A

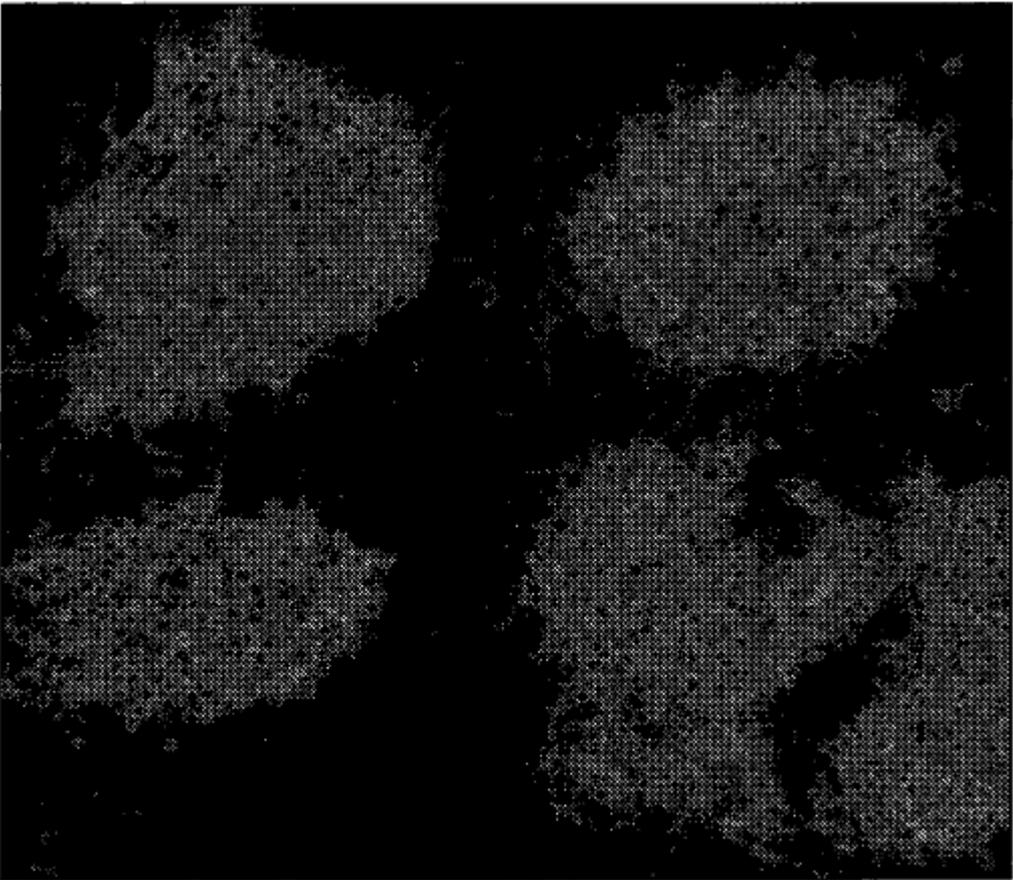


Figura 9A

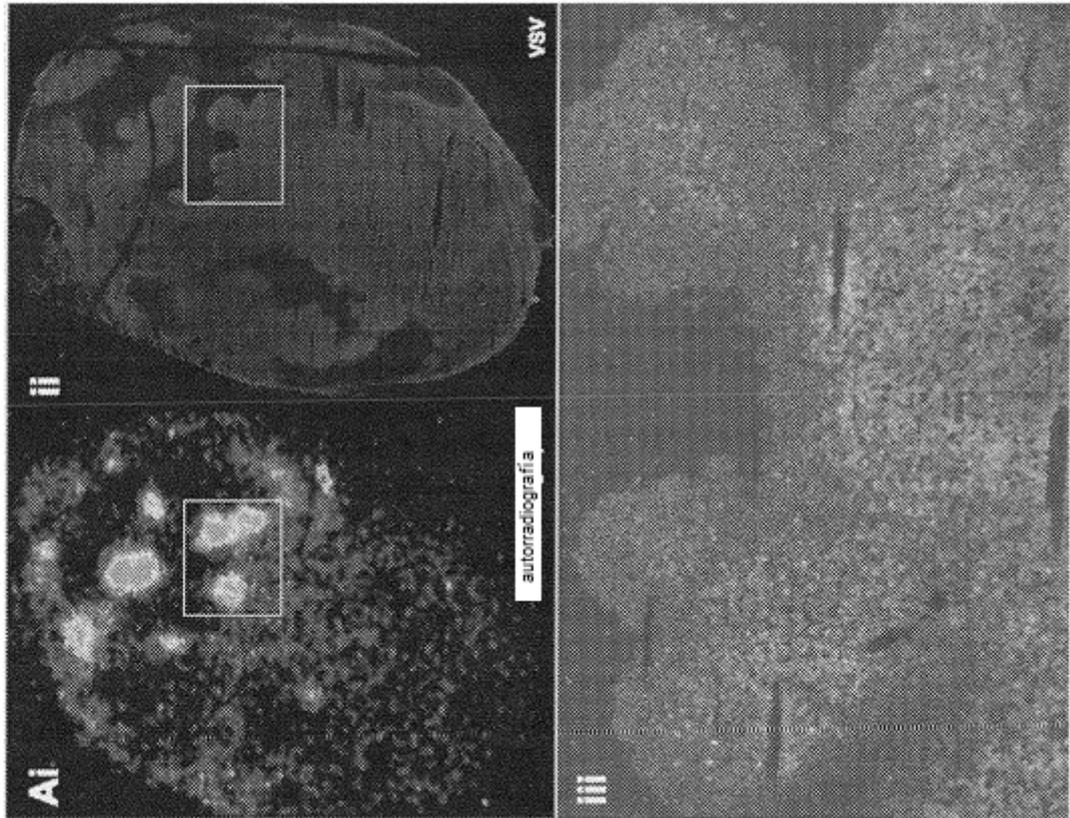


Figura 9B

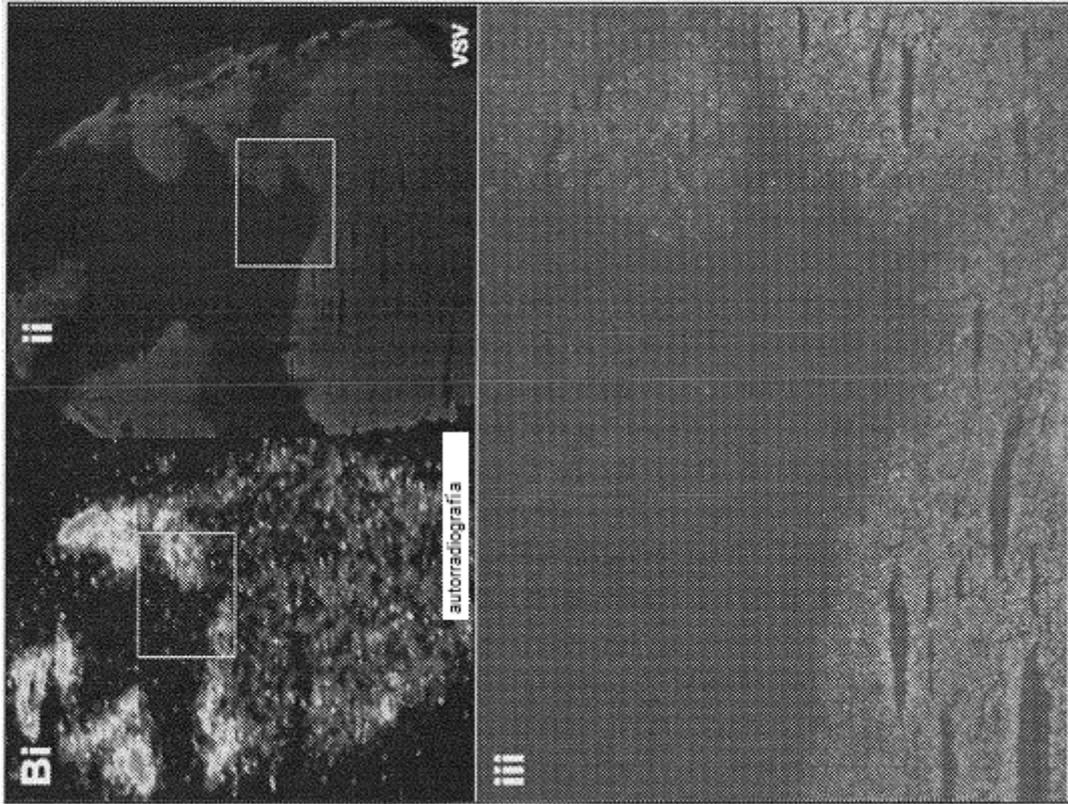


Figura 10

