

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 550 179**

51 Int. Cl.:

C12N 7/00 (2006.01)

A61K 35/76 (2015.01)

C07K 14/125 (2006.01)

C07K 14/11 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.02.2010 E 10705688 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.07.2015 EP 2393921**

54 Título: **Virus quiméricos de la enfermedad de Newcastle y usos de los mismos**

30 Prioridad:

05.02.2009 US 150285 P

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

05.11.2015

73 Titular/es:

**ICAHN SCHOOL OF MEDICINE AT MOUNT SINAI
(50.0%)**

**One Gustave L. Levy Place
New York, NY 10029, US y
MEMORIAL SLOAN-KETTERING CANCER
CENTER (50.0%)**

72 Inventor/es:

**ZAMARIN, DMITRIY;
GARCIA-SASTRE, ADOLFO;
PALESE, PETER y
FONG, YUMAN**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 550 179 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 quiméricos de la enfermedad de Newcastle y usos de los mismos

1. INTRODUCCIÓN

5 En esta memoria se describen virus quiméricos de la enfermedad de Newcastle tratados mediante ingeniería genética para expresar un antagonista de interferón heterólogo y composiciones que comprenden este tipo de virus. Los virus quiméricos de la enfermedad de Newcastle y composiciones son útiles en el tratamiento del cáncer.

2. ANTECEDENTES

10 El virus de la enfermedad de Newcastle (NDV - siglas en inglés) es un miembro del género Avulavirus en la familia Paramyxoviridae, que ha demostrado infectar un cierto número de especies de aves (Alexander, DJ (1988). Newcastle disease, Newcastle disease virus - an avian paramyxovirus. Kluwer Academic Publishers Dordrecht, Países Bajos págs. 1-22). NDV posee un genoma de ARN de cadena sencilla del genoma de ARN en sentido negativo y no sufre recombinación con el genoma del huésped o con otros virus (Alexander, DJ (1988) Newcastle disease, Newcastle disease virus - an avian paramyxovirus. Kluwer Academic Publishers Dordrecht, Países Bajos págs. 1-22). El ARN genómico contiene genes en el orden de 3'-NP-P-M-F-HN-L-5', descrito con mayor detalle más adelante. Dos proteínas adicionales, V y W, son producidas por NDV a partir del gen P por ARNm's alternativos que se generan por la edición de ARN. El ARN genómico también contiene una secuencia conductora en el extremo 3'.

20 Los elementos estructurales del virión incluyen la envoltura del virus, que es una bicapa lipídica derivada de la membrana plasmática de la célula. La glicoproteína, hemaglutinina-neuraminidasa (HN) sobresale de la envoltura, permitiendo que el virus contenga tanto hemoaglutinina (p. ej., unión al receptor/fusogénica) y actividades de neuraminidasa. La glicoproteína de fusión (F), que también interactúa con la membrana viral, se produce en primer lugar como un precursor inactivo, después se escinde después de la traducción para producir dos polipéptidos enlazados por disulfuro. La proteína F activa está implicada en la penetración del NDV en las células hospedantes al facilitar la fusión de la envoltura viral con la membrana plasmática de la célula huésped. La proteína de la matriz (M) está implicada en el ensamblaje viral, e interactúa tanto con la membrana viral como con las proteínas de la nucleocápsida.

30 La subunidad principal de la proteína de la nucleocápsida es la proteína de la nucleocápsida (NP) que confiere la simetría helicoidal a la cápsida. En asociación con la nucleocápsida se encuentran las proteínas P y L. Se cree que la fosfoproteína (P), que es objeto de fosforilación, desempeña un papel regulador en la transcripción, y también puede estar implicada en la metilación, fosforilación y poliadenilación. El gen L, que codifica una ARN polimerasa dependiente de ARN, es necesario para la síntesis de ARN viral junto con la proteína P. La proteína L, que ocupa casi la mitad de la capacidad de codificación del genoma viral, es la más grande de las proteínas virales y desempeña un papel importante tanto en la transcripción como en la replicación. La proteína V ha demostrado inhibir el interferón alfa y contribuye en la virulencia de NDV (Huang et al (2003). Newcastle disease virus V protein is associated with viral pathogenesis and functions as an Alpha Interferon Antagonist. Journal of Virology 77: 8676-8685).

40 Se ha informado que el NDV que se produce de forma natural es un agente oncolítico eficaz en una diversidad de modelos animales de tumores (Sinkovics, JG, y Horvath, JC (2000). Newcastle disease virus (NDV): brief history of its oncolytic strains. J Clin Virol 16: 1-15). Cepas que se producen de forma natural de NDV se han utilizado en múltiples ensayos clínicos contra los cánceres humanos avanzados (Sinkovics, JG, y Horvath, JC (2000). Newcastle disease virus (NDV): brief history of its oncolytic strains. J Clin Virol 16: 1-15); Lorence et al. (2007) Phase 1 clinical experience using intravenous administration of PV701, an oncolytic Newcastle disease virus. Curr Cancer Drug Targets 7: 157-167, Hotte et al. (2007). An optimized clinical regimen for the oncolytic virus PV701. Clin Cancer Res 13: 977-985; Freeman et al. (2006). Phase I/II trial of intravenous NDV-HUJ oncolytic virus in recurrent glioblastoma multiforme. Mol Ther 13: 221-228; Pecora et al. (2002). Phase I trial of intravenous administration of PV701, an oncolytic virus, in patients with advanced solid cancers. J Clin Oncol 20: 2251-2266; Csatory et al. (2004). MTH-68/H oncolytic viral treatment in human high-grade gliomas. J Neurooncol 67: 83-93). Sin embargo, el éxito de cepas de NDV que se producen de forma natural en estos ensayos clínicos para cánceres humanos avanzados fue sólo marginal (Hotte et al. (2007). An optimized clinical regimen for the oncolytic virus PV701. Clin Cancer Res 13: 977-985; Freeman et al. (2006). Phase I/II trial of intravenous NDV-HUJ oncolytic virus in recurrent glioblastoma multiforme. Mol Ther 13: 221-228; Pecora et al. (2002). Phase I trial of intravenous administration of PV701, an oncolytic virus, in patients with advanced solid cancers. J Clin Oncol 20: 2251-2266).

55 Varios NDVs han sido tratados mediante ingeniería genética para expresar el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos, IFN- γ , interleucina 2 (IL-2) o factor de necrosis tumoral α , y se ha evaluado su potencial terapéutico en un modelo de tumor de carcinoma de colon (Vigil et al., (2007). Use of Reverse Genetics to Enhance the Oncolytic Properties of Newcastle Disease Virus. Cancer Res 67: 8285-8292).

Se describió que un NDV fusogénico recombinante que expresa la proteína NS1 de la influenza tiene una proteína que exhibe funciones antagonistas de interferón (IFN) y antiapoptóticas en células humanas y de ratón (Zamarin et al., (2009). Enhancement of Oncolytic Properties of Recombinant Newcastle Disease Virus Through Antagonism of

Cellular Innate Immune Responses. *Molecular Therapy*, 17: 697-706).

Como tal, sigue habiendo una necesidad de terapias basadas en el NDV, útiles en el tratamiento del cáncer, especialmente el cáncer avanzado.

3. SUMARIO

5 En un aspecto, presentado en esta memoria, se encuentran los virus quiméricos de la enfermedad de Newcastle (NDVs) tratados mediante ingeniería genética para expresar un antagonista de interferón heterólogo. En una realización específica, presentada también en esta memoria, se encuentran NDVs quiméricos que comprenden un genoma empaquetado que codifica un antagonista de interferón heterólogo, en donde se expresa el antagonista de interferón heterólogo. La invención proporciona NDVs quiméricos que comprenden un genoma empaquetado que
10 codifica un antagonista de interferón heterólogo y una proteína F modificada que hace que el NDV sea altamente fusogénico, en donde se expresan el antagonista de interferón heterólogo y la proteína F modificada. También se presentan en esta memoria NDVs quiméricos, que comprenden un genoma empaquetado que codifica un antagonista de interferón heterólogo y una proteína F modificada con un sitio de escisión mutado, en donde se expresan el antagonista de interferón heterólogo y la proteína F modificada. Específicamente, los NDVs quiméricos
15 que expresan la proteína F modificada tienen una actividad fusogénica incrementada en relación con el virus correspondiente que expresa la proteína F homóloga sin las mutaciones en el sitio de escisión. También, la proteína F modificada se incorpora en el virión.

También se describen en esta memoria NDVs quiméricos, que comprenden un genoma empaquetado que codifica un antagonista de interferón heterólogo y una citoquina (p. ej., interleucina (IL)-2), en donde se expresan el antagonista de interferón heterólogo y la citoquina. Alternativamente, se presentan en esta memoria NDVs quiméricos, que comprenden un genoma empaquetado que codifica un antagonista de interferón heterólogo, una citoquina (p. ej., IL-2) y una proteína F modificada que hace que el NDV sea altamente fusogénico, en donde se expresan el antagonista de interferón heterólogo, la citoquina y la proteína F modificada. También se presentan en esta memoria NDVs quiméricos, que comprenden un genoma empaquetado que codifica un antagonista de interferón heterólogo, una citoquina (p. ej., IL-2) y una proteína F modificada con un sitio de escisión mutado, en donde se expresan el antagonista de interferón heterólogo, la citoquina y la proteína F modificada; NDVs quiméricos, que comprenden un genoma empaquetado que codifica un antagonista de interferón heterólogo, una citoquina (p. ej., IL-2) y un antígeno tumoral, en donde se expresan el antagonista de interferón heterólogo, la citoquina y el antígeno tumoral; NDVs quiméricos, que comprenden un genoma empaquetado que codifica un antagonista de interferón heterólogo, una citoquina (p. ej., IL-2), un antígeno tumoral, y una proteína F modificada que hace que el NDV sea altamente fusogénico, en donde se expresan el antagonista de interferón heterólogo, la citoquina, el antígeno tumoral y la proteína F modificada; NDVs quiméricos, que comprenden un genoma empaquetado que codifica un antagonista de interferón heterólogo, una citoquina (p. ej., IL-2), un antígeno tumoral y una proteína F modificada con un sitio de escisión mutado, en donde se expresan el antagonista de interferón heterólogo, la citoquina, el antígeno tumoral y la proteína F modificada. Alternativamente, los NDVs quiméricos que expresan la proteína F modificada con el sitio de escisión mutado son altamente fusogénicos. También, la proteína modificada F se incorpora en el virión.

Se presentan en esta memoria NDVs quiméricos que comprenden un genoma empaquetado que codifica un antagonista de interferón heterólogo y un antígeno tumoral, en donde se expresan el antagonista de interferón heterólogo y el antígeno tumoral. En otra realización, se presentan en esta memoria NDVs quiméricos que comprenden un genoma empaquetado que codifica un antagonista de interferón heterólogo, un antígeno tumoral y una proteína F modificada que hace que el NDV sea altamente fusogénico, en donde se expresan el antagonista de interferón heterólogo, el antígeno tumoral y la proteína F modificada. Se presentan en esta memoria NDVs quiméricos que comprenden un genoma empaquetado que codifica un antagonista de interferón heterólogo, un antígeno tumoral y una proteína F modificada con un sitio de escisión mutado, en donde se expresan el antagonista de interferón heterólogo, el antígeno tumoral y la proteína F modificada. Alternativamente, los NDVs quiméricos que expresan la proteína F modificada con el sitio de escisión mutado son altamente fusogénicos. También, la proteína modificada F se incorpora en el virión.

En una realización específica, el antagonista de interferón heterólogo es una proteína viral. Ejemplos específicos de proteínas virales que son antagonistas de interferones incluyen, pero no se limitan a la proteína W del virus , Nipah, la proteína V de Nipah, la proteína VP35 del virus del Ébola, la proteína E3L del virus vacuna, la proteína NS1 del virus de la influenza, la proteína NS2 del virus sincitial respiratorio (RSV), la proteína ICP34 5 del virus herpes simplex (HSV) tipo 1 y la proteasa NS3-4 del virus de la hepatitis C. En una realización específica, la proteína viral es una proteína NS1 del virus de la influenza. El antagonista de interferón heterólogo es una proteína celular. Ejemplos específicos de proteínas celulares de este tipo incluyen proteínas celulares dominantes negativas que bloquean la inducción o la respuesta a la inmunidad innata y reguladores celulares de la respuesta inmune innata.

Se describen en esta memoria métodos para propagar los NDVs quiméricos descritos en esta memoria. Los NDVs quiméricos descritos en esta memoria se pueden propagar en cualquier célula, sujeto, tejido u órgano susceptible a una infección por NDV. En una realización, los NDVs quiméricos descritos en esta memoria pueden propagarse en una línea celular. En otra realización, los NDVs quiméricos descritos en esta memoria se puede propagar en células

cancerígenas. En otra realización, los NDVs quiméricos descritos en esta memoria se pueden propagar en un huevo embrionado. En determinadas realizaciones, presentadas en esta memoria se encuentran células, tejidos u órganos aislados, infectados con un NDV quimérico descrito en esta memoria. Véase, p. ej., la Sección 5.3 para ejemplos de células, animales y huevos a infectar con un NDV quimérico descrito en esta memoria. En realizaciones específicas, presentadas en esta memoria, se encuentran células cancerígenas aisladas, infectadas con un NDV quimérico descrito en esta memoria. En determinadas realizaciones presentadas en esta memoria se encuentran líneas celulares infectadas con un NDV quimérico descrito en esta memoria. En otras realizaciones, presentadas en esta memoria, se encuentran huevos embrionados infectados con un NDV quimérico descrito en esta memoria.

En esta memoria se describen composiciones que comprenden un NDV quimérico descrito en esta memoria. En una realización específica, presentada en esta memoria, se encuentran composiciones farmacéuticas que comprenden un NDV quimérico descrito en esta memoria y un soporte farmacéuticamente aceptable. En otra realización, presentada en esta memoria, se encuentran composiciones farmacéuticas que comprenden células cancerígenas infectadas con un NDV quimérico descrito en esta memoria, y un soporte farmacéuticamente aceptable, las células cancerígenas han sido tratadas con radiación gamma antes de la incorporación en la composición farmacéutica. Alternativamente, las células cancerígenas han sido tratadas con radiación gamma antes de la infección con NDV quimérico. Alternativamente, las células cancerígenas han sido tratadas con radiación gamma después de la infección con NDV quimérico. Alternativamente, se presentan en esta memoria composiciones farmacéuticas que comprenden un concentrado de proteínas de células cancerígenas infectadas por NDV quimérico lisadas y un soporte farmacéuticamente aceptable.

En otro aspecto presentado en esta memoria se encuentran métodos para producir composiciones farmacéuticas que comprenden un NDV quimérico NDV descrito en esta memoria. En una realización, un método para producir una composición farmacéutica que comprende: (a) propagar un NDV quimérico descrito en esta memoria en una línea celular que es susceptible a una infección por NDV y (b) recoger el virus de la progenie, en el que el virus se cultiva en cantidades suficientes y en condiciones suficientes de modo que el virus está libre de contaminación, de manera que el virus de la progenie es adecuado para su formulación en una composición farmacéutica. En otra realización, un método para producir una composición producto farmacéutica comprende (a) propagar un NDV quimérico NDV descrito en esta memoria en un huevo embrionado y (b) recoger el virus de la progenie, en el que el virus se cultiva en cantidades suficientes y en condiciones suficientes de modo que el virus está libre de contaminación, de manera que el virus de la progenie es adecuado para su formulación en una composición farmacéutica.

En otro aspecto presentado en esta memoria se encuentran métodos para tratar el cáncer utilizando un NDV quimérico descrito en esta memoria o una composición farmacéutica que comprende un NDV quimérico de este tipo. En una realización específica, un método para tratar el cáncer comprende infectar una célula cancerígena en un sujeto con un NDV quimérico descrito en esta memoria o una composición farmacéutica del mismo. En otra realización, un método para tratar el cáncer comprende administrar a un sujeto en necesidad del mismo un NDV quimérico descrito en esta memoria o una composición farmacéutica del mismo. En determinadas realizaciones, dos o más NDVs quiméricos se administran a un sujeto para tratar el cáncer.

En otra realización, un método para tratar el cáncer comprende administrar a un sujeto en necesidad del mismo, células cancerígenas infectadas con un NDV quimérico descrito en esta memoria o una composición farmacéutica del mismo. Alternativamente, las células cancerígenas han sido tratadas con radiación gamma antes de la administración al sujeto o la incorporación en la composición farmacéutica. Alternativamente, un método para tratar el cáncer comprende administrar a un sujeto en necesidad del mismo un concentrado de proteína o fragmentos de la membrana plasmática a partir de células cancerígenas infectadas con un NDV quimérico o una composición farmacéutica del mismo.

3.1 TERMINOLOGÍA

Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión "alrededor de" o el término "aproximadamente", cuando se utiliza junto con un número, se refiere a cualquier número dentro de 1, 5 ó 10% del número de referencia.

Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión "antagonista de interferón" se refiere a un agente que reduce o inhibe la respuesta inmune del interferón celular. En una realización, un antagonista de interferón es un agente proteico que reduce o inhibe la respuesta inmune del interferón celular. En una realización específica, un antagonista de interferón es una proteína viral o un polipéptido que reduce o inhibe la respuesta de interferón celular.

Tal como se describe en esta memoria, un antagonista de interferón es un agente que reduce o inhibe la expresión y/o actividad del interferón. El antagonista de interferón reduce o inhibe la expresión y/o actividad del IFN de tipo I. Alternativamente, el antagonista de interferón reduce o inhibe la expresión y/o actividad del IFN de tipo II. Alternativamente, el antagonista de interferón reduce o inhibe la expresión y/o actividad del IFN de tipo II. Alternativamente, el antagonista de interferón reduce o inhibe la expresión y/o actividad de cualquiera de IFN- α , IFN- β o ambos. Alternativamente, el antagonista de interferón reduce o inhibe la expresión y/o actividad de IFN- γ . Alternativamente, el antagonista de interferón reduce o inhibe la expresión y/o actividad de uno, dos o la totalidad de IFN- α , IFN- β e IFN- γ .

- 5 Tal como se describe en esta memoria, la expresión y/o actividad de IFN- α , IFN- β y/o IFN- γ en un huevo embrionado o una célula se reduce aproximadamente 1 a aproximadamente 100 veces, aproximadamente 5 a aproximadamente 80 veces, aproximadamente 20 a aproximadamente 80 veces, aproximadamente 1 a aproximadamente 10 veces, aproximadamente 1 a aproximadamente 5 veces, aproximadamente 40 a aproximadamente 80 veces, o 1, 2, 3, 4, 5, 7, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 ó 100 veces mediante un antagonista de interferón con respecto a la expresión y/o actividad de IFN- α , IFN- β y/o IFN- γ en un huevo embrionado de control o una célula que no expresa o no contacta con un antagonista de interferón tal como se mide por las técnicas descritas en la presente memoria o conocidas por un experto en la técnica. Alternativamente, la expresión y/o actividad de IFN- α , IFN- β y/o IFN- γ en un huevo embrionado o una célula se reduce en al menos 20% a 25%, al menos 25% a 30%, al menos 30% a 35%, al menos 35% a 40%, al menos 40% a 45%, al menos 45% a 50%, al menos 50% a 55%, al menos 55% a 60%, al menos 60% a 65%, al menos 65% a 70%, al menos 70% a 75%, al menos 75% a 80%, al menos 80% a 85%, al menos 85% a 90%, al menos 90% a 95%, al menos 95% a 99% o en un 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, o 99% en un antagonista de interferón con respecto a la expresión y/o actividad de IFN- α , IFN- β , y/o IFN- γ en un huevo embrionado de control o una célula que no expresa o no contacta con un antagonista de interferón de este tipo tal como se mide por las técnicas descritas en esta memoria o conocidas por un experto en la técnica.
- 10 Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión "antagonista de interferón heterólogo" se refiere a un antagonista de interferón que no se encuentra en la naturaleza que esté asociado con el genoma de la cadena principal del NDV quimérico.
- 20 Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión "ser humano anciano" se refiere a un ser humano de 65 años o más.
- Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión "adulto humano" se refiere a un ser humano que tiene 18 años de edad o más.
- 25 Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión "niño humano" se refiere a un ser humano que tiene 1 año a 18 años de edad.
- Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión "bebé mayor humano" se refiere a un ser humano que tiene 1 año a 3 años de edad.
- Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión "bebé humano" se refiere a un ser humano recién nacido hasta 1 año de edad.
- 30 Las expresiones "altamente fusogénico" y "actividad fusogénica incrementada", y similares, como se utiliza en esta memoria, se refiere a un aumento en la capacidad del NDV de formar sincitios que implican un gran número de células. En una realización específica, las células infectadas con un NDV quimérico descrito en esta memoria que está tratado mediante ingeniería genética para expresar una proteína F modificada tienen una capacidad incrementada para formar sincitios con relación a células infectadas con el virus parental de la que el virus quimérico se deriva que tiene una proteína F no modificada. En otra realización específica, aproximadamente 10% a aproximadamente 25%, aproximadamente 25% a aproximadamente 50%, aproximadamente 25% a aproximadamente 75%, aproximadamente 50% a aproximadamente 75%, aproximadamente 50% a aproximadamente 95% o aproximadamente 75% a aproximadamente 99% o aproximadamente 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 99% más de células infectadas con un NDV quimérico descrito en esta memoria que está tratado mediante ingeniería genética para expresar una proteína F modificada forma sincitios con relación al número de células que forman sincitios que están infectadas con el virus parental de la que el virus quimérico se deriva que tiene una proteína F no modificada. Los sincitios se cuantifican microscópicamente contando el número de núcleos por sincitio después de un cierto período de tiempo (p. ej., alrededor de 8 horas a alrededor de 12 horas, alrededor de 12 horas a alrededor de 24 horas, alrededor de 24 horas a alrededor de 36 horas, o alrededor de 36 horas a alrededor de 48 horas).
- 35 Tal como se utiliza en esta memoria, las expresiones "sistemas deficientes en IFN" o "sustratos deficientes en IFN" se refieren a sistemas, p. ej., células, líneas celulares y animales tales como ratones, pollos, pavos, conejos, ratas, caballos, etc., que no producen una, dos o más tipos de IFN, o no producen ningún tipo de IFN, ni producen bajos niveles de uno, dos o más tipos de IFN, ni producen bajos niveles de cualquier IFN (es decir, una reducción en cualquier expresión de IFN de 5-10%, 10-20%, 20-30%, 30-40%, 40-50%, 50-60%, 60-70%, 70-80%, 80-90% o más en comparación con sistemas de IFN competentes bajo las mismas condiciones), no responden o responden menos eficazmente a uno, dos o más tipos de IFN, o no responden a ningún tipo de IFN, tienen una respuesta tardía a uno, dos o más tipos de IFN, y/o son deficientes en la actividad de genes antivirales inducidos por uno, dos o más tipos de IFN, o inducidos por cualquier tipo de IFN.
- 50 Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión "multiplicidad de infección" o "MOI" es el número medio de virus por célula infectada. La MOI se determina dividiendo el número de virus añadido (ml añadido x upf) por el número de células añadidas (ml añadido x células/ml).
- 55 Tal como se utiliza en esta memoria, los términos "sujeto" o "paciente" se utilizan indistintamente. Tal como se utiliza

en esta memoria, los términos "sujeto" y "sujetos" se refieren a un animal. Tal como se describe en esta memoria, el sujeto es un mamífero, incluyendo un no primate (p. ej., un camello, burro, cebra, vaca, caballo, gato, perro, rata y ratón) y un primate (p. ej., un mono, chimpancé y un ser humano). Alternativamente, el sujeto es un mamífero no humano. Alternativamente, el sujeto es una mascota (p. ej., perro o gato) o un animal de granja (p. ej., un caballo, cerdo o vaca). Alternativamente, el sujeto es un ser humano. Alternativamente, el mamífero (p. ej., ser humano) es de 0 a 6 meses de edad, de 6 a 12 meses de edad, de 1 a 5 años de edad, de 5 a 10 años de edad, de 10 a 15 años de edad, de 15 a 20 años de edad, de 20 a 25 años de edad, de 25 a 30 años de edad, de 30 a 35 años de edad, de 35 a 40 años de edad, de 40 a 45 años de edad, de 45 a 50 años de edad, de 50 a 55 años de edad, de 55 a 60 años de edad, de 60 a 65 años de edad, de 65 a 70 años de edad, de 70 a 75 años de edad, de 75 a 80 años de edad, de 80 a 85 años de edad, de 85 a 90 años de edad, de 90 a 95 años de edad o de 95 a 100 años de edad. En realizaciones específicas, el sujeto es un animal que no es aviar.

Tal como se utiliza en esta memoria, los términos "tratar" y "tratamiento", en el contexto de la administración de una terapia, se refieren a un tratamiento/terapia de la cual un sujeto recibe un efecto beneficioso tal como la reducción, decremento, atenuación, disminución, estabilización, remisión, supresión, inhibición o detención del desarrollo o progreso del cáncer, o un síntoma del mismo. El tratamiento/terapia que recibe un sujeto resulta en al menos uno o más de los siguientes efectos: (i) la reducción o mejora de la gravedad del cáncer y/o un síntoma asociado con el mismo, (ii) la reducción en la duración de un síntoma asociado con el cáncer, (iii) la prevención de la recurrencia de un síntoma asociado con el cáncer, (iv) la regresión del cáncer y/o un síntoma asociado con el mismo, (v) la reducción en la hospitalización de un sujeto, (vi) la reducción de la duración de la hospitalización, (vii) el aumento de la supervivencia de un sujeto, (viii) la inhibición del progreso del cáncer y/o un síntoma asociado con el mismo, (ix) el potenciamiento o la mejora del efecto terapéutico de otra terapia, (x) una reducción o eliminación en la población de células cancerígenas, (xi) una reducción en el crecimiento de un tumor o neoplasia, (xii) una disminución en el tamaño del tumor, (xiii) una reducción en la formación de un tumor, (xiv) la erradicación, eliminación o control de cáncer primario, regional y/o metastásico, (xv) una disminución en el número o tamaño de las metástasis, (xvi) una reducción de la mortalidad, (xvii) un aumento de la tasa de supervivencia libre de cáncer de los pacientes, (xviii) un aumento en la supervivencia libre de recaída, (xix) un aumento en el número de pacientes en remisión, (xx) una disminución en la tasa de hospitalización, (xxi) el tamaño del tumor se mantiene y no aumenta de tamaño o aumenta de tamaño el tumor en menos 5% o 10% después de la administración de una terapia tal como se mide por métodos convencionales disponibles para un experto en la técnica, tales como MRI, rayos X y exploración TAC, (xxii) la prevención del desarrollo o la aparición de cáncer y/o un síntoma asociado con el mismo, (xxiii) un incremento en la duración de la remisión en los pacientes, (xxiv) la reducción en el número de síntomas asociados con el cáncer, (xxv) un aumento en la supervivencia libre de síntomas de pacientes con cáncer y/o (xxvi) la limitación o reducción de la metástasis. En algunas realizaciones, el tratamiento/terapia que recibe un sujeto no cura el cáncer, pero impide el progreso o un empeoramiento de la enfermedad. Tal como se describe en esta memoria, el tratamiento/terapia que recibe un sujeto no impide la aparición/desarrollo del cáncer, pero puede prevenir la aparición de los síntomas del cáncer.

Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión "en combinación" en el contexto de la administración de (a) terapia(s) a un sujeto, se refiere al uso de más de una terapia. El uso de la expresión "en combinación" no restringe el orden en el que se administran las terapias a un sujeto. Una primera terapia se puede administrar antes (p. ej., 5 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 12 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 8 semanas o 12 semanas antes), concomitantemente con, o con posterioridad a (p. ej., 5 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 12 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 8 semanas o 12 semanas después de) la administración de una segunda terapia a un sujeto.

Tal como se utiliza en esta memoria, los términos "terapias" y "terapia" se puede referir a cualquier protocolo(s), método(s) y/o agente(s) que se puede(n) utilizar en el tratamiento del cáncer. Tal como se describe en esta memoria, los términos "terapias" y "terapia" se refieren a terapia biológica, terapia de apoyo, terapia hormonal, quimioterapia, inmunoterapia y/u otras terapias útiles en la tratamiento del cáncer. Específicamente, una terapia incluye la terapia adyuvante. Por ejemplo, el uso de una terapia en unión con una terapia con fármacos, terapia biológica, cirugía y/o terapia de apoyo. En determinadas realizaciones, el término "terapia" se refiere a un NDV quimérico descrito en esta memoria. Alternativamente, el término "terapia" se refiere a un agente que no es un NDV quimérico.

4. BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figuras 1A-1B. NDV recombinante con proteína de fusión modificada induce una citólisis en múltiples líneas celulares de cáncer humano (A). Las líneas celulares (5×10^5 células) fueron infectadas a una MOI de 0,1 por triplicado y se realizaron ensayos de liberación de LDH a las 24, 48 y 72 horas. Se muestra el porcentaje de células supervivientes a las 24, 48 y 72 horas. (B) Formación de sincitios por parte del virus NDV(F3aa). Las líneas celulares ensayadas en (a) estaban infectadas con NDV(B1).GFP y NDV-GFP(F3aa) a una MOI de 0,01, teñidas con Hoechst después de 24 horas y las imágenes fueron tomadas bajo microscopio fluorescente. Se muestran imágenes representativas de células Panc-1 y Scc-25 (GFP verde)

Figuras 2A-2B. NDV induce la respuesta antiviral en las células cancerígenas infectadas. (A). Diagrama esquemático del bioensayo para la producción de IFN. Células Panc-1 fueron infectadas con los virus NDV a una MOI de 0,1. Los sobrenadantes se recogieron a las 24 horas, y cualquier virus presente fue inactivado por UV. Células Vero de reciente aportación se trataron con los sobrenadantes inactivados y después se infectaron con NDV-GFP a una MOI de 0,1. (B). Actividad antiviral en los sobrenadantes Pane-1 infectados. Los sobrenadantes se diluyeron en serie 5 veces. Sobrenadantes de células no infectadas e IFN β humano recombinante se utilizaron como controles negativos y positivos, respectivamente. Células Vero infectadas con NDV-GFP se examinaron por microscopía de fluorescencia

Figuras 3A-3C. Generación de virus NDV(F3aa)-NS1. (A). Diagrama esquemático del genoma del virus NDV(F3aa)-NS1 generado. (B). Expresión de la proteína NS1 en células Vero infectadas con NDV(F3aa)-NS1. Las células se infectaron a una MOI de 0,01, se fijaron a 18 horas después de la infección y se tiñeron con DAPI (azul), anticuerpo policlonal de conejo anti-NDV (verde) y anticuerpo monoclonal de ratón anti-NS1 (rojo). Células infectadas con NDV(B1) y NDV(F3aa) se utilizaron como controles negativos (C) Evolución en el tiempo de la expresión de la proteína NS1. Células Vero se infectaron con virus apropiados a una MOI de 0,1 y se recogieron en los momentos indicados. Las células se lisaron y se analizaron por inmunotransferencia con anticuerpos contra β -actina, proteínas NDV y NS1 anti-influenza

Figuras 4A-4D. El virus NDV(F3aa)-NS1 se replica e induce la oncolisis en líneas celulares de melanoma humanas y de ratón. (A). La citotoxicidad del NDV tratado mediante ingeniería genética en células B16-F10 y SKMel-2. Células B16-F10 (panel izquierdo) y células SKMel-2 (panel derecho) fueron infectadas con virus NDV(B1), NDV(F3aa) y NDV(F3aa)-NS1 en las MOIs indicadas. La citotoxicidad se evaluó a las 24, 48 y 72 horas mediante ensayos de liberación de LDH. MOIs bajas se utilizaron en células SKMel-2 debido a una mayor susceptibilidad de las células a NDV. (B). Eficiencia de la formación de sincitios por parte de los virus recombinantes. Células B16-F10 y SKMel-2 fueron infectadas con virus apropiados a una MOI de 0,001 durante 18 horas, y se fijaron y tiñeron para NDV (verde), NSI (rojo) y DAPI (azul). (C). Replicación de NDV en líneas celulares B16-F10 y SKMel-2. Las células fueron infectadas a la MOI indicada MOI y los sobrenadantes se recogieron a las 24, 48 y 72 horas. (D). Inducción de IFN β en células B16-F10 y SKMel-2. Las células fueron infectadas con el virus indicado a una MOI de 1 y los sobrenadantes se recogieron cada 2 horas durante 24 horas Los niveles de IFN β en el sobrenadante fueron evaluados mediante ELISA de IFN β humano y murino.

Figuras 5A-5D. NDV(F3aa)-NS1 suprime el crecimiento del tumor y fomenta la supervivencia del ratón en un modelo de melanoma murino singénico. (A). El crecimiento del tumor a corto plazo en ratones portadores de melanoma B16-F10 tratados con virus NDV recombinantes a los 7 días. A los ratones se les inyectaron en la almohadilla de la pata posterior derecha 10^5 células B16-F10 cultivadas, y 7 días más tarde fueron tratados con 5×10^6 virus indicados o PBS durante un total de 4 inyecciones. Todos los 8 ratones del grupo de control y 6 ratones elegidos al azar de cada uno de los grupos de virus fueron sacrificados el día 25 para estudios inmunológicos (véase la Figura 6) (B). Crecimiento del tumor a corto plazo en ratones tratados a los 10 días. A partir del día 10 después de la inyección de la línea de células tumorales, los ratones fueron tratados cada dos días con un total de 6 dosis de 5×10^6 upf del virus indicado o PBS. Cuando los tumores mayores alcanzaron 8 mm de longitud, todos los animales fueron sacrificados. (C). Seguimiento del crecimiento a largo plazo del tumor en los ratones tratados. Se continuó vigilando a los 7 animales restantes de cada uno de los grupos en (A) durante 120 días, registrándose las mediciones de tumor cada 2 días. (D). Resumen de la supervivencia de 120 días de los animales tratados en (A) Los ratones fueron sacrificados cuando los tumores alcanzaron 8 mm de longitud Para grupos experimentales, solamente los ratones incluidos en el estudio a largo plazo ($n = 7$ para cada uno de los grupos) se incluyeron en el análisis ($*p < 1 \times 10^{-6}$).

Figuras 6A-6C. El tratamiento con NDV conduce a la infiltración de linfocitos del tumor y a la generación de respuestas inmunes anti-melanoma. (A). Infiltración del tumor con células CD4+ y CD8+. Los tumores recogidos de los animales descritos en 6D se disociaron en suspensiones de una sola célula y se analizaron por citometría de flujo en cuanto a la presencia de células CD4 y CD8. (B). Liberación de IFN γ a partir de esplenocitos estimulados. Esplenocitos recogidos de los animales sacrificados en 6a fueron co-cultivados con células B16-F10 inactivadas por mitomicina e IFFy fue medida en los sobrenadantes el día 3 de co-cultivo ($*p < 0,003$, $**p < 0,00006$). (C). Citotoxicidad específica para el melanoma de los esplenocitos estimulados. Esplenocitos estimulados descritos en (b) fueron co-cultivados con células B16-F10 de reciente aportación durante 4 horas a la relaciones indicadas y la actividad citotóxica específica se determinó mediante mediciones de la liberación de LDH ($*p < 0,015$, $**p < 0,0007$)

Figura 7. NDV(F3aa)-NS1 tratado mediante ingeniería genética suprime la inducción de estado antiviral en las células infectadas. El ensayo de inducción de IFN se realizó en células HFF-1, tal como se describe en la figura 2. HFF-1 fueron infectadas con virus NDV(B1), NDV(F3aa), NDV(F3aa)-NS1, o fueran infectadas de modo simulado. Sobrenadantes de la infección se recogieron post-infección a intervalos de 2 horas durante 14 horas y se inactivaron mediante UV. Los sobrenadantes se utilizaron luego para tratar las células Vero durante 6 horas, que fueron infectadas subsiguientemente con NDV-GFP a una MOI de 0,1 durante 20 horas

Figura 8. Replicación de virus NDV(F3aa) y NDV(F3aa)-NS1 en la línea celular Vero deficiente en interferón. Las células se infectaron a las MOIs indicadas por triplicado y la producción de virus en el sobrenadante se evaluó a las 24, 48 y 72 horas mediante inmunofluorescencia.

5. DESCRIPCIÓN DETALLADA

5.1 VIRUS QUIMÉRICO DE LA ENFERMEDAD DE NEWCASTLE

Se describen en esta memoria virus quiméricos de la enfermedad de Newcastle (NDVs), que comprenden un genoma tratado mediante ingeniería genética para expresar un antagonista de interferón heterólogo. Específicamente, un genoma de un NDV es tratado mediante ingeniería genética para expresar un antagonista de interferón heterólogo. En otras palabras, el NDV sirve como la "columna vertebral" que es tratada mediante ingeniería genética para expresar los antagonistas de interferón heterólogos. Ejemplos específicos de antagonistas de interferón heterólogos se proporcionan más adelante.

La presente invención proporciona NDVs quiméricos, que comprenden un genoma tratado mediante ingeniería genética para expresar un antagonista de interferón heterólogo y una proteína F modificada. En una realización, un genoma de un NDV es tratado mediante ingeniería genética para expresar un antagonista de interferón heterólogo y una proteína F modificada. Específicamente, el NDV quimérico que expresa la proteína F modificada es altamente fusogénico y es capaz de formar sincitios. Específicamente, la proteína F modificada se incorpora en el virión. Específicamente, el genoma de un NDV tratado mediante ingeniería genética para expresar un antagonista de interferón heterólogo comprende una secuencia que codifica la proteína V de NDV. Alternativamente, el genoma de un NDV tratado mediante ingeniería genética para expresar un antagonista de interferón heterólogo no comprende una secuencia que codifica la proteína V de NDV.

Tal como se describe en esta memoria, un genoma de un NDV es tratado mediante ingeniería genética para expresar un antagonista de interferón heterólogo y una proteína F modificada con un sitio de escisión mutado. En una realización específica, el NDV se ha diseñado para expresar una proteína F modificada, en la que el sitio de escisión de la proteína F se modifica para producir una secuencia de aminoácidos polibásica, lo que permite que la proteína sea escindida por proteasas intracelulares, lo que hace al virus más eficaz para penetrar en las células y formar sincitios. En otra realización específica, el NDV es tratado mediante ingeniería genética para expresar una proteína F modificada, en la que el sitio de escisión de la proteína F se sustituye con uno que contiene uno o dos residuos de arginina extras, permitiendo que el sitio de escisión mutante sea activado por proteasas de expresión ubicua de la familia furina. Ejemplos específicos de NDVs que expresan una proteína F modificada de este tipo incluyen, pero no se limitan a rNDV/F2aa y rNDV/F3aa. Para una descripción de mutaciones introducidas en una proteína F de NDV para producir una proteína F modificada con un sitio de escisión mutado, véase, p. ej., Park et al (2006) Engineered viral vaccine constructs with dual specificity avian influenza and Newcastle disease PNAS USA 103: 8203-2808. Alternativamente, la proteína F modificada es de un tipo o cepa diferente de NDV que el NDV de la columna vertebral. Específicamente, la proteína F modificada reemplaza a proteína F de NDV de la columna vertebral. Se describen en esta memoria NDVs quiméricos que comprenden un genoma tratado mediante ingeniería genética para expresar un antagonista de interferón heterólogo y un antígeno tumoral. Específicamente, un genoma de un NDV es tratado mediante ingeniería genética para expresar un antagonista de interferón heterólogo y un antígeno tumoral. Específicamente, el genoma del NDV es tratado mediante ingeniería genética para expresar un ARNm bicistrónico que codifica el antagonista de interferón heterólogo y el antígeno tumoral.

En otro aspecto, se describen en esta memoria NDVs quiméricos, que comprenden un genoma tratado mediante ingeniería genética para expresar un antagonista de interferón heterólogo, una proteína F modificada y un antígeno tumoral. En una realización específica, los NDVs quiméricos que expresan la proteína F modificada son muy fusogénicos. Específicamente, un genoma de un NDV es tratado mediante ingeniería genética para expresar un antagonista de interferón heterólogo, un antígeno tumoral y una proteína F modificada con un sitio de escisión mutante (tal como se describe en esta memoria). Específicamente, la proteína F modificada se incorpora en el virión. Específicamente, el genoma del NDV es tratado mediante ingeniería genética para expresar un ARNm bicistrónico o multicistrónico que codifica uno o más de los siguientes: el antagonista de interferón heterólogo, el antígeno tumoral y la proteína F modificada.

Se describen en esta memoria NDVs quiméricos, que componen un genoma tratado mediante ingeniería genética para expresar un antagonista de interferón heterólogo y una citoquina. Un genoma de un NDV es tratado mediante ingeniería genética para expresar un antagonista de interferón heterólogo y una citoquina, que se expresan y se incorporan en el NDV. El genoma del NDV es tratado mediante ingeniería genética para expresar un ARNm bicistrónico que codifica el antagonista de interferón heterólogo y la citoquina. Ejemplos específicos de citoquinas incluyen, pero no se limitan a interleuquina (IL)-2, IL-7, IL-9, IL-15, IL-22 y factor de necrosis tumoral (TNF)-beta. En una realización específica, un genoma de NDV es tratado mediante ingeniería genética para expresar un antagonista de interferón heterólogo e IL-2.

Se describen en esta memoria NDVs quiméricos que comprenden un genoma tratado mediante ingeniería genética para expresar un antagonista de interferón heterólogo, una citoquina y una proteína F modificada. Específicamente, los NDVs quiméricos que expresan la proteína F modificada son muy fusogénicos. Específicamente, un genoma de un NDV es tratado mediante ingeniería genética para expresar un antagonista de interferón heterólogo, una citoquina y una proteína F modificada con un sitio de escisión mutante (tal como se describe en esta memoria). Específicamente, el genoma del NDV es tratado mediante ingeniería genética para expresar un ARNm bicistrónico o multicistrónico que codifica uno o más de los siguientes: el antagonista de interferón heterólogo, la citoquina y la

proteína F modificada. Específicamente, un genoma de NDV es tratado mediante ingeniería genética para expresar un antagonista de interferón heterólogo, IL-2 y una proteína F modificada con un sitio de escisión mutante (tal como se describe en esta memoria). En realizaciones específicas, la proteína F modificada se incorpora en el virión.

5 Se describen en esta memoria NDVs quiméricos que comprenden un genoma tratado mediante ingeniería genética para expresar un antagonista de interferón heterólogo, una citoquina y un antígeno tumoral. Específicamente, un genoma de un NDV es tratado mediante ingeniería genética para expresar un antagonista de interferón heterólogo, una citoquina y un antígeno tumoral. Específicamente, el genoma del NDV es tratado mediante ingeniería genética para expresar un ARNm bicistrónico o multicistrónico que codifica dos o más de los siguientes: el antagonista de interferón heterólogo, la citoquina y el antígeno tumoral. En una realización específica, un genoma de NDV es tratado mediante ingeniería genética para expresar un antagonista de interferón heterólogo, IL-2 y un antígeno tumoral.

10 Se describen en esta memoria NDVs quiméricos que comprenden un genoma tratado mediante ingeniería genética para expresar un antagonista de interferón heterólogo, una citoquina, un antígeno tumoral y una proteína F modificada. Específicamente, los NDVs quiméricos tratados mediante ingeniería genética para expresar la proteína F modificada son muy fisiogénicos. Específicamente, un genoma de un NDV es tratado mediante ingeniería genética para expresar un antagonista de interferón heterólogo, una citoquina, un antígeno tumoral y una proteína F modificada con un sitio de escisión mutante (tal como se describe en esta memoria). Específicamente, el genoma del NDV es tratado mediante ingeniería genética para expresar un ARNm bicistrónico o multicistrónico que codifica dos o más de los siguientes: el antagonista de interferón heterólogo, la citoquina, el antígeno tumoral y la proteína F modificada. En una realización específica, un genoma de NDV es tratado mediante ingeniería genética para expresar un antagonista de interferón heterólogo, IL-2, un antígeno tumoral y una proteína F modificada con un sitio de escisión mutante (tal como se describe en esta memoria).

25 Cualquier tipo o cepa de NDV puede servir como la columna vertebral que es tratado mediante ingeniería genética para expresar un antagonista de interferón heterólogo, y en determinadas realizaciones, es tratado mediante ingeniería genética para expresar un antígeno tumoral, una citoquina y/o una proteína F modificada, incluyendo cepas, variantes o mutantes que se producen de forma natural, virus mutagenizados, recombinantes y/o manipulados genéticamente. Tal como se describe en esta memoria, el NDV que sirve como la cadena vertebral para la ingeniería genética es una cepa que se produce de forma natural; el NDV que sirve como la columna vertebral para la ingeniería genética es una cepa lítica. El NDV que sirve como la columna vertebral de la ingeniería genética es una cepa no lítica; el NDV que sirve como la cadena principal para la ingeniería genética es la cepa lentógena; el NDV que sirve como la cadena principal para la ingeniería genética es una cepa mesogénica; el NDV que sirve como la cadena principal para la ingeniería genética es una cepa velogénica. Ejemplos específicos de cepas de NDV incluyen la cepa 73-T, la cepa NDV HUI, la cepa Ulster, la cepa MTH-68, la cepa Italiana, la cepa Hickman, la cepa PV701, la cepa Hitchner B1, la cepa La Sota (véase, p. ej., GenBank N° AY845400), la cepa YG97, la cepa MET95, la cepa Roakin y la cepa F48E9. En una realización específica, el NDV que sirve como la columna vertebral para la ingeniería genética es una cepa B1 como la identificada por Genbank No AF309418 o NC_002617. En una realización específica, el NDV que sirve como la columna vertebral para la ingeniería genética es identificada por ATCC N° VR2239. Específicamente, el NDV que sirve como la columna vertebral para la ingeniería genética es la cepa Hitchner B1. Específicamente, el NDV que sirve como la columna vertebral para la ingeniería genética es la cepa La Sota.

40 Tal como se describe en esta memoria, se desea la atenuación o atenuación adicional del NDV quimérico de manera que el NDV quimérico permanece siendo, al menos parcialmente, infeccioso y puede replicar *in vivo*, pero sólo puede generar títulos bajos que resultan en niveles subclínicos de infección que son no patógenos (véase, p. ej., Khattar et al, 2009, J Virol 83 7779-7782). El NDV es atenuado por la delección de la proteína V. Estos NDVs quiméricos atenuados pueden ser especialmente adecuados para realizaciones en las que el virus se administra a un sujeto con el fin de actuar como un inmunógeno, p. ej., una vacuna viva. Los virus se pueden atenuar mediante cualquier método conocido en la técnica.

50 Tal como se describe en esta memoria, además de expresar un antagonista de interferón heterólogo y uno, dos o más de un antígeno tumoral, una proteína F modificada y una citoquina, un NDV quimérico está diseñado para expresar un gen suicida (p. ej., timidina quinasa) u otra molécula que inhibe la replicación o función del NDV (un gen que hace al NDV sensible a un antibiótico o un agente anti-viral). Además de expresar un antagonista de interferón heterólogo y uno, dos o más de un antígeno tumoral, una proteína F modificada y una citoquina, un NDV quimérico es tratado mediante ingeniería genética para codificar sitios diana de microARN (miARN) específico para el tejido (p. ej., sitios fijados como objetivo por microARNs miR-21, miR-184, miR 133a/133b, miR-137 y/o miR-193a).

60 Tal como se describe en esta memoria, el antagonista de interferón heterólogo se puede insertar en el genoma de la columna vertebral del NDV entre dos unidades de transcripción. Específicamente, el antagonista de interferón heterólogo se inserta en el genoma de la columna vertebral del NDV entre las unidades de transcripción M y P o entre las unidades de transcripción HN y L de acuerdo con otras realizaciones de esta memoria, el antígeno tumoral, citoquinas y/o proteína F modificada se insertan en el genoma de la columna vertebral del NDV entre dos o más unidades de transcripción.

5.1.1. ANTAGONISTAS DE INTERFERONES

Los NDVs quiméricos descritos en esta memoria pueden tratarse mediante ingeniería genética para expresar cualquier antagonista de interferón heterólogo conocido por un experto en la técnica. Los antagonistas de interferón se pueden identificar utilizando cualquier técnica conocida para un experto en la técnica, incluyendo, p. ej., las técnicas descritas en las Patentes de EE.UU. N°s 6.635.416, 7.060.430 y 7.442.527. La capacidad de un antagonista de interferón heterólogo de inhibir o reducir la respuesta inmune de IFN en un sujeto en particular o en células o tejidos de un sujeto particular se considera cuando se selecciona el antagonista de interferón heterólogo. Por ejemplo, puede haber algunos antagonistas de interferón heterólogos que no inhiben de manera eficiente o reducen la respuesta inmune de IFN (p. ej., el antagonista de interferón heterólogo reduce la respuesta inmune de IFN en menos de 10% con respecto a un control) en un sujeto particular o en células o tejidos de un sujeto particular.

En una realización específica, el antagonista de interferón heterólogo es una proteína viral. Proteínas virales de este tipo se pueden obtener o derivar de cualquier virus y el virus puede infectar cualquier especie (p. ej., el virus puede infectar seres humanos o mamíferos no humanos). Ejemplos específicos de proteínas virales de este tipo incluyen, pero no se limitan a la proteína NS1 del virus de la gripe, la proteína W del virus Nipah, la proteína VP35 del virus del Ébola, la proteína E3L del virus vacuna, NS2 del virus respiratorio sincitial (RSV), la proteína ICP34.5 del virus herpes simplex (HSV) tipo 1 y la proteasa NS3-4 de la hepatitis C. Para ejemplos no limitantes de secuencias para proteínas virales de este tipo, véase, p. ej., GenBank N° P0C1C7 (GI 97217605) para la proteína W del virus Nipah, GenBank N° Q99F2 (GI 81966537) para la proteína V del virus Nipah, GenBank N° AAG40165 (GI 11761747), GenBank N° ACI2861 (GI 208436387), GenBank N° BAB69004 (GI 15823610) y GenBank N° ABY75322 (GI 165940956) para la proteína VP35 del virus del Ébola, GenBank N° AAA02759 (GI 400554) y GenBank N° ABA82148 (GI 77434422) para la proteína E3L del virus vacuna, GenBank N° AAB86657.1 (GI 2627298), GenBank N° AAC14895.1 (GI 3089373), GenBank N° AAB86669.1 (GI 2627311), GenBank N° AAC55963.1 (GI 169525) y GenBank N° NP_048049.1 (GI 9631269) para la proteína NS2 de RSV, GenBank N° P08353.2 (GI 585297), GenBank N° P36313.2 (GI 189044575) y GenBank N° NP_044661.1 (GI 9629440) para la proteína ICP34.5 de tipo 1; y GenBank N° CAA47139 (GI 505039), GenBank N° ABB90275 (GI 83026335), GenBank N° AAF75999 (GI 8515433), GenBank N° NP_040984.1 (GI 8486133), GenBank N° AB021703.1 (GI 126599212) y GenBank N° AAA43536.1 (GI 324835) para el virus NS1 de la gripe. En una realización específica, el antagonista de interferón heterólogo es la proteína NS1 del virus de la gripe. En otra realización específica, el antagonista de interferón heterólogo es la proteína NS1 del virus de la gripe cepa A/Puerto Rico/8/34 (conocida como PR8, véase, p. ej., GenBank N° NP_040984.1 (GI 8486133), GenBank N° ABO21703.1 (GI 126599212) y GenBank N° AAA43536.1 (GI 324835)). En otra realización específica, el antagonista de interferón heterólogo es la proteína NS1 del virus de la gripe identificado como GenBank N° ABP64726 (GI 145322844), ABP64736 (GI 145322862), ACR15353 (GI 237689102), ACO94842 (GI 226954813), ACO94831 (GI 226954794), Q82506 (GI 75567388), AAA21580 (GI 541605), ACF54603 (GI 194352380), ABF47960 (GI 94960380) o ABF83571 (GI 107061839).

Alternativamente, el antagonista de interferón heterólogo es una proteína viral que contiene una o más mutaciones (p. ej., sustituciones, deleciones y/o deleciones). Por ejemplo, el antagonista de interferón heterólogo puede ser una forma mutada de una o más de los siguientes proteínas virales: proteína NS1 del virus de la gripe, proteína W del virus Nipah, proteína V del virus Nipah, proteína VP35 del virus del Ébola, proteína E3L del virus vacuna, NS2 del virus respiratorio sincitial (RSV), proteína ICP34.5 del virus herpes simplex (HSV) tipo 1 y/o proteasa NS3-4 de la hepatitis C. Específicamente, el antagonista de interferón heterólogo se deriva de un virus atenuado. Alternativamente, el antagonista de interferón heterólogo es una proteína viral que está mutada de manera que la capacidad de la proteína viral de inhibir o reducir la respuesta inmune del interferón se reduce en aproximadamente el 10%, aproximadamente el 15%, aproximadamente el 25%, aproximadamente el 30%, aproximadamente el 40%, aproximadamente el 50%, aproximadamente el 10% a aproximadamente el 25%, aproximadamente el 25% a aproximadamente el 50%, aproximadamente el 25% a aproximadamente el 50% o aproximadamente el 25% a aproximadamente el 75% con relación al homólogo de tipo salvaje de la proteína viral tal como se mide por un ensayo conocido por un experto en la técnica, p. ej., la expresión de IFN o la expresión de un gen inducida en respuesta a IFN (tal como el gen 15 que responde al interferón (IFRG- 15)), p. ej., mediante un inmunoensayo tal como un ELISA, FACS o transferencia Western.

Tal como se describe en esta memoria, el antagonista de interferón heterólogo es una NS1 del virus de la gripe mutada, en donde la NS1 del virus de la gripe mutada es de cualquier tipo de virus de la gripe. Específicamente, la NS1 del virus de la gripe mutada es del virus de la gripe porcina; la NS1 del virus de la gripe mutada es de virus de la gripe aviar; la NS1 del virus de la gripe mutada es del virus de la gripe equina; la NS1 del virus de la gripe mutada es del virus de la gripe humana; la NS1 del virus de la gripe mutada es de un virus de la gripe A. Ejemplos de virus de la gripe A incluyen el subtipo H10N4, el subtipo H10N5, el subtipo H10N7, el subtipo H10N8, el subtipo H10N9, el subtipo H11N1, el subtipo H11N13, el subtipo H11N2, el subtipo H11N4, el subtipo H11N6, el subtipo H11N8, el subtipo H11N9, el subtipo H12N1, el subtipo H12N4, el subtipo H12N5, el subtipo H12N8, el subtipo H13N2, el subtipo H13N3, el subtipo H13N6, el subtipo H13N7, el subtipo H14N5, el subtipo H14N6, el subtipo H15N8, el subtipo H15N9, el subtipo H16N3, el subtipo H1N1, el subtipo H1N2, el subtipo H1N3, el subtipo H1N6, el subtipo H1N9, el subtipo H2N1, el subtipo H2N2, el subtipo H2N3, el subtipo H2N5, el subtipo H2N7, el subtipo H2N8, el subtipo H2N9, el subtipo H3N1, el subtipo H3N2, el subtipo H3N3, el subtipo H3N4, el subtipo H3N5, el subtipo H3N6, el subtipo H3N8, el subtipo H3N9, el subtipo H4N1, el subtipo H4N2, el subtipo H4N3, el subtipo H4N4, el

subtipo H4N5, el subtipo H4N6, el subtipo H4N8, el subtipo H4N9, el subtipo H5N1, el subtipo H5N2, el subtipo H5N3, el subtipo H5N4, el subtipo H5N6, el subtipo H5N7, el subtipo H5N8, el subtipo H5N9, el subtipo H6N1, el subtipo H6N2, el subtipo H6N3, el subtipo H6N4, el subtipo H6N5, el subtipo H6N6, el subtipo H6N7, el subtipo H6N8, el subtipo H6N9, el subtipo H7N1, el subtipo H7N2, el subtipo H7N3, el subtipo H7N4, el subtipo H7N5, el subtipo H7N7, el subtipo H7N8, el subtipo H7N9, el subtipo H8N4, el subtipo H8N5, el subtipo H9N1, el subtipo H9N2, el subtipo H9N3, el subtipo H9N5, el subtipo H9N6, el subtipo H9N7, el subtipo H9N8 y el subtipo H9N9. Alternativamente, la NS1 del virus de la gripe mutada es del virus de la gripe B. Alternativamente, la NS del virus de la gripe mutada es del virus de la gripe C.

Tal como se describe en esta memoria, el antagonista de interferón heterólogo es una proteína NS1 del virus de la gripe mutada descrita en la patente de EE.UU. N° 6.669.943 o las Publicaciones de EE.UU. N°s 2008/0254060 (ahora expedida como Patente de EE.UU. N° 7.588.768) o 2009/0010962. El antagonista de interferón heterólogo es una proteína NS1 mutada de 60 a 130, 70 a 130, 70 a 126, 70 a 124, 70 a 120, 70 a 110, 70 a 100, 70 a 85 ó 70 a 80 aminoácidos de longitud desde el extremo amino. Alternativamente, el antagonista de interferón heterólogo es una proteína NS1 mutada de 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 99, 100, 105, 110, 115, 120, 124, 125, 126, 127 ó 130 aminoácidos de longitud desde el extremo amino. Alternativamente, el antagonista de interferón heterólogo es una proteína NS1 mutada de 60-70, 70-80, 80-90, 90-100, 100-110, 110-120, 120-130, 120-140 ó 60-140 aminoácidos de longitud desde el extremo amino. La proteína NS1 se contabiliza basándose en la proteína NS1 de la cepa PR8 del virus de la gripe (p. ej., GenBank N° ABP64726 (GI 145322844), ABP64736 (GI 145322862), ACR15353 (GI 237689102), ACO94842 (GI 226954813) o ACO94831 (GI 226954794)) o de la cepa WSN (p. ej., GenBank N° AAA21580 (GI 541605), ACF54603 (GI 194352380), ABF47960 (GI 94960380) o ABF83571 (GI 107061839)).

Tal como se describe en esta memoria, el antagonista de interferón heteróloga es una proteína celular. Proteínas celulares de este tipo incluyen proteínas celulares dominantes negativas que bloquean la inducción o la respuesta a la inmunidad innata y reguladores celulares de la respuesta inmune. Ejemplos específicos de proteínas celulares negativas dominantes incluyen STAT1 dominante negativa (Walter et al. (1997) Targeted inhibition of Interferon- γ -dependent intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression using dominant-negative Stat 1 *J. Biol. Chem.* 272: 28582-28589), RIG-1 dominante-negativa (Yoneyama et al. (2004). La ARN helicasa RIG-I tiene una función esencial en las respuestas antivirales innatas inducidas por ARN de doble cadena. *Nature Immunology* 5: 730-737); IRF-3 dominante-negativa (Foy et al (2003). Regulation of Interferon Regulatory Factor-3 by the Hepatitis C Virus Serine Protease. *Science*: 300: 1145-1148), proteínas IKK y TBK dominantes negativas (Sharma et al. (2003). Triggering the Interferon Antiviral Response Through an IKK-Related Pathway. *Science* 300: 1148-1151); y MyD88 dominante negativa (Dupraz et al (2000). Dominant Negative MyD88 Proteins Inhibit Interleukin-1/Interferon-mediated Induction of Nuclear Factor B-dependant Nitrite Production and Apoptosis in Cells. *J. Biol. Chem.* 275: 37672-37678). Ejemplos específicos de reguladores celulares de la respuesta inmune innata incluyen: proteínas SOCS, proteínas PIAS, proteínas CYLD, proteínas I κ B, proteína Atg5, proteína Pin1, proteína IRAK-M, y UBP43.

5.1.2. ANTÍGENOS TUMORALES

Los NDVs quiméricos descritos en esta memoria pueden tratarse mediante ingeniería genética para expresar cualquier antígeno tumoral conocido en la técnica. Antígenos tumorales incluyen antígenos asociados a tumores y antígenos específicos para tumores. Ejemplos específicos de antígenos tumorales incluyen, pero no se limitan a MAGE-1, MAGE-3, BAGE, GAGE-1, GAGE-2, N-acetilglucosaminiltransferasa-V, p-15, gp100, MART-1/MelanA, TRP-1 (gp75), tirosinasa, quinasa dependiente de ciclina 4, β -catenina, MUM-1, CDK4, HER-2/neu, papilomavirus humano-E6, papilomavirus humano E7, CD20, antígeno carcinoembrionario (CEA), receptor del factor de crecimiento epidérmico, MUC-1, caspasa-8, CD5, mucina-1, Lewisx, CA-125, p185HER2, IL-2R, Fap- α , tenascina, antígenos asociados con una metaloproteína y CAMPATH-1. Otros ejemplos incluyen antígeno de carcinoma de pene KS 1/4, antígeno de carcinoma de ovario (CA 125), fosfato ácido prostático, antígeno específico de próstata, antígeno asociado a melanoma p97, antígeno de melanoma gp75, antígeno de melanoma de alto peso molecular (HMW-MAA), antígeno de membrana específico de la próstata, CEA, antígeno de mucina epitelial polimórfico, antígeno de glóbulo de grasa de leche, antígenos asociados a tumor colorrectal (tales como CEA, TAG-72, CO17-1A, GICA 19-9, CTA-1 y LEA), antígeno de linfoma de Burkitt 38-13, CD19, antígeno de linfoma B-CD20, CD33, antígenos específicos de melanoma (tales como gangliósido GD2, gangliósido GD3, gangliósido GM2, gangliósido GM3), tipo de trasplante específico de tumores de antígenos de la superficie celular (TSTA) (tales como antígenos tumorales inducidas por virus, incluyendo los virus tumorales de ADN de antígeno T y antígenos de la envuelta de virus tumorales de ARN), antígeno-alfa-fetoproteína oncofetal tal como CEA de colon, antígeno oncofetal de tumores de vejiga, antígeno de diferenciación (tal como antígeno de carcinoma de pulmón humano L6 y L20), antígenos de fibrosarcoma, antígeno-GP37 de células T de leucemia, neoglicoproteína, esfingolípidos, antígenos de cáncer de mama (tales como EGFR (receptor del factor de crecimiento epidérmico), antígeno HER2 (p185.sup.HER2) y epítipo HER2 neu), mucina epitelial polimórfica (PEM), antígeno-APO-1 de linfocitos humanos malignos, antígeno de diferenciación (tal como antígeno I que se encuentra en eritrocitos fetales, endodermo primario, antígeno I que se encuentra en eritrocitos de adultos, embriones de pre-implantación, I(Ma) encontrado en adenocarcinomas gástricos, M18, M39 encontrado en el epitelio de mama, SSEA-1 encontrado en células mieloides, VEP8, VEP9, Myl, VIM-D5, D.sub.156-22 encontrado en el cáncer colorrectal, TRA-1-85 (grupo sanguíneo H), C14 encontrado en el adenocarcinoma de colon, F3 encontrado en el adenocarcinoma de pulmón, AH6 encontrado en el cáncer gástrico, hapteno Y, Le.sup.y encontrado en células de carcinoma embrionario, TL5 (grupo sanguíneo A), receptor de EGF

5 encontrado en células A431, serie E₁ (grupo sanguíneo B) que se encuentran en el cáncer de páncreas, FC 10.2 encontrado en células de carcinoma embrionario, antígeno de adenocarcinoma gástrico, CO-514 (grupo sanguíneo Le^a) encontrado en adenocarcinoma, NS-10 encontrado en adenocarcinomas, CO-43 (grupo sanguíneo Le^b), G49 encontrado en el receptor EGF de células A431, MH2 (grupo sanguíneo AL^e/Le^y) encontrado en el adenocarcinoma de colon, 19.9 encontrado en el cáncer de colon, mucinas de cáncer gástrico, T₅A₇ encontrado en células mieloides, R24 encontrado en melanoma, 4.2, G_{D3}, D1.1, OFA-1, G_{M2}, OFA-2, G_{D2} y M1:22:25:8 encontrado en células de carcinoma embrionario y SSEA-3 y SSEA-4 encontrados en embriones en fase de 4 a 8 células), péptido derivado del receptor de células T de un linfoma de células T cutáneo, proteína C reactiva (CRP), antígeno-50 cancerígeno (CA-50), antígeno 15-3 cancerígeno (CAL15-3) asociado con el cáncer de mama, antígeno-19 cancerígeno (CA-19) y antígeno-242 cancerígeno asociado con cánceres gastrointestinales, antígeno asociado a carcinoma A (CAA), cromogranina A, antígeno de mucina epitelial (MC5), antígeno específico del epitelio humano (E1A), antígeno de Lewis(a), antígeno de melanoma, antígenos 100, 25 y 150 asociados a melanoma, antígeno asociado a carcinoma de tipo mucina, proteína relacionada con la resistencia a múltiples fármacos (MRPm6), proteína relacionada con la resistencia a múltiples fármacos (MRP4), proteína de oncogén Neu (C-erbB-2), enolasa específica de neuronas (NSE), P-glicoproteína (producto del gen *mdr1*), antígeno relacionado con la resistencia a múltiples fármacos, p170, antígeno relacionado con la resistencia a múltiples fármacos, antígeno específico de la próstata (PSA), CD56 y NCAM.

5.2 CONSTRUCCIÓN DE NDVs QUIMÉRICOS

20 Los NDVs quiméricos descritos en esta memoria se pueden generar utilizando la técnica de genética inversa. La técnica de genética inversa implica la preparación de ARNs virales recombinantes sintéticos que contienen las regiones no codificantes del ARN viral de cadena negativa, que son esenciales para el reconocimiento por parte de polimerasas virales y para el empaquetado de señales necesarias para generar un virión maduro. Los ARNs recombinantes se sintetizan a partir de un molde de ADN recombinante y se reconstituyen *in vitro* con un complejo de polimerasa viral purificada para formar ribonucleoproteínas (RNPs) recombinantes que se pueden utilizar para transfectar células. Se consigue una transfección más eficaz si las proteínas de polimerasa viral están presentes durante la transcripción de los ARNs sintéticos, ya sea *in vitro* o *in vivo*. Las RNPs recombinantes sintéticas pueden ser rescatadas en partículas de virus infecciosos. Las técnicas que anteceden se describen en la Patente de EE.UU. N° 5.166.057, expedida el 24 de noviembre de 1992; en la Patente de EE.UU. N° 5.854.037, expedida el 29 diciembre de 1998; en la Patente de EE.UU. N° 6.146.642, expedida el 14 de noviembre de 2000; en la Publicación de Patente Europea EP 0702085A1, publicada el 20 de febrero de 1996; en la Solicitud de Patente de EE.UU. N° de serie 09/152.845; en las Publicaciones de Patente Internacional PCT WO97/12032, publicada el 3 de abril de 1997; WO96/34625, publicada el 7 de noviembre de 1996; en la Publicación de Patente Europea EP A780475; WO 99/02657, publicada el 21 de enero de 1999; WO 98/53078, publicada el 26 de noviembre de 1998; WO 98/02530, publicada el 22 de enero de 1998; WO 99/15672, publicada el 1 de abril de 1999; WO 98/13501, publicada el 2 de abril de 1998; WO 97/06270, publicada el 20 de febrero de 1997; y EPO 780 475A1, publicada el 25 de junio de 1997.

La tecnología de plásmido libre de helper también se puede utilizar para tratar mediante ingeniería genética un NDV quimérico descrito en esta memoria. En síntesis, se construye un ADNc completo de un NDV (p. ej., la cepa Hitchner B1), se inserta en un vector de plásmido y trata mediante ingeniería genética para que contenga un sitio de restricción único entre dos unidades de transcripción (p. ej., el los genes P y M de NDV; o los genes HN y L de NDV). Un antagonista de interferón heterólogo o antígeno tumoral pueden insertarse en el genoma viral en el sitio de restricción único. Alternativamente, un antagonista de interferón heterólogo o antígeno tumoral se puede tratar mediante ingeniería genética en una unidad de transcripción de NDV en tanto la inserción no afecte a la capacidad del virus de infectar y replicar. El segmento sencillo está situado entre un promotor T7 y la ribozima del virus de la hepatitis delta para producir un transcrito negativo exacto de la polimerasa T7. El vector de plásmido y los vectores de expresión que comprenden las proteínas virales necesarias son transfectados en células que conducen a la producción de partículas virales recombinantes (véase, p. ej., la Publicación Internacional N° WO 01/04333; las patentes de EE.UU. n° 7.442.379, 6.146.642, 6.649.372, 6.544.785 y 7.384.774, Swayne et al. (2003). Avian Dis 47: 1047-1050; y Swayne et al. (2001) J. Virol. 11868-11873.

50 Técnicas bicistrónicas para producir múltiples proteínas a partir de un ARNm sencillo son conocidas para un experto en la técnica. Técnicas bicistrónicas permiten el tratamiento mediante ingeniería genética de secuencias de proteínas múltiples en un ARNm sencillo mediante el uso de secuencias IRES. Las secuencias IRES dirigen el reclutamiento interno de ribosomas a la molécula de ARN y permiten la traducción aguas abajo de manera independiente del remate. En síntesis, una región codificadora de una proteína se inserta en el ORF (siglas inglesas de marco de lectura abierto) de una segunda proteína. La inserción está flanqueada por un IRES y cualesquiera secuencias de señal sin traducir, necesarias para la expresión y/o la función adecuada. La inserción no debe alterar el marco de lectura abierto, promotores de poliadenilación o de transcripción de la segunda proteína (véase, p. ej., García-Sastre et al., 1994, J. Virol. 68: 6254-6261 y García-Sastre et al., 1994 Dev. Biol. Stand. 82:237-246).

5.3 PROPAGACIÓN DE NDVs QUIMÉRICOS

Los NDVs quiméricos descritos en esta memoria se pueden propagar en cualquier sustrato que permita que el virus crezca hasta títulos que permitan los usos de los virus descritos en esta memoria. En una realización, el sustrato permite que los NDVs quiméricos descritos en esta memoria crezcan hasta títulos equiparables a los determinados para el o los virus de tipo salvaje correspondientes.

Los NDVs quiméricos descritos en esta memoria pueden ser cultivados en células (p. ej., células aviares, células de pollo, etc.) que son susceptibles a la infección por los virus, huevos embrionados (p. ej., huevos de pollo o huevos de codorniz) o animales (p. ej. aves). Este tipo de métodos son bien conocidos para los expertos en la técnica. En una realización específica, los NDVs quiméricos se pueden propagar en células cancerígenas, p. ej., células de carcinoma (p. ej., células de cáncer de mama y células de cáncer de próstata), células de sarcoma, células de leucemia, células de linfoma y células tumorales de células germinales (p. ej., células cancerígenas testiculares y células cancerígenas de ovario). En otra realización específica, los NDVs quiméricos pueden propagarse en líneas celulares, p. ej., líneas celulares cancerígenas tales como células HeLa, células MCF7, células THP-1, células U87, células DU145, células Lncap y células T47D. Tal como se describe en esta memoria, los NDVs quiméricos descritos en esta memoria se propagan en células de pollo o huevos embrionados. Células de pollo representativas fibroblastos de embrión de pollo y células de riñón de embrión de pollo. Alternativamente, los NDVs quiméricos se propagan en células Vero. Alternativamente, los NDVs quiméricos se propagan en células cancerígenas de acuerdo con los métodos descritos en la Sección 6 que figura más adelante. En otra realización específica, los NDVs quiméricos se propagan en huevos de pollo o huevos de codorniz. Alternativamente, virus NDV quiméricos se propagan primero en huevos embrionados y luego se propagan en células (p. ej., una línea celular).

Los NDVs quiméricos descritos en esta memoria pueden ser propagados en huevos embrionados, p. ej., de 6 a 14 días de edad. Se pueden utilizar huevos embrionados jóvenes o inmaduros para propagar los NDVs quiméricos descritos en esta memoria. Huevos embrionados inmaduros abarcan los huevos que son huevos de menos de diez días de edad, p. ej., huevos de 6 a 9 días de edad o de 6 a 8 días de edad que son IFN-deficientes. Huevos embrionados inmaduros también abarcan huevos que son huevos inmaduros artificialmente miméticos de hasta, pero menos de diez días de edad, como resultado de alteraciones de las condiciones de crecimiento, p. ej., los cambios en las temperaturas de incubación, el tratamiento con fármacos, o cualquier otra alteración que resulte en un huevo con un desarrollo retardado, de manera que el sistema de IFN no está completamente desarrollado en comparación con los huevos de diez a doce días de edad. Los NDVs quiméricos descritos en esta memoria pueden ser propagados en diferentes ubicaciones del huevo embrionado, p. ej., la cavidad alantoidea. Para una discusión detallada sobre el crecimiento y la propagación de virus, véase, p. ej., la Patente de EE.UU. N° 6.852.522 y la Patente de EE.UU. N° 7.494.808.

Para el aislamiento del virus, los NDVs quiméricos descritos en esta memoria pueden ser separados del cultivo celular y separados de los componentes celulares, típicamente mediante procesos de aclaración bien conocidos, p. ej., tal como centrifugación de gradiente y cromatografía en columna, y puede purificarse adicionalmente según se desee utilizando procesos bien conocidos por los expertos en la técnica, p. ej., ensayos de placa.

5.4 COMPOSICIONES Y VÍAS DE ADMINISTRACIÓN

Abarcado en esta memoria está el uso de un NDV quimérico descrito en esta memoria en composiciones. También abarcado en esta memoria está el uso de fragmentos de membrana de plasma de células infectadas con NDV quimérico o células cancerígenas enteras infectadas con NDV quimérico en las composiciones. En una realización específica, las composiciones son composiciones farmacéuticas tales como formulaciones inmunogénicas (p. ej., formulaciones de vacuna). Las composiciones pueden utilizarse en métodos de tratamiento de cáncer.

En una realización, una composición farmacéutica comprende un NDV quimérico descrito en esta memoria, en una mezcla con un soporte farmacéuticamente aceptable. Alternativamente, una composición farmacéutica (p. ej., una vacuna contra el oncolisado) comprende un concentrado de proteína o un preparado de fragmentos de membrana de plasma de células cancerígenas infectadas con NDV quimérico, en mezcla con un soporte farmacéuticamente aceptable. Alternativamente, una composición farmacéutica (p. ej., una vacuna de células enteras.) comprende células cancerígenas infectadas con NDV quimérico, en mezcla con un soporte farmacéuticamente aceptable. Las composiciones farmacéuticas proporcionadas en esta memoria pueden estar en cualquier forma que permita que la composición sea administrada a un sujeto. En una realización específica, las composiciones farmacéuticas son adecuadas para la administración veterinaria y/o humana. Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión "farmacéuticamente aceptable" significa aprobada por una agencia reguladora del gobierno Federal o un gobierno estatal o listada en la Farmacopea de EE.UU. u otras farmacopeas generalmente reconocidas para uso en animales, y más particularmente en seres humanos. La expresión "soporte" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo con el que la composición farmacéutica se administra. Disoluciones salinas y disoluciones acuosas de dextrosa y glicerol también pueden emplearse como soportes líquidos, particularmente para disoluciones inyectables. Excipientes adecuados incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, greda, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro sódico, leche descremada en polvo, glicerol, propilenglicol, agua, etanol y similares. Ejemplos de soportes farmacéuticos adecuados se describen en "Remington's Pharmaceutical Sciences" por E.W. Martin. La formulación debería adecuarse al modo de

administración.

5 Tal como se describe en esta memoria, las composiciones farmacéuticas se formulan para que sean adecuadas para la vía de administración pretendida a un sujeto. Por ejemplo, la composición farmacéutica puede formularse para que sea adecuada para la administración parenteral, oral, intradérmica, colorrectal, intrapentoneal e intratumoral. En una realización específica, la composición farmacéutica puede formularse para la administración intravenosa, oral, intraperitoneal, intranasal, intratraqueal, subcutánea, intramuscular, tópica, pulmonar o intratumoral.

5.5 USOS CONTRA EL CÁNCER Y OTROS USOS

10 En un aspecto, los NDVs quiméricos descritos en esta memoria pueden utilizarse en el tratamiento del cáncer. Descritos en esta memoria se encuentran métodos para tratar el cáncer, que comprenden administrar a un sujeto en necesidad del mismo un NDV quimérico descrito en esta memoria o una composición farmacéutica del mismo. También descrito en esta memoria se encuentra un método para tratar el cáncer, que comprende administrar a un sujeto en necesidad del mismo una cantidad eficaz de un NDV quimérico descrito en esta memoria o una composición farmacéutica del mismo.

15 Un NDV quimérico descrito en esta memoria o una composición farmacéutica del mismo, una vacuna de oncolisado o una vacuna contra el cáncer de células completas utilizada en un método para tratar el cáncer se puede utilizar como cualquier línea de terapia (p. ej., una primera, segunda, tercera, cuarta o quinta línea de terapia).

20 Tal como se describe en esta memoria, un NDV quimérico tratado mediante ingeniería genética para expresar un antagonista de interferón heterólogo, o una composición farmacéutica del mismo se administra a un sujeto para tratar el cáncer. Específicamente, un NDV quimérico tratado mediante ingeniería genética para expresar un antagonista de interferón heterólogo y una proteína F modificada o una composición farmacéutica del mismo se administra a un sujeto para tratar el cáncer. Alternativamente, un NDV quimérico tratado mediante ingeniería genética para expresar un antagonista de interferón heterólogo, una citoquina y una proteína F modificada o una composición farmacéutica del mismo se administra a un sujeto para tratar el cáncer. Alternativamente, un NDV quimérico tratado mediante ingeniería genética para expresar un antagonista de interferón heterólogo, un antígeno tumoral y una proteína F modificada o una composición farmacéutica del mismo se administra a un sujeto para tratar el cáncer. Alternativamente, un NDV quimérico tratado mediante ingeniería genética para expresar un antagonista de interferón heterólogo, una citoquina, un antígeno tumoral y una proteína F modificada o una composición farmacéutica del mismo se administra a un sujeto para tratar el cáncer. Alternativamente, un NDV quimérico tratado mediante ingeniería genética para expresar una citoquina (p. ej., IL-2) o una composición farmacéutica del mismo se administra a un sujeto para tratar el cáncer. Alternativamente, un NDV quimérico tratado mediante ingeniería genética para expresar un antagonista de interferón heterólogo, un microARN y una proteína F modificada o una composición farmacéutica del mismo se administra a un sujeto para tratar el cáncer.

35 Tal como se describe en esta memoria, un NDV quimérico descrito en esta memoria es el único ingrediente activo administrado para tratar el cáncer. Alternativamente, un NDV quimérico descrito en esta memoria es el único ingrediente activo en una composición farmacéutica administrada para tratar el cáncer.

El NDV quimérico o una composición farmacéutica del mismo se pueden administrar local o sistémicamente a un sujeto. Por ejemplo, el NDV quimérico o la composición farmacéutica se pueden administrar a un sujeto por vía parenteral, intratumoral, intranasal, oral, por inhalación, por vía tópica o intradérmica.

40 Los métodos descritos en esta memoria incluyen el tratamiento del cáncer para el cual no se dispone de tratamiento. Alternativamente, se administra a un sujeto un NDV quimérico descrito en esta memoria o una composición farmacéutica del mismo para tratar el cáncer como una alternativa a otras terapias convencionales.

45 Descrito en esta memoria se encuentra un método para tratar el cáncer, que comprende administrar a un sujeto en necesidad del mismo un NDV quimérico descrito en esta memoria o una composición farmacéutica del mismo y una o más terapias adicionales. Una o más terapias se administran a un sujeto en combinación con un NDV quimérico descrito en esta memoria o una composición farmacéutica del mismo para tratar el cáncer. Las terapias adicionales que se están utilizando actualmente se han utilizado o se sabe que son útiles en el tratamiento del cáncer.

50 Alternativamente, un NDV quimérico descrito en esta memoria o una composición farmacéutica del mismo se administra a un sujeto en combinación con una terapia de apoyo, una terapia de alivio del dolor u otra terapia que no tiene un efecto terapéutico sobre el cáncer. Alternativamente, el NDV quimérico o la composición farmacéutica del mismo y una o más terapias adicionales se administran en la misma composición. Alternativamente, el NDV quimérico o la composición farmacéutica del mismo y una o más terapias adicionales se administran en diferentes composiciones.

55 Tal como se describe en esta memoria, dos, tres o múltiples NDVs (incluyendo uno, dos o más NDVs quiméricos descritos en esta memoria) son administrados a un sujeto para tratar el cáncer. Específicamente, un primer NDV quimérico tratado mediante ingeniería genética para expresar un antagonista de interferón heterólogo se administra a un paciente para tratar el cáncer en combinación con un segundo NDV quimérico. Los primero y segundo NDVs

- quiméricos pueden ser parte de la misma composición farmacéutica o de diferentes composiciones farmacéuticas. Específicamente, el primer NDV quimérico y el segundo NDV quimérico son administrados por la misma vía de administración (p. ej., ambos se administran por vía intratumoral o intravenosa). Específicamente, el primer NDV quimérico y el segundo NDV quimérico son administrados por diferentes vías de administración (p. ej., uno se administra por vía intratumoral y el otro se administra por vía intravenosa). El segundo o más NDVs quiméricos utilizados de acuerdo con los métodos descritos en esta memoria que comprenden la administración a un sujeto de dos, tres o múltiples NDVs para tratar el cáncer pueden ser NDVs quiméricos que se producen de forma natural o NDVs quiméricos tratados mediante ingeniería genética para expresar un antígeno tumoral, una citoquina y/o un antagonista de interferón heterólogo que no es un antígeno tumoral o una citoquina.
- 5
- 10 Descrito en esta memoria se encuentra un método para tratar el cáncer, que comprende administrar a un sujeto en necesidad del mismo un primer NDV quimérico y un segundo NDV quimérico, en el que el primer NDV quimérico es tratado mediante ingeniería genética para expresar un antagonista de interferón heterólogo, y el segundo NDV quimérico es tratado mediante ingeniería genética para expresar una citoquina tal como IL-2. En una realización específica, el primer NDV quimérico, el segundo NDV quimérico o ambos expresan una proteína F modificada que
- 15 aumenta la actividad fusogénica del NDV quimérico. Específicamente, el primer NDV quimérico, el segundo NDV quimérico o ambos expresan una proteína F modificada con una mutación en el sitio de escisión (tal como se describe en esta memoria). Específicamente, el primer NDV quimérico, el segundo NDV quimérico o ambos se tratan mediante ingeniería genética para expresar un antígeno tumoral.
- 20 Descrito en esta memoria se encuentra un método para tratar el cáncer, que comprende administrar a un sujeto en necesidad del mismo una primera composición farmacéutica que comprende un primer NDV quimérico y una segunda composición farmacéutica que comprende un segundo NDV quimérico, en el que el primer NDV quimérico está tratado mediante ingeniería genética para expresar un antagonista de interferón heterólogo, y el segundo NDV quimérico está tratado mediante ingeniería genética para expresar una citoquina tal como IL-2. Específicamente, el primer NDV quimérico, el segundo NDV quimérico, o ambos expresan una proteína F modificada que aumenta la actividad fusogénica del NDV quimérico. Específicamente, el primer NDV quimérico, el segundo NDV quimérico o
- 25 ambos expresan una proteína F modificada con una mutación en el sitio de escisión (tal como se describe en esta memoria). En otra realización, el primer NDV quimérico, el segundo NDV quimérico o ambos están tratados mediante ingeniería genética para expresar un antígeno tumoral.
- 30 Descrito en esta memoria se encuentra un método para tratar el cáncer, que comprende administrar a un sujeto que lo necesite una composición farmacéutica que comprende un primer NDV quimérico y un segundo NDV quimérico, en el que el primer NDV quimérico está tratado mediante ingeniería genética para expresar un antagonista de interferón heterólogo, y el segundo NDV quimérico está tratado mediante ingeniería genética para expresar una citoquina tal como IL-2. Específicamente, el primer NDV quimérico, el segundo NDV quimérico o ambos expresan una proteína F modificada que aumenta la actividad fusogénica del NDV quimérico; el primer NDV quimérico, el
- 35 segundo NDV quimérico o ambos expresan una proteína F modificada con una mutación en el sitio de escisión (tal como se describe en esta memoria); el primer NDV quimérico, el segundo NDV quimérico o ambos están tratados mediante ingeniería genética para expresar un antígeno tumoral.
- 40 Tal como se describe en esta memoria, células cancerígenas enteras infectadas con un NDV quimérico descrito en esta memoria pueden utilizarse para tratar el cáncer. Específicamente, un NDV quimérico descrito en esta memoria puede ponerse en contacto con una célula cancerígena o una población de células cancerígenas y la célula cancerígena o la población de células cancerígenas infectadas se pueden administrar a un sujeto para tratar el cáncer. Específicamente, las células cancerígenas se someten a radiación gamma antes de la infección con un NDV quimérico descrito en esta memoria; las células cancerígenas se someten a radiación gamma después de la infección con un NDV quimérico descrito en esta memoria; las células cancerígenas se tratan antes de la administración a un sujeto, de manera que las células cancerígenas no pueden multiplicarse en el sujeto; las células cancerígenas no pueden multiplicarse en el sujeto y el virus no puede infectar al sujeto; las células cancerígenas se someten a radiación gamma antes de la administración al sujeto; las células cancerígenas se someten a ultrasonidos antes de la administración a un sujeto; las células cancerígenas se tratan con mitomicina C antes de la administración a un sujeto; las células cancerígenas se tratan mediante congelación y descongelación antes de la administración a un sujeto; las células cancerígenas se tratan con tratamiento térmico antes de la administración a un sujeto. Las células cancerígenas se pueden administrar local o sistémicamente a un sujeto. Por ejemplo, las células cancerígenas se pueden administrar por vía parenteral, intratumoral, intranasal, oral, por inhalación, por vía tópica o por vía intradérmica a un sujeto. En una realización específica, las células cancerígenas se administran por vía intratumoral o a la piel (por ejemplo, por vía intradérmica) de un sujeto. Las células cancerígenas utilizadas
- 50 pueden ser autólogas o alogénicas. En una realización específica, la columna vertebral del NDV quimérico es una cepa no lítica. Las células cancerígenas se pueden administrar a un sujeto solas o en combinación con una terapia adicional. Las células cancerígenas están preferiblemente en una composición farmacéutica.
- 55 Alternativamente, un concentrado de proteínas o un preparado de membrana plasmática de células cancerígenas lisadas infectadas con un NDV quimérico se puede utilizar para tratar el cáncer. Alternativamente, un preparado de membrana plasmática que comprende fragmentos de células cancerígenas infectadas con un NDV quimérico descrito en esta memoria se puede utilizar para tratar el cáncer. En otra realización, un concentrado de proteína de células cancerígenas infectadas con un NDV quimérico descrito en esta memoria se puede utilizar para tratar el
- 60

cáncer. Técnicas conocidas para un experto en la técnica se pueden utilizar para producir el concentrado de proteína o el preparado de membrana plasmática. Alternativamente, un NDV quimérico descrito en esta memoria puede ponerse en contacto con una célula cancerígena o una población de células cancerígenas y la célula cancerígena o la población de células cancerígenas infectada se puede lisar utilizando técnicas conocidas para un experto en la técnica para obtener el concentrado de proteína o fragmentos de membrana plasmática de las células cancerígenas infectadas con el NDV, y el concentrado de proteína o los fragmentos de membrana plasmática de las células cancerígenas infectadas con el NDV se pueden administrar a un sujeto para tratar el cáncer. El concentrado de proteína o los fragmentos de membrana plasmática se pueden administrar local o sistémicamente a un sujeto. Por ejemplo, el concentrado de proteína o los fragmentos de membrana plasmática se pueden administrar a un sujeto por vía parenteral, intratumoral, intranasal, oral, por inhalación, por vía tópica o intradérmica. Alternativamente, un concentrado de proteína o preparado de membrana plasmática se administra a un sujeto por vía intratumoral o a la piel (p. ej., por vía intradérmica). Las células cancerígenas utilizadas para producir el concentrado de proteína o el preparado de membrana plasmática pueden ser autólogas o alogénicas. En una realización específica, la columna vertebral del NDV quimérico es una cepa lítica. El concentrado de proteína o el preparado de membrana plasmática puede ser administrado a un sujeto solo o en combinación con una terapia adicional. El concentrado de proteínas o el preparado de membrana plasmática está preferiblemente en una composición farmacéutica.

Tal como se describe en esta memoria, los NDVs quiméricos descritos en esta memoria pueden utilizarse para producir anticuerpos que se pueden utilizar en inmunoensayos de diagnóstico, inmunoterapia pasiva y la generación de anticuerpos anti-idiotípicos. Por ejemplo, un NDV quimérico descrito en esta memoria se puede administrar a un sujeto (p. ej., un ratón, rata, cerdo, caballo, burro, ave o ser humano) para generar anticuerpos que luego pueden ser aislados y utilizados en ensayos de diagnóstico, inmunoterapia pasiva y generación de anticuerpos anti-idiotípicos. Los anticuerpos generados pueden aislarse mediante técnicas estándares conocidas en la técnica (p. ej., mediante cromatografía de afinidad, centrifugación, precipitación, etc.) y se utilizan en inmunoensayos de diagnóstico, inmunoterapia pasiva y generación de anticuerpos anti-idiotípicos.

Tal como se describe en esta memoria, los anticuerpos aislados de sujetos a los que se administró un NDV quimérico descrito en esta memoria, se utilizan para evaluar la expresión de proteínas de NDV, el antagonista de interferón heterólogo o ambos. Cualquier sistema de inmunoensayo conocido en la técnica se puede utilizar para este fin, incluyendo pero no limitado a sistemas de ensayo competitivos y no competitivos utilizando técnicas tales como radioinmunoensayos, ELISA (análisis con enzima unida a inmunosorbente), inmunoensayos "sándwich", reacciones de precipitina, reacciones de precipitina de difusión en gel, ensayos de inmunodifusión, ensayos de aglutinación, ensayos de fijación del complemento, ensayos inmunoradiométricos, inmunoensayos fluorescentes, inmunoensayos con proteína A y ensayos de inmunoelectroforesis, por nombrar sólo unos pocos.

5.5.1. POBLACIÓN DE PACIENTES

Tal como se describe en esta memoria, un NDV quimérico descrito en esta memoria o una composición farmacéutica del mismo, una vacuna de oncolisado, o una vacuna de células enteras se administra a un sujeto que padece cáncer. Por lo tanto, un NDV quimérico descrito en esta memoria o una composición farmacéutica del mismo, una vacuna de oncolisado o una vacuna de células enteras se administra a un sujeto predispuesto o susceptible al cáncer; un NDV quimérico descrito en esta memoria o una composición farmacéutica del mismo, una vacuna de oncolisado o una vacuna de células enteras se administra a un sujeto al que ha diagnosticado cáncer. Ejemplos específicos de cáncer de los tipos de cáncer se describen en esta memoria. Específicamente, el sujeto tiene cáncer metastásico. Específicamente, el sujeto está en remisión. Específicamente, el sujeto tiene una recurrencia de cáncer.

Tal como se describe en esta memoria, un NDV quimérico descrito en esta memoria o una composición farmacéutica del mismo, una vacuna de oncolisado, o una vacuna de células enteras se administra a un ser humano que es de 0 a 6 meses de edad, de 6 a 12 meses de edad, de 6 a 18 meses de edad, de 18 a 36 meses de edad, de 1 a 5 años de edad, de 5 a 10 años de edad, de 10 a 15 años de edad, de 15 a 20 años de edad, de 20 a 25 años de edad, de 25 a 30 años de edad, de 30 a 35 años de edad, de 35 a 40 años de edad, de 40 a 45 años de edad, de 45 a 50 años de edad, de 50 a 55 años de edad, de 55 a 60 años de edad, de 60 a 65 años de edad, de 65 a 70 años de edad, de 70 a 75 años de edad, de 75 a 80 años de edad, de 80 a 85 años de edad, de 85 a 90 años de edad, de 90 a 95 años de edad o de 95 a 100 años de edad. Por lo tanto, un NDV quimérico descrito en esta memoria o una composición farmacéutica del mismo, una vacuna de oncolisado o una vacuna de células enteras se administra a un bebé humano; un NDV quimérico descrito en esta memoria o una composición farmacéutica del mismo, una vacuna de oncolisado o una vacuna de células enteras se administra a un bebé mayor humano; un NDV quimérico descrito en esta memoria o una composición farmacéutica del mismo, una vacuna de oncolisado o una vacuna de células enteras se administra a un niño humano; un NDV quimérico descrito en esta memoria o una composición farmacéutica del mismo, una vacuna de oncolisado o una vacuna de células enteras se administra a un ser humano adulto; un NDV quimérico descrito en esta memoria o una composición farmacéutica del mismo, una vacuna de oncolisado o una vacuna de células enteras se administra a un ser humano de edad avanzada.

Como también se describe en esta memoria, un NDV quimérico descrito en esta memoria o una composición farmacéutica del mismo, una vacuna de oncolisado, o una vacuna de células enteras se administra a un sujeto en un estado inmuno-comprometido o inmuno-suprimido o en riesgo de convertirse en un estado inmuno-comprometido o

- inmuno-suprimido. Específicamente, un NDV quimérico descrito en esta memoria o una composición farmacéutica del mismo, una vacuna de oncolisado o una vacuna de células enteras se administra a un sujeto receptor o que se recupera de una terapia inmunosupresora. Específicamente, un NDV quimérico descrito en esta memoria o una composición farmacéutica del mismo, una vacuna de oncolisado o una vacuna de células enteras se administra a un sujeto que tiene o está en riesgo de contraer cáncer. Específicamente, el sujeto es, será o ha sido sometido a cirugía, quimioterapia y/o radioterapia. Específicamente, el paciente ha sido sometido a cirugía para extirpar el tumor o neoplasia. Específicamente, un NDV quimérico descrito en esta memoria o una composición farmacéutica del mismo, una vacuna de oncolisado o una vacuna de células enteras se administra a un sujeto que tiene, tendrá o ha tenido un trasplante de tejido, trasplante de órgano o transfusión.
- 5
- 10 Tal como se describe en esta memoria, un NDV quimérico descrito en esta memoria o una composición farmacéutica del mismo, una vacuna de oncolisado o una vacuna de células enteras se administra a un paciente que ha demostrado ser refractario a terapias distintas del NDV quimérico o composición farmacéutica, pero ya no se encuentra en estas terapias. Específicamente, un NDV quimérico descrito en esta memoria o una composición farmacéutica del mismo, una vacuna de oncolisado o una vacuna de células enteras se administra a un paciente que ha demostrado ser refractario a la quimioterapia. Específicamente, que un cáncer es refractario a una terapia significa que al menos una parte significativa de las células cancerígenas no son exterminadas o detenida su división celular. La determinación de si las células cancerígenas son refractarias se puede hacer ya sea *in vivo* o *in vitro* mediante cualquier método conocido en la técnica para someter a ensayo el efecto de una terapia en células cancerígenas, utilizando los significados aceptados en la técnica de "refractario" en contexto de este tipo. En una determinada realización, el paciente refractario es un paciente refractario a una terapia estándar. En determinadas realizaciones, un paciente con cáncer es refractario a una terapia cuando el tumor o neoplasia no ha sido significativamente erradicado y/o los síntomas no se han aliviado significativamente. La determinación de si un paciente es refractario se puede hacer ya sea *in vivo* o *in vitro* mediante cualquier método conocido en la técnica para someter a ensayo la eficacia de un tratamiento del cáncer, utilizando significados aceptados en la técnica de "refractario" en este contexto.
- 15
- 20
- 25

El paciente a ser tratado de acuerdo con los métodos descritos en esta memoria es un paciente que ya está siendo tratado con antibióticos, antivirales, antifúngicos, u otra terapia biológica/inmunoterapia o terapia contra el cáncer. Entre estos pacientes se encuentran pacientes refractarios y pacientes que son demasiado jóvenes para las terapias convencionales. En algunas realizaciones, el sujeto al que se administra un NDV quimérico descrito en esta memoria o una composición farmacéutica del mismo, una vacuna de oncolisado o una vacuna de células enteras no ha recibido terapia antes de la administración del NDV quimérico o composición farmacéutica, la vacuna de oncolisado o la vacuna de células enteras.

30

Tal como se describe en esta memoria, un NDV quimérico descrito en esta memoria o una composición farmacéutica del mismo, una vacuna de oncolisado o una vacuna de células enteras se administra a un paciente para prevenir la aparición de cáncer en un paciente en riesgo de desarrollar cáncer. Por lo tanto, se administran compuestos a un paciente que es susceptible a reacciones adversas a las terapias convencionales.

35

Alternativamente, el sujeto al que se administra un NDV quimérico descrito en esta memoria o una composición farmacéutica del mismo, una vacuna de oncolisado o una vacuna de células enteras no ha recibido una terapia anterior. Alternativamente, el NDV quimérico descrito en esta memoria o una composición farmacéutica del mismo, una vacuna de oncolisado o una vacuna de células enteras se administra a un sujeto que ha recibido terapia antes de la administración del NDV quimérico o composición farmacéutica, la vacuna de oncolisado o la vacuna de células enteras. Alternativamente, el sujeto al que se administra un NDV quimérico descrito en esta memoria o una composición farmacéutica del mismo, una vacuna de oncolisado o una vacuna de células enteras experimenta efectos secundarios adversos a una terapia previa o se interrumpió una terapia previa debido a niveles inaceptables de toxicidad para el sujeto.

40

45

5.5.2. DOSIFICACIÓN Y FRECUENCIA

La cantidad de un NDV quimérico o una composición farmacéutica del mismo, una vacuna de oncolisado o una vacuna de células enteras que será eficaz en el tratamiento del cáncer dependerá de la naturaleza del cáncer, de la vía de administración, de la salud general del sujeto, etc. y debe decidirse de acuerdo con el juicio de un practicante médico. Técnicas clínicas estándares tales como ensayos *in vitro* pueden emplearse opcionalmente para ayudar a identificar intervalos de dosificación óptimos. Sin embargo, los intervalos de dosificación adecuados de NDVs quiméricos para la administración son, por lo general, de aproximadamente 10^2 , 5×10^2 , 10^3 , 5×10^3 , 10^4 , 5×10^4 , 10^5 , 5×10^5 , 10^6 , 5×10^6 , 10^7 , 5×10^7 , 10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , 5×10^9 , 1×10^{10} , 5×10^{10} , 1×10^{11} , 5×10^{11} ó 10^{12} upf, y lo más preferiblemente aproximadamente 10^4 a aproximadamente 10^{12} , y se puede administrar a un sujeto una vez, dos veces, tres o más veces con intervalos tan a menudo como sea necesario. Intervalos de dosificación de vacunas de oncolisado para la administración pueden incluir 0,001 mg, 0,005 mg, 0,01 mg, 0,05 mg, 0,1 mg, 0,5 mg, 1,0 mg, 2,0 mg, 3,0 mg, 4,0 mg, 5,0 mg, 10,0 mg, 0,001 mg a 10,0 mg, 0,01 mg a 1,0 mg, 0,1 mg a 1 mg y 0,1 mg a 5,0 mg, y puede ser administrada a un sujeto una vez, dos veces, tres o más veces con intervalos tan a menudo como sea necesario. Intervalos de dosificación de las vacunas de células enteras para la administración puede incluir 10^2 , 5×10^2 , 10^3 , 5×10^3 , 10^4 , 5×10^4 , 10^5 , 5×10^5 , 10^6 , 5×10^6 , 10^7 , 5×10^7 , 10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , 5×10^9 , 1×10^{10} , 5×10^{10} , 1×10^{11} , 5×10^{11} ó 10^{12} células, y se puede administrar a un sujeto una vez, dos veces, tres o más veces con

50

55

60

intervalos tan a menudo como sea necesario. En determinadas realizaciones, se administran a un sujeto dosis similares a las que actualmente se utilizan en ensayos clínicos para NDV, vacunas de oncolisado o vacunas de células enteras. Dosis eficaces se pueden extrapolar a partir de curvas de dosis-respuesta derivadas de sistemas de ensayo *in vitro* de modelos animales.

- 5 Tal como se describe en esta memoria, un NDV quimérico o una composición farmacéutica del mismo se administra a un sujeto como una sola dosis seguida de una segunda dosis 3 a 6 semanas más tarde. De acuerdo con ello, se pueden administrar al sujeto inoculaciones de refuerzo a intervalos de 6 a 12 meses después de la segunda inoculación. Alternativamente, una vacuna de oncolisado o una vacuna de células enteras se administran a un sujeto como una sola dosis seguida de una segunda dosis 3 a 6 semanas más tarde. Específicamente, el sujeto es un mamífero. Específicamente, el sujeto es un ser humano.

10 Específicamente, se puede repetir la administración del mismo NDV quimérico o una composición farmacéutica del mismo, la vacuna de oncolisado o vacuna de células enteras y las administraciones pueden estar separados por al menos 1 día, 2 días, 3 días, 5 días, 10 días, 15 días, 21 días, 28 días, 30 días, 45 días, 2 meses, 75 días, 3 meses, o al menos 6 meses. Alternativamente, se puede repetir la administración del mismo NDV quimérico o una composición farmacéutica del mismo, la vacuna de oncolisado o vacuna de células enteras y las administraciones pueden estar separados por 1 a 30 días, 15 a 30 días, 15 a 45 días, 15 a 75 días, 15 a 90 días, 1 a 3 meses, 3 a 6 meses, 3 a 12 meses o 6 a 12 meses. Alternativamente, un primer NDV quimérico o una composición farmacéutica del mismo se administra a un sujeto seguido por la administración de un segundo NDV quimérico o una composición farmacéutica del mismo. Alternativamente, el primer y el segundo NDV quimérico o composiciones farmacéuticas de los mismos pueden estar separados por al menos 1 día, 2 días, 3 días, 5 días, 10 días, 15 días, 21 días, 28 días, 30 días, 45 días, 2 meses, 75 días, 3 meses o al menos 6 meses. En otras realizaciones, el primer y segundo NDVs quimérico o composiciones farmacéuticas de los mismos pueden estar separados por 1 a 30 días, 15 a 30 días, 15 a 45 días, 15 a 75 días, 15 a 90 días, 1 a 3 meses, 3 a 6 meses, 3 a 12 meses o 6 a 12 meses.

5.5.3. TIPOS DE CÁNCER

25 Ejemplos específicos de cánceres que pueden ser tratados de acuerdo con los métodos descritos en esta memoria incluyen leucemias tales como leucemia aguda, leucemia linfocítica aguda, leucemias mielocíticas agudas tales como leucemias mieloblástica, promielocítica, monocítica, y eritroleucemia, y síndrome mielodisplásico, leucemias crónicas tales como leucemia mielocítica crónica (granulocítica), leucemia linfocítica crónica, leucemia de células pilosas, policitemia vera, linfomas tales como la enfermedad de Hodgkin, enfermedad de no Hodgkin, mielomas múltiples tales como mieloma latente múltiple, mieloma no secretor, mieloma osteosclerótico, leucemia de células placancer, placancercitoma solitario y placancercitoma extramedular; macroglobulinemia de Waldenström; gammopatía monoclonal de significado incierto; gammopatía monoclonal benigna; enfermedad de cadena pesada; sarcomas óseos y de tejido conjuntivo tales como sarcoma óseo, osteosarcoma, condrosarcoma, sarcoma de Ewing, tumor de células gigantes maligno, fibrosarcoma de hueso, cordoma, sarcoma periosteal, sarcomas de tejido blando, angiosarcoma (hemoangiosarcoma), fibrosarcoma, sarcoma de Kaposi, leiomiomas, liposarcoma, linfangiosarcoma, neurilemmoma, rabdomiosarcoma, sarcoma sinovial, tumores del cerebro tales como glioma, astrocitoma, glioma del tronco encefálico, ependimoma, oligodendroglioma, tumor no glial, glioblastoma multiforme, neurinoma acústico, craneofaringioma, meduloblastoma, meningioma, pineocitoma, pineoblastoma, linfoma cerebral primario, cáncer de mama incluyendo carcinoma ductal, adenocarcinoma, carcinoma lobular (de células cancerígenas), carcinoma intraductal, cáncer de mama medular, cáncer de mama mucinoso, cáncer de mama tubular, cáncer de mama papilar, enfermedad de Paget y cáncer de mama inflamatorio, cáncer adrenal tal como feocromocitoma y carcinoma adrenocortical, cáncer de tiroides tal como cáncer de tiroides papilar o folicular, cáncer de tiroides medular y cáncer de tiroides anaplásico; cáncer pancreático tal como insulinoma, gastrinoma, glucagonoma, vipoma, tumor secretor de somatostatina y carcinoide o tumor de células de los islotes; cánceres de la pituitaria tales como la enfermedad de Cushing, tumor secretor de prolactina, acromegalia y diabetes insípida, cánceres de ojos tales como, pero no limitados a melanoma ocular tales como melanoma del iris, melanoma coroideo y melanoma del cuerpo ciliar, y retinoblastoma; cánceres vaginales tales como carcinoma de células escamosas, adenocarcinoma y melanoma; cáncer de vulva tal como carcinoma de células escamosas, melanoma, adenocarcinoma, carcinoma de células basales, sarcoma y enfermedad de Paget; cánceres cervicales tales como carcinoma de células escamosas y adenocarcinoma; cánceres uterinos tales como carcinoma endometrial y sarcoma uterino, cánceres ováricos tales como carcinoma epitelial de ovario, tumor borderline, tumor de células germinales y tumor del estroma; cánceres de esófago tales como cáncer escamoso, adenocarcinoma, carcinoma adenoide quístico, carcinoma mucoceludermóide, carcinoma adenoescamoso, sarcoma, melanoma, placancercitoma, carcinoma verrugoso, y carcinoma de células de avena (células cancerígenas), cánceres de estómago tales como adenocarcinoma, fúngico (polipoide), ulcerante, de difusión superficial, de difusión difusa, linfoma maligno, liposarcoma, fibrosarcoma y carcinosarcoma; cánceres de colon; cáncer de recto, cánceres de hígado tales como carcinoma hepatocelular y hepatoblastoma, cánceres de la vesícula biliar tales como adenocarcinoma; colangiocarcinomas tales como papilar, nodular y difuso; cánceres de pulmón tales como cáncer de pulmón de células no cancerígenas, carcinoma de células escamosas (carcinoma epidermoide), adenocarcinoma, carcinoma de células grandes y cáncer de pulmón de células cancerígenas, cánceres testiculares tales como tumor germinal, seminoma, anaplásico, clásico (típico), espermatoocítico, no seminoma, carcinoma embrionario, carcinoma teratoma, coriocarcinoma (tumor del saco vitelino), cánceres de la próstata tales como

neoplasia intraepitelial prostática, adenocarcinoma, leiomioma y rhabdomioma, cánceres penales, cánceres orales tales como, pero no limitados a carcinoma de células escamosas, cánceres basales, cánceres de las glándulas salivales tales como adenocarcinoma, carcinoma mucoepidermoide y carcinoma adenoide quístico; cánceres de faringe tales como cáncer de células escamosas y verrugoso; cánceres de piel tales como carcinoma de células basales, carcinoma de células escamosas y melanoma, melanoma de difusión superficial, melanoma nodular, melanoma de lentigo maligno, melanoma lentiginoso acral; cánceres de riñón tales como carcinoma de células renales, adenocarcinoma, hipernefoma, fibrosarcoma, cáncer de células transicionales (pelvis y/o ureter renales); tumor de Wilms; cánceres de vejiga tales como carcinoma de células de transición, cáncer de células escamosas, adenocarcinoma, carcinosarcoma. Además, los cánceres incluyen mixosarcoma, sarcoma osteogénico, endoteliosarcoma, linfangioendoteliosarcoma, mesotelioma, sinovioma, hemangioblastoma, carcinoma epitelial, cistadenocarcinoma, carcinoma broncogénico, carcinoma de glándulas sudoríparas, carcinoma de glándulas sebáceas, carcinoma papilar y adenocarcinomas papilares (para una revisión de este tipo de trastornos, véase Fishman et al., 1985, *Medicine*, 2ª ed., J.B. Lippincott Co, Filadelfia, y Murphy et al., 1997, *Informed Decisions: The Complete Book of Cancer Diagnosis, Treatment and Recovery*, Viking Penguin, Penguin Books U.S.A. Inc., Estados Unidos de América).

Tal como se describe en esta memoria, los NDVs quiméricos descritos en esta memoria o composiciones farmacéuticas de los mismos, una vacuna de oncolisado o una vacuna de células enteras son útiles en el tratamiento de una diversidad de cánceres y enfermedades proliferativas anormales, incluyendo los siguientes: carcinoma, incluyendo el de vejiga, mama, colon, riñón, hígado, pulmón, ovario, páncreas, estómago, cuello del útero, tiroides y piel; incluyendo carcinoma de células escamosas, tumores hematopoyéticos de linaje linfocítico, incluyendo leucemia, leucemia linfocítica aguda, leucemia linfoblástica aguda, linfoma de células B, linfoma de células T, linfoma de Burkitt, tumores hematopoyéticos de linaje mielocítico, incluyendo leucemias mielógenas agudas y crónicas y leucemia promielocítica; tumores de origen mesenquimal, incluyendo fibrosarcoma y rhabdomioma; otros tumores, incluyendo melanoma, seminoma, teratocarcinoma, neuroblastoma y glioma; tumores del sistema nervioso central y periférico, incluyendo astrocitoma, neuroblastoma, glioma y schwannomas; tumores de origen mesenquimal, incluyendo fibrosarcoma, rhabdomioma y osteosarcoma; y otros tumores, incluyendo melanoma, xeroderma pigmentoso, queratoactinoma, seminoma, cáncer folicular de tiroides y teratocarcinoma.

También como se describe en esta memoria, cánceres asociados con aberraciones en la apoptosis son tratados de acuerdo con los métodos descritos en esta memoria. Estos cánceres pueden incluir linfomas foliculares, carcinomas con mutaciones de p53, tumores dependientes de hormonas de mama, próstata y ovario, y lesiones precancerosas tales como poliposis adenomatosa familiar y síndromes mielodisplásicos. En realizaciones específicas, tumor maligno o cambios disproliferativos (tales como metaplasias y displasias), o trastornos hiperproliferativos de la piel, pulmón, hígado, huesos, cerebro, estómago, colon, mama, próstata, vejiga, riñón, páncreas, ovario y/o útero son tratados de acuerdo con los métodos descritos en esta memoria. En otras realizaciones específicas, un sarcoma o melanoma es tratado de acuerdo con los métodos descritos en esta memoria.

Alternativamente, el cáncer es tratado de acuerdo con los métodos descritos en esta memoria es leucemia, linfoma o mieloma (p. ej., mieloma múltiple). Ejemplos específicos de leucemias y otros cánceres de transmisión sanguínea que pueden ser tratados de acuerdo con los métodos descritos en esta memoria incluyen, pero no se limitan a, leucemia linfoblástica aguda "ALL", leucemia linfoblástica de células B aguda, leucemia linfoblástica aguda de células T, leucemia mieloblástica aguda "AML", leucemia promielocítica aguda "APL", leucemia monoblástica aguda, leucemia eritroleucémica aguda, leucemia megacarioblástica aguda, leucemia mielomonocítica aguda, leucemia no linfocítica aguda, leucemia indiferenciada aguda, leucemia mielocítica crónica "CML", leucemia linfocítica crónica "CLL" y leucemia de células pilosas.

Ejemplos específicos de linfomas que pueden ser tratados de acuerdo con los métodos descritos en esta memoria incluyen la enfermedad de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, mieloma múltiple, macroglobulinemia de Waldenström, enfermedad de cadena pesada y policitemia vera.

Alternativamente, el cáncer que está siendo tratado de acuerdo con los métodos descritos en esta memoria es un tumor sólido. Ejemplos de tumores sólidos que se pueden tratar de acuerdo con los métodos descritos en esta memoria incluyen fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteogénico, cordoma, angiosarcoma, endoteliosarcoma, linfangiosarcoma, linfangioendoteliosarcoma, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomioma, rhabdomioma, cáncer de colon, cáncer colorrectal, cáncer de riñón, cáncer de páncreas, cáncer de huesos, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer de esófago, cáncer de estómago, cáncer oral, cáncer nasal, cáncer de garganta, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales, adenocarcinoma, carcinoma de la glándula sudorípara, carcinoma de glándulas sebáceas, carcinoma papilar, adenocarcinomas papilares, cistadenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales, hepatoma, carcinoma del conducto biliar, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrionario, tumor de Wilms, cáncer cervical, cáncer de útero, cáncer testicular, carcinoma de pulmón de células cancerígenas, carcinoma de vejiga, cáncer de pulmón, carcinoma epitelial, glioma, glioblastoma multiforme, astrocitoma, meduloblastoma, craneofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, meningioma, cáncer de piel, melanoma, neuroblastoma y retinoblastoma. En otra realización, el cáncer que está siendo tratado de acuerdo con los métodos descritos en esta memoria es uno metastásico. En otra realización, el cáncer que está siendo tratado de acuerdo con los métodos descritos en esta memoria es un tumor

maligno.

Específicamente, el cáncer que está siendo tratado de acuerdo con los métodos descritos en esta memoria es un cáncer que tiene un mal pronóstico y/o que tiene una mala respuesta a terapias convencionales tales como quimioterapia y radiación. Alternativamente, el cáncer que está siendo tratado de acuerdo con los métodos descritos en esta memoria es el melanoma maligno, glioma maligno, carcinoma de células renales, adenocarcinoma de páncreas, mesotelioma pleural maligno, adenocarcinoma de pulmón, carcinoma de pulmón de células pequeñas, carcinoma de células escamosas de pulmón, cáncer de tiroides anaplásico y carcinoma de cabeza y cuello de células escamosas.

5.5.4. TERAPIAS ADICIONALES

Terapias adicionales que se pueden utilizar en una combinación con un NDV quimérico descrito en esta memoria o una composición farmacéutica del mismo, una vacuna de oncolisado o una vacuna de células enteras para el tratamiento de cáncer incluyen moléculas pequeñas, fármacos sintéticos, péptidos (incluyendo péptidos cíclicos), polipéptidos, proteínas, ácidos nucleicos (p. ej., nucleótidos de ADN y ARN, incluyendo secuencias de nucleótidos antisentido, hélices triples, ARNi secuencias de nucleótidos que codifican proteínas, polipéptidos o péptidos biológicamente activos), anticuerpos, moléculas inorgánicas naturales o sintéticas, agentes miméticos y moléculas orgánicas sintéticas o naturales. En una realización específica, la terapia adicional es un agente quimioterapéutico.

Tal como se describe en esta memoria, un NDV quimérico descrito en esta memoria o una composición farmacéutica del mismo, una vacuna de oncolisado o una vacuna de células enteras se utiliza en combinación con terapia de radiación que comprende el uso de rayos X, rayos gamma y otras fuentes de radiación para destruir células cancerosas. Específicamente, la terapia de radiación se administra en forma de radiación de haz externo o teleterapia, en donde la radiación se dirige desde una fuente remota. Específicamente, la terapia de radiación se administra como terapia interna o braquiterapia, en donde una fuente radiactiva se coloca dentro del cuerpo cerca de las células cancerígenas y/o una masa tumoral.

Terapias contra el cáncer disponibles en la actualidad y sus dosificaciones, vías de administración y uso recomendado son conocidos en la técnica y se han descrito en dicha bibliografía como Physician's Desk Reference (63ª ed., 2009).

Ejemplos específicos de agentes anti-cáncer que se pueden utilizar en combinación con un NDV quimérico descrito en esta memoria o una composición farmacéutica de los mismos incluyen agentes hormonales (p. ej., inhibidor de aromatasas, modulador de estrógeno selectivo del receptor (SERM) y antagonista del receptor de estrógenos), agentes quimioterapéuticos (p. ej., bloqueador del desensamblaje de microtúbulos, antimetabolito, inhibidor de la topoisomerasa y agente de entrecruzamiento de ADN o agente dañino), agentes anti-angiogénicos (p. ej., antagonista de VEGF, antagonista de los receptores, antagonista de integrina, agente de dianas vasculares (VTA)/agente interruptor vascular (VDA)), radioterapia y cirugía convencional.

Ejemplos de agentes hormonales que pueden utilizarse en combinación con un NDV quimérico descrito en esta memoria o una composición farmacéutica del mismo incluyen inhibidores de aromatasas, SERMs y antagonistas de receptores de estrógeno. Agentes hormonales que son inhibidores de aromatasas pueden ser esteroides o no esteroides. Ejemplos de agentes hormonales esteroides incluyen letrozol, anastrozol, aminoglutetimida, fadrozol y vorozol. Ejemplos de agentes hormonales esteroides incluyen aromasina (exemestano), formestano y testolactona. Ejemplos de agentes hormonales que son SERMs incluyen tamoxifeno (marca/comercializado como Nolvadex®), afimoxifeno, arzoxifeno, bazedoxifeno, clomifeno, femarelle, lasofoxifeno, ormeloxifeno, raloxifeno y toremifeno. Ejemplos de agentes hormonales que son antagonistas del receptor de estrógenos incluyen fulvestrant. Otros agentes hormonales incluyen abiraterona y lonaprisan.

Ejemplos de agentes quimioterapéuticos que pueden utilizarse en combinación con un NDV quimérico descritos en esta memoria o una composición farmacéutica de los mismos incluyen bloqueador del desensamblaje de microtúbulos, antimetabolito, inhibidor de la topoisomerasa y reticuladores o agentes que dañan el ADN. Agentes quimioterapéuticos que son bloqueadores del desensamblaje de microtúbulos incluyen taxenos (p. ej., paclitaxel (marca/comercializado como TAXOL®), docetaxel, abraxane, larotaxel, ortataxel y tesetaxel); eptilonas (p. ej., ixabepilona) y alcaloides vinca (p. ej., vinorelbina, vinblastina, vindesina y vincristina (marca /comercializado como ONCOVIN®)).

Agentes quimioterapéuticos que son antimetabolitos incluyen antimetabolitos de folato (p. ej., metotrexato, aminopterina, pemetrexed, raltitrexed); antimetabolitos de purina (p. ej., cladribina, clofarabina, fludarabina, mercaptopurina, pentostatina, tioguanina), antimetabolitos de pirimidina (p. ej., S-fluorouracilo, capecitabina, gemcitabina (GEMZAR®), citarabina, decitabina, floxuridina, tegafur), y antimetabolitos de desoxirribonucleótidos (p. ej., hidroxiurea).

Agentes quimioterapéuticos que son inhibidores de topoisomerasa incluyen inhibidores de la topoisomerasa de clase I (camptoteca) (p. ej., topotecan (marca/comercializado como Hycamtin®), irinotecan, rubitecan y belotecan), inhibidores de la topoisomerasa de clase II (podophyllum) (p. ej., etopósido o VP-16, y tenipósido), antraciclina (p. ej., doxorubicina, epirubicina, Doxil, aclarubicina, amrubicina, daunorubicina, idarubicina, pirarubicina, valrubicina, y

zorubicina) y antracenedionas (p. ej., mitoxantrona y pixantrona).

Agentes quimioterapéuticos que son agentes de reticulación de ADN (o agentes que dañan el ADN) incluyen agentes alquilantes (p. ej., ciclofosfamida, mecloretamina, ifosfamida (marca/comercializado como IFEX®), trofosfamida, clorambucilo, melfalán, prednimustina, bendamustina, uramustina, estramustina, carmustina (marca/comercializado como BiCNU®), lomustina, semustina, fotemustina, nimustina, ranimustina, estreptozocina, busulfán, mannosulfan, treosulfano, carboquona, N,N'-trietilfosforamida, triaziquona, trietilenmelamina), agentes tipo alquilantes (p. ej., carboplatino (marca/comercializado como PARAPLATIN®), cisplatino, oxaliplatino, nedaplatino, tetranitrato de triplatino, satraplatino, picoplatino), agentes de entrecruzamiento de ADN no clásicos (p. ej., procarbazona, dacarbazina, temozolomida (marca/comercializado como TEMODAR®), altretamina, mitobromtol); y agentes intercalantes (p. ej., actinomicina, bleomicina, mitomicina y plicamicina).

5.6 ENSAYOS BIOLÓGICOS

Ensayos Virales In Vitro

Ensayos virales incluyen aquellos que miden la replicación viral alterada (según se determina, p. ej., mediante formación de placas) o la producción de proteínas virales (según se determina, p. ej., mediante análisis de transferencia Western) o ARNs virales (según se determina, p. ej., por RT-PCR o análisis de transferencia Northern) en células cultivadas *in vitro* utilizando métodos que son bien conocidos en la técnica

El crecimiento de los NDVs quiméricos descritos en esta memoria pueden evaluarse mediante cualquier método conocido en la técnica o descritos en esta memoria (p. ej., en el cultivo celular (p. ej., cultivos de células de riñón embrionario de pollo o cultivos de fibroblastos embrionarios de pollo (CEF)). El título viral se puede determinar inoculando diluciones en serie de un NDV quimérico descrito en esta memoria en cultivos celulares (p. ej., CEF, MDCK, células EFK-2, células Vera, células endoteliales de la vena umbilical humanas primarias (HUVEC), línea celular epitelial humana H292 o células HeLa), embriones de pollo o animales vivos (p. ej., aves). Después de la incubación del virus durante un tiempo especificado, el virus se aisló utilizando métodos estándares. La cuantificación física del título de virus se puede realizar utilizando la PCR aplicada a los sobrenadantes virales (Quinn y Trevor, 1997, Morgan et al, 1990), ensayos de hemoaglutinación, dosis infecciosas de cultivo de tejidos (TCID50) o dosis infecciosas de huevo (EID50). Un método a modo de ejemplo de la evaluación del título viral se describe en la Sección 6, que figura más adelante.

La incorporación del antagonista de interferón viral, una citoquina, antígeno tumoral o proteína F mutada en el virión de los NDVs quiméricos descritos en esta memoria puede ser evaluada por cualquier método conocido en la técnica o descritos en esta memoria (p. ej., en un cultivo celular, un modelo animal o cultivo viral en huevos embrionados). Por ejemplo, partículas virales de un cultivo de células del fluido alantoideo de huevos embrionados pueden ser purificadas por centrifugación a través de un colchón de sacarosa y subsiguientemente pueden ser analizadas para la expresión de la proteína de fusión por transferencia Western utilizando métodos bien conocidos en la técnica.

Enfoques basados en inmunofluorescencia también se pueden utilizar para detectar virus y evaluar el crecimiento viral. Enfoques de este tipo son bien conocidos por los expertos en la técnica, p. ej., microscopía de fluorescencia y citometría de flujo (véase la Sección 6, que figura más adelante).

Ensayos de Anticuerpo

Anticuerpos generados por los NDVs quiméricos descritos en esta memoria pueden caracterizarse de una diversidad de maneras bien conocidas por un experto en la técnica (p. ej., ELISA, visualización de resonancia de plasmón de superficie (BIAcore), transferencia Western, ensayos de inmunofluorescencia, inmunotinción y/o microneutralización). En particular, los anticuerpos generados por los NDVs quiméricos descritos en esta memoria pueden someterse a ensayo en cuanto a la capacidad de unirse específicamente a un antígeno del virus o un antígeno tumoral. Un ensayo de este tipo se puede realizar en disolución (p. ej., Houghten, 1992, Bio/Techniques 13:412-421), en perlas (Lam, 1991, Nature 354:82-84), en chips (Fodor, 1993, Nature 364:555-556), en bacterias (patente de EE.UU. N° 5.223.409), en esporas (Patentes de EE.UU. N°s 5.571.698, 5.403.484 y 5.223.409), en plásmidos (Cull et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:1865-1869) o en fagos (Scott y Smith, 1990, Science 249:386-390, Cwirla et al, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:6378-6382, y Felici, 1991, J. Mol. Biol. 222:301-310).

Los anticuerpos generados por los NDVs quiméricos descritos en esta memoria que han sido identificados para unirse específicamente a un antígeno del virus, un antígeno tumoral o una citoquina se pueden someter a ensayo por su especificidad a dicho antígeno del virus, el antígeno tumoral o citoquinas. Los anticuerpos pueden someterse a ensayo para la unión específica a un antígeno del virus o un antígeno tumoral y en cuanto a su reactividad cruzada con otros antígenos por cualquier método conocido en la técnica. Inmunoensayos que pueden utilizarse para analizar de unión específica y la reactividad cruzada incluyen sistemas de ensayo competitivos y no competitivos utilizando técnicas tales como transferencias Western, radioinmunoensayos, ELISA (análisis con enzima unida a inmunosorbente), inmunoensayos "sándwich", ensayos de inmunoprecipitación, reacciones de precipitina, reacciones de precipitina de difusión en gel, ensayos de inmunodifusión, ensayos de aglutinación, ensayos de fijación del complemento, ensayos de inmunoradiométricos, inmunoensayos fluorescentes, inmunoensayos con proteína A, por nombrar sólo unos pocos. Dichos ensayos son rutinarios y bien conocidos en la técnica (véase, p. ej.,

Ausubel et al., comps., 1994, Current Protocols in Molecular Biology, Vol 1, John Wiley & Sons, Inc, Nueva York).

La afinidad de unión de un anticuerpo a un antígeno y la tasa de disociación de una interacción anticuerpo-antígeno puede determinarse mediante ensayos de unión competitiva. Alternativamente, se puede utilizar un ensayo de resonancia de plasmón de superficie (p. ej., análisis cinético BIAcore) o ensayo KinExA (Blake, et al, Analytical Biochem., 1999, 272:123-134) para determinar la unión y las tasas de disociación de anticuerpos a un antígeno de los NDVs quiméricos descritos en esta memoria.

Ensayos de IFN

La inducción de IFN y la liberación por un NDV quimérico descrito en esta memoria puede determinarse utilizando técnicas conocidas por un experto en la técnica o descritos en esta memoria. Por ejemplo, la cantidad de IFN inducida en las células después de la infección con un NDV quimérico descrito en esta memoria se puede determinar utilizando un inmunoensayo (p. ej., ELISA o ensayo de transferencia Western) para medir la expresión de IFN o para medir la expresión de una proteína cuya expresión es inducida por IFN. Alternativamente, la cantidad de IFN inducido puede medirse en el nivel de ARN por medio de ensayos tales como transferencias Northern y RT-PCR cuantitativa, conocidos por un experto en la técnica. En realizaciones específicas, la cantidad de IFN liberado se puede medir utilizando un ensayo ELISPOT (Véase, p. ej., los métodos descritos en la Sección 6, que figura más adelante).

Estudios de Toxicidad

Tal como se describe en esta memoria, los NDVs quiméricos descritos en esta memoria o composiciones farmacéuticas de los mismos, vacunas de oncolisado o vacunas de células enteras son sometidos a ensayo en cuanto a la citotoxicidad en líneas celulares de mamíferos, preferiblemente humanos (véase, p. ej., el ensayo de citotoxicidad descrito en la Sección 6, que figura más adelante). Específicamente, la citotoxicidad se evalúa en uno o más de los siguientes ejemplos no limitantes de líneas celulares: U937, una línea celular de monocitos humanos: células mononucleares de sangre periférica primaria (PBMC), Huh7, una línea celular de hepatoblastoma humano, células HL60, células HT1080, HEK 293T y 293H, MLPC, líneas celulares de riñón embrionario humano, líneas celulares de melanoma humano tales como SKMel2, SKMel-119 y SKMel-197, THP-1, células monocíticas, una línea celular HeLa, y líneas celulares de neuroblastoma tales como MC-IXC, SK-N-MC, SK-N-MC, SK-N-DZ, SH-SY5Y y BE(2)-C. Específicamente, la citotoxicidad se evalúa en diversas células cancerígenas. En algunas realizaciones, el ensayo ToxLite se utiliza para evaluar la citotoxicidad.

Pueden utilizarse muchos ensayos bien conocidos en la técnica para evaluar la viabilidad de células o líneas celulares después de la infección con un NDV quimérico descrito en esta memoria o composiciones farmacéuticas de los mismos, vacunas de oncolisado o vacunas de células enteras y, por lo tanto, determinar la citotoxicidad del NDV quimérico o composiciones farmacéuticas de los mismos, la vacuna de oncolisado o vacuna de células enteras. Por ejemplo, la proliferación celular puede someterse a ensayo midiendo la incorporación de bromodesoxiuridina (BrdU), la incorporación de (³H) timidina, mediante recuento celular directo o mediante la detección de cambios en la transcripción, traducción o actividad de genes conocidos tales como proto-oncogenes (p. ej., fos, myc) o marcadores del ciclo celular (Rb, cdc2, ciclina A, D1, D2, D3, E, etc.). Los niveles de dicha proteína y ARNm y la actividad se puede determinar por cualquier método bien conocido en la técnica. Por ejemplo, la proteína puede cuantificarse por métodos de inmunodiagnóstico conocidos tales como ELISA, transferencia Western o inmunoprecipitación utilizando anticuerpos, incluyendo anticuerpos disponibles comercialmente. El ARNm puede cuantificarse utilizando métodos que son bien conocidos y rutinarios en la técnica, por ejemplo, utilizando análisis Northern, protección de RNasa o reacción en cadena de la polimerasa en relación con la transcripción inversa. La viabilidad de la célula se puede evaluar utilizando tinción con azul de tripano u otros marcadores de muerte celular o viabilidad conocidos en la técnica. Específicamente, el nivel de ATP celular se mide para la viabilidad celular determinada. Preferiblemente, un NDV quimérico descrito en esta memoria o una composición farmacéutica del mismo extermina las células cancerígenas, pero no extermina células sanas (es decir, no cancerígenas). Específicamente, un NDV quimérico descrito en esta memoria o una composición farmacéutica del mismo preferiblemente extermina las células cancerígenas pero no extermina células sanas (es decir, no cancerígenas).

Tal como se describe en esta memoria, la viabilidad celular se mide en períodos de tres días y siete días utilizando un ensayo estándar en la técnica, tales como el kit de ensayo CellTiter-Glo (Promega) que mide los niveles de ATP intracelular. Una reducción en el ATP celular es indicativa de un efecto citotóxico. Alternativamente, la viabilidad celular se puede medir en el ensayo de absorción de rojo neutro. Alternativamente, la observación visual para cambios morfológicos pueden incluir la ampliación, granularidad, células con bordes irregulares, un aspecto transparente, el redondeo, el desprendimiento de la superficie del pocillo, u otros cambios.

Los NDVs quiméricos descritos en esta memoria o composiciones farmacéuticas de los mismos, vacunas de oncolisado o vacunas de células enteras pueden ser sometidos a ensayo en cuanto a la toxicidad *in vivo* en modelos animales (véanse, p. ej., los modelos animales descritos en la Sección 6, que figura más adelante). Por ejemplo, los modelos animales descritos en esta memoria y/u otros conocidos en la técnica, que se utilizan para someter a ensayo los efectos de los compuestos sobre el cáncer también se pueden utilizar para determinar la toxicidad *in vivo* de los NDVs quiméricos descritos en esta memoria o composiciones farmacéuticas de los mismos, vacuna de

oncolisado o vacuna de células enteras. Por ejemplo, a los animales se administró una gama de upf de un NDV quimérico descrito en esta memoria. Subsiguientemente, los animales se controlan a lo largo del tiempo en cuanto a la letalidad, pérdida de peso o fracaso por ganar peso, y/o niveles de los marcadores séricos que pueden ser indicativos de daño a los tejidos (p. ej., nivel de creatina fosfoquinasa como un indicador de daño a los tejidos en general, el nivel de transaminasa glutámica de ácido oxálico o transaminasa de ácido pirúvico como indicadores de posibles daños hepáticos). Estos ensayos *in vivo* también pueden ser adaptados para ensayar la toxicidad de diversos modos y/o régimen de administración, además de las dosificaciones.

La toxicidad y/o eficacia de un NDV quimérico descrito en esta memoria o una composición farmacéutica del mismo, de la vacuna de oncolisado o de la vacuna de células enteras se puede determinar mediante procesos farmacéuticos estándares en cultivos celulares o animales experimentales, p. ej., para determinar la LD50 (la dosis letal para el 50% de la población) y la ED50 (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50% de la población). La relación de dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y puede expresarse como la relación LD50/ED50. Se prefieren terapias que exhiben grandes índices terapéuticos. Aun cuando se pueden utilizar terapias que exhiben efectos secundarios tóxicos, se debe tener cuidado para diseñar un sistema de administración que fije como objetivo este tipo de terapias al sitio del tejido afectado con el fin de minimizar el daño potencial a las células no cancerígenas y, de ese modo, reducir los efectos secundarios.

Los datos obtenidos de los ensayos del cultivo celular y estudios en animales pueden utilizarse para formular un intervalo de dosificaciones de las terapias para el uso en sujetos. La dosificación de dichos agentes se encuentra preferiblemente dentro de un intervalo de concentraciones circulantes que incluyen la ED50 con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada y de la vía de administración utilizada. Para cualquier terapia descrita en esta memoria, la dosis terapéuticamente eficaz puede estimarse inicialmente a partir de ensayos en cultivos celulares. Una dosis puede formularse en modelos animales para conseguir un intervalo de concentraciones en plasma circulante que incluye la CI_{50} (es decir, la concentración del NDV quimérico que logra una inhibición media máxima de los síntomas) según se determina en cultivo celular. Dicha información se puede utilizar para determinar con mayor precisión las dosis útiles en sujetos. Los niveles en plasma se pueden medir, por ejemplo, mediante cromatografía líquida de alto rendimiento.

Estudios contra el Cáncer

Los NDVs quiméricos descritos en esta memoria o composiciones farmacéuticas de los mismos, vacunas de oncolisado o vacunas de células enteras pueden ser sometidos a ensayo en cuanto a la actividad biológica utilizando modelos animales para el cáncer. Dichos sistemas de modelos animales incluyen ratas, ratones, pollos, vacas, monos, cerdos, perros, conejos, etc. En una realización específica, la actividad anti-cáncer de un NDV quimérico descrito en esta memoria se somete a ensayo en un sistema de modelo de ratón. Estos sistemas de modelos son ampliamente utilizados y bien conocidos por el experto en la técnica tales como el modelo de ratón SCID o ratones transgénicos.

La actividad anti-cancerígena de un NDV quimérico descrito en esta memoria o una composición farmacéutica del mismo, vacuna de oncolisado o vacuna de células enteras se puede determinar mediante la administración del NDV quimérico o composición farmacéutica del mismo, la vacuna oncolisado o vacuna de células enteras a un modelo animal y la verificación de que el NDV o la composición farmacéutica del mismo, la vacuna de oncolisado o la vacuna de células enteras es efectiva, reduciendo la gravedad del cáncer, reduciendo los síntomas del cáncer, reduciendo la metástasis del cáncer y/o reduciendo el tamaño de un tumor en dicho modelo animal (véase, p. ej., la Sección 6, que figura más adelante). Ejemplos de modelos animales para el cáncer en general incluyen tumores que se producen de forma espontánea en animales de compañía (véase, p. ej., Vail y MacEwen, 2000, *Cancer Invest.* 18(8):781-92). Ejemplos de modelos animales para el cáncer de pulmón incluyen los modelos animales de cáncer de pulmón descritos por Zhang y Roth (1994, *In-vivo* 8(5):755-69) y un modelo de ratón transgénico con la función de p53 interrumpida (véase, p. ej., Morris et al., 1998, *J La State Med Soc* 150(4):179- 85). Un ejemplo de un modelo animal para el cáncer de mama incluye un ratón transgénico que sobre-expresa la ciclina D1 (véase, p. ej., Hosokawa et al., 2001, *Transgenic Res* 10(5):471-8). Un ejemplo de un modelo animal para el cáncer de colon incluye un ratón doblemente inactivado con TCR b y p53 (véase, p. ej., Kado et al., 2001, *Cancer Res* 61(6):2395-8). Ejemplos de modelos animales para el cáncer pancreático incluyen un modelo metastásico de adenocarcinoma pancreático murino PancO2 (véase, p. ej., Wang et al, 2001, *Int. J. Pancreatol.* 29(1):37-46) y ratones un-un generados en tumores pancreáticos subcutáneos (véase, p. ej., Ghaneh et al., 2001, *Gene Ther.* 8(3):199-208). Ejemplos de modelos animales para linfoma no Hodgkin incluyen un ratón con una inmunodeficiencia combinada severa ("SCID") (véase, p. ej., Bryant et al., 2000, *Lab Invest* 80(4):553-73) y un ratón transgénico IgHmu HOX11 (véase, p. ej., Hough et al., 1998, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95(23):13853-8). Un ejemplo de un modelo animal para el cáncer esofágico incluye un ratón transgénico para el oncogén 16 E7 tipo de virus del papiloma humano (véase, p. ej., Herber et al., 1996, *J. Virol* 70(3):1873-81). Ejemplos de modelos animales para carcinomas colorrectales incluyen modelos de ratón Apc (véase, p. ej., Fodde y Smits, 2001, *Trends Mol Med* 7(8):369-73 y Kuraguchi et al., 2000)

6. EJEMPLO

Este ejemplo demuestra la eficacia terapéutica de un NDV quimérico tratado mediante ingeniería genética para

expresar un antagonista de interferón heterólogo en el tratamiento del cáncer.

6.1 MATERIALES Y MÉTODOS

Líneas Celulares, Anticuerpos y Otros Reactivos

5 Líneas celulares de melanoma humano SkMel-2, SkMel-119 y SkMel-197 se mantuvieron en medio RPMI suplementado con penicilina, estreptomycin y suero de ternera fetal al 10%. Células Hep-2, A549, B16-F10 y Panc-1 se mantuvieron en medio DMEM con alto contenido en glucosa, suplementado con suero de ternera fetal al 10%, penicilina y estreptomycin HFF-1, SCC-15, SCC-25 y células Vero y se mantuvieron en MEM suplementado con FCS al 10%, penicilina y estreptomycin. Suero policlonal de conejo contra el virus NDV y anticuerpo anti-NS1 monoclonal de ratón se describieron previamente (Park et al. (2003) Newcastle disease virus V protein is a
10 determinant of host range restriction. *Journal of Virology* 77:9522-9532; Wang, et al (2000) Influenza A virus NS1 protein prevents activation of NF-kappaB and induction of alfa/beta interferon. *Journal of Virology* 74:11566-11573) El anticuerpo contra β -actina era de Sigma. Anticuerpos anti-ratón y anti-conejo secundarios conjugados con fluorocromo para microscopía eran de Molecular Probes. Anticuerpos anti-CD4 y anti-CD8 conjugados para la citometría de flujo se adquirieron de BD Pharmingen. Kits de ensayo de liberación de Cytotox LDH se adquirieron de Promega. Kits ELISA de interferón beta se adquirieron de PBL.

Clonación y Rescate de Virus

20 Previamente se describieron virus mutantes de NDV con sitio de escisión F modificado (NDV(F3aa)) (Park et al (2006). Engineered viral vaccine constructs with dual specificity avian influenza and Newcastle disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:8203-8208). Para generar virus NDV(F3aa) que expresan NS1, un fragmento de ADN que codifica la proteína NS1 de la influenza A/PR/8/34 flanqueada por las señales de transcripción de ARN específicas para NDV específicas apropiadas se insertó en el sitio XbaI creado entre los genes P y M de pT7NDV/F3aa. Los virus fueron rescatados de ADNc utilizando métodos descritos previamente (Nakaya et al. (2001). Recombinant Newcastle disease virus as a vaccine vector. *Journal of Virology* 75: 11868-11873) y se secuenciaron mediante PCR de transcripción inversa para la fidelidad de la inserción.

25 Bioensayo de Inducción de Interferón y ELISA

Para determinar la cantidad de IFN producido en células infectadas con los diferentes virus NDV recombinantes, se modificó un bioensayo descrito previamente (Quinlivan et al (2005). Attenuation of equine influenza viruses through truncations of the NS1 protein. *Journal of Virology* 79:8431-8439). En síntesis, fibroblastos de prepucio humano (HFF-1) o células Panc-1 fueron infectadas en placas de 6 pocillos con los virus de interés a una MOI de 0,1.
30 Sobrenadantes de infección fueron recolectados en diferentes momentos post-infección. El virus presente en los sobrenadantes se inactivó en Stratalinker 1800 (Stratagene) con 6 pulsos de 300 mJ/cm² de luz UV. Los sobrenadantes inactivados fueron entonces diluidos en serie y se utilizaron para tratar células Vero en placas de 96 pocillos durante 6 horas. Sobrenadantes de células no infectadas e IFN beta humano (R and D Systems) se utilizaron como controles negativos y positivos, respectivamente. Las células Vero se lavaron subsiguientemente y se infectaron con el virus NDV(B1)-gyp a una MOI de 0,1 durante 20 horas. A las 20 horas post-infección, se examinaron las células en cuanto a la expresión de GFP bajo el microscopio fluorescente. La presencia de citoquinas antivirales en el sobrenadante induce un estado antiviral en las células Vero, lo que impide la infección subsiguiente con NDV(B1)-GFP. En este ensayo, la cantidad de IFN es inversamente proporcional a la cantidad de la expresión de GFP. Se midió adicionalmente la secreción de IFN β mediante ELISA, de acuerdo con las
40 instrucciones del fabricante (PBL).

Ensayos de Liberación de LDH

Se infectaron células en placas de 12 pocillos durante 24, 48 y 72 horas, por triplicado para cada condición. En cada momento se aspiró el medio y las células se lavaron con 1 ml de PBS. Las células fueron incubadas subsiguientemente con un Triton X-100 al 1% a 37°C durante 30 min. La actividad de LDH en los lisados se determinó utilizando el kit de ensayo de Promega CytoTox 96, de acuerdo con las instrucciones del fabricante.
45

Infecciones y Títulos de Virus

Las células de interés se incubaron a temperatura ambiente con el virus en placas de cultivo de 12 pocillos en las MOIs indicadas en un volumen total de 100 μ l. Una hora después de la incubación, los medios de infección se aspiraron y las células se incubaron a 37°C en 1 ml de DMEM con BSA al 0,3%. A las células infectadas con el virus
50 NDV(B1) de tipo salvaje fluido alantoideo al 10% de pollo se añadió al medio para permitir la activación de la proteína de fusión. Después de 24, 48 y 72 horas, se recogieron los sobrenadantes y los títulos de virus se determinaron mediante dilución en serie e inmunofluorescencia en células Vero.

Microscopía de Fluorescencia

Las células se cultivaron en cubreobjetos de 10 mm y se infectaron con virus de interés a una MOI de 0,001. Veinte horas más tarde, las células se fijaron con formaldehído al 5% en PBS y se permeabilizaron con Triton X-100 al 1%.
55

Se visualizaron proteínas de interés mediante inmunofluorescencia indirecta. Las células se sondaron con anticuerpo primario específico durante 2 horas a temperatura ambiente, se lavaron y se marcaron con anticuerpo secundario conjugado con un fluoróforo específico. Se utilizó la tinción con DAPI para visualizar los núcleos de las células. Las células marcadas se visualizaron por microscopía láser confocal de barrido (Leica TCS-SP) con el software de TCS-SP para la captura de imágenes.

Experimentos con Ratones

Células B16-F10 cultivadas (1×10^5) se inocularon en la almohadilla de la pata posterior derecha de ratones C57/BL6J de 6-8 semanas de edad en un volumen total de 50 μ L. El día 7 ó 10 post-inoculación, los ratones fueron tratados mediante inyección intratumoral de 5×10^6 virus NDV de interés o PBS, en un volumen total de 50 μ L. Los tratamientos se repitieron cada dos días para un total de 4 ó 6 tratamientos, respectivamente.

Los tamaños de los tumores y los pesos de los ratones se registraron cada dos días. De acuerdo con los protocolos institucionales, los animales fueron sacrificados cuando los tumores alcanzaron 8 mm de longitud. El día 25, todos los 8 animales del grupo de control y 5 animales de cada uno de los grupos de tratamiento fueron sacrificados, y se recogieron sus bazos, ganglios linfáticos poplíteos y tumores. Los ratones restantes en cada uno de los grupos de tratamiento se observaron durante 120 días con una medición de tamaños de los tumores cada dos días.

Colección de Esplenocitos, Liberación de IFN y ensayos de CTL

Se extrajeron los bazos de los animales sacrificados y los esplenocitos se aislaron haciendo pasar los bazos a través de filtros de malla de nilón de 80 μ m. Células B16-F10 cultivadas (5×10^5) fueron tratadas con 50 μ g/mL de mitomicina C durante 2 horas a 37°C para inducir la detención del ciclo celular. Después del tratamiento, las células se lavaron con PBS y se incubaron con 1×10^7 esplenocitos en RPMI con FCS al 10% durante 5 días. El día 3, se recogieron los sobrenadantes y se sometieron a ensayo en cuanto a la liberación de IFN mediante ELISA utilizando el kit Quantikine kit (R&D Systems). El día 5, se recogieron los esplenocitos, se lavaron, se contaron y se cocultivaron durante 4 horas con 1×10^3 células B16-F10 en las relaciones de estimulador:efector de 1:1,25, 1:2,5, 1:5, 1:10, 1:20 y 1:40. La actividad específica de CTL se determinó mediante la liberación de LDH de las células diana utilizando el kit de LDH CytoTox 96 de Promega de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Citometría de flujo

Los tumores de los animales sacrificados se diseccionaron y disociaron manualmente con unas tijeras. El tejido disociado se recogió a continuación y se incubó a 37°C en 3 mL de medio RPMI y 50 μ L de Liberase Blendzyme 3 (Roche Diagnostics). Después de 30 minutos de incubación, se añadieron 120 μ L de EDTA 0,5 M a los homogeneizados celulares y se mezcló durante 5 minutos. Las células se filtraron luego utilizando un filtro de células y se tiñeron con anticuerpos anti-CD4 y anti-CD8 (GK1.5 y 53-6-7, respectivamente, BD PharMingen) y la citometría de flujo se realizó en una máquina Cytomics FC500 (Beckman Coulter) y se analizaron utilizando el software FlowJo (Tree Star).

6.2 RESULTADOS

La modificación de la proteína NDV F a un tipo fusogénico mediante la introducción de un sitio de escisión de proteasa polibásico ha demostrado permitir la formación eficiente de sincitios en las células infectadas y mejorar la actividad oncolítica viral del virus *in vitro* e *in vivo* (Vigil et al. (2007). El uso de la genética inversa para mejorar las propiedades oncolíticas del virus de la enfermedad de Newcastle Cancer Research 67:8285-8292). Para explorar el potencial oncolítico del NDV fusogénico, una serie de líneas de células tumorales procedente de una diversidad de tipos de cáncer, incluyendo pancreático humano, de mama, de tiroides, de cabeza y cuello, y cánceres gástricos, así como líneas celulares de melanoma maligno humano y murino fueron infectadas con virus NDV(B1) y NDV(F3aa) a una MOI de 0,1. Tal como se muestra en la Figura 1, el NDV era eficaz contra la mayoría de tipos de células tumorales, siendo NDV(F3aa) significativamente más citolítico que el virus NDV(B1) no fusogénico parental para la mayoría de las líneas celulares. La infección de las mismas líneas celulares con virus NDV(F3aa) que expresa GFP (NDV(F3aa)-GFP) reveló que el virus formó eficazmente grandes sincitios, que era probablemente el responsable de su actividad citolítica mejorada (Figura 1B).

A pesar de su actividad oncolítica eficaz en células CT26 estudios previos, tanto *in vitro* como *in vivo*, han demostrado que el virus NDV(F3aa) todavía no logró provocar regresiones tumorales completas en el modelo de tumor en el flanco singénico murino CT26 (Vigil et al. (2007). El uso de la genética inversa para potenciar las propiedades oncolíticas del virus de la enfermedad de Newcastle. Cancer Research 67:8285-8292; Vigil et al. (2008). Recombinant Newcastle disease virus as a vaccine vector for cancer therapy. Mol Ther 16: 1883-1890). Una teoría para explicar estos resultados es que la replicación viral eficaz en tumores está limitada por los factores del huésped y del tumor tal como la inducción de interferón (IFN) de tipo I. Para someter a ensayo si el NDV(B1) y el NDV(F3aa) inducen IFN de tipo I en células humanas susceptibles a NDV, se realizó un bioensayo de IFN, similar a los métodos descritos anteriormente (véanse Materiales y Métodos y la Figura 2A). Tal como se muestra en la Figura 2B, la infección de células Panc-1 con virus NDV(B1) y NDV(F3aa) condujo a la inducción de citoquinas antivirales a niveles equiparables a 1000 U/ml de IFN β , que eran suficientes para suprimir la replicación del NDV-GFP. Estos resultados indican que incluso en una línea celular de cáncer aparentemente susceptible a NDV, la

inducción de IFN de tipo I puede suprimir la replicación viral, limitando la eficacia oncolítica viral.

La represión de la inducción de IFN durante la infección por NDV debería permitir una mejor replicación viral en tumores, manteniendo al mismo tiempo el margen de seguridad terapéutica del virus. Utilizando el virus NDV(F3aa) como una columna vertebral, se construyó un virus que expresa la proteína NS1 de la cepa PR8 del virus de la gripe de acuerdo con los métodos descritos previamente (Nakaya et al. (2001). Recombinant Newcastle disease virus as a vaccine vector. *Journal of Virology* 75:11868-11873) (Figura 3A). El marcaje inmunofluorescente de las células Vero infectadas confirmó que la proteína NS1 era expresada por el virus NDV(F3aa)-NS1 y no por las cepas parentales NDV(F3aa) o NDV(B1) (Figura 3B). Todas las células infectadas con NDV(F3aa)-NS1 mostraron una expresión de la proteína NS1. La expresión se mantuvo después de 10 pasajes virales en huevos embrionados de pollo, lo que confirma la estabilidad del virus recombinante (datos no mostrados). Para confirmar que la proteína NS1 se expresaba a niveles altos, se realizó un curso en el tiempo de la infección por NDV en células Vero y se analizó la inducción de la expresión de NS1 dentro del período de un ciclo viral. Tal como muestra la Figura 3C, podía detectarse NS1 con una MOI de 0,1 tan pronto como a las 9 horas después de la infección.

Para confirmar que la proteína NS1 expresada en el contexto del genoma de NDV antagoniza la inducción de la respuesta innata en células humanas, se realizó un bioensayo de IFN para el curso en el tiempo de la inducción de IFN (Figura 7). Para asegurar que el virus recombinante es todavía capaz de provocar una respuesta anti-viral en células no cancerígenas, el ensayo se realizó en fibroblastos de prepucio humanos (HFF-1) primarios junto con la línea celular de cáncer pancreático Panc-1. La infección de células HFF-1 con virus NDV(B1) y NDV(F3aa) condujo a la inducción de citoquinas antivirales hacia las 10 horas de la infección (Figura 7). En cambio, la infección con virus NDV(F3aa)-NS1 retrasó la inducción de citoquinas antivirales hacia las 6 horas, confirmando la capacidad más fuerte del virus NDV(F3aa)-NS1 de antagonizar la inducción de la respuesta inmune innata. Resultados similares se observaron en las células Panc-1 (datos no mostrados).

Se sometió a ensayo la eficacia del virus NDV(F3aa)-NS1 en la lisis de diversas líneas de células tumorales humanas. El virus demostró ser más eficaz que el NDV(F3aa) contra la mayoría de las líneas celulares ensayadas (datos no mostrados).

Para determinar la extensión de la replicación del NDV y la citotoxicidad en las líneas celulares de melanoma, se seleccionaron la línea celular de melanoma humano SkMel-2 y la línea celular de melanoma B16-F10 de ratón. Mientras que todos los virus exhibieron una actividad citolítica significativa en las dos líneas celulares, NDV(F3aa) y NDV(F3aa)-NS1 eran las más eficaces (Figura 4A). A unas MOIs más bajas, NDV(F3aa)-NS1 demostró ser el agente citolítico más eficaz de todos los virus en las dos líneas celulares. Resultados similares se observaron en las líneas celulares SkMel-119 y SkMel-197 (datos no mostrados).

Curiosamente, las células tanto B16-F10 como SkMel-2 infectadas con el virus NDV(F3aa)-NS1 exhibían una formación de sincitios potenciada, en comparación con las células infectadas con NDV(F3aa) (Figura 4B). A MOIs de 0,1 y 1, la mayoría de las células infectadas por NDV(F3aa)-NS1 se fusionaron en sincitios hacia las 24 horas de la infección y se separaron de la placa hacia las 48 horas. La formación de sincitios sin una citolisis temprana significativa sugiere que la expresión de NS1 por parte de NDV protegía a las células frente a una lisis temprana. Este hallazgo es consistente con las propiedades anti-apoptóticas y anti-IFN de la proteína NS1 de la gripe Wang et al (2000). La proteína NS1 del virus de la gripe A previene la activación de NF-kappaB y la inducción del interferón alfa/beta. *Journal of Virology* 74:11566-11573, Garcia-Sastre et al (1998). El virus de la gripe A que carece del gen NS1 se replica en sistemas deficientes en interferón. *Virology* 252:324-330; Talon et al (2000). La activación del factor regulador de interferón 3 es inhibida por la proteína NS1 del virus de la gripe A. *Journal of Virology* 74:7989-7996; Bergmann et al (2001). A genetically engineered influenza A virus with ras-dependent oncolytic properties. *Cancer Research* 61:8188-8193, Zhirnov et al. (2002) NS1 protein of influenza A virus down-regulates apoptosis. *Journal of Virology* 76:1617-1625; Stasakova et al. (2005). Influenza A mutant viruses with altered NS1 protein function provoke caspase-1 activation in primary human macrophages, resulting in fast apoptosis and release of high levels of interleukins 1beta and 18. *The Journal of General Virology* 86:185-195). Una teoría es que estas funciones de la proteína NS1 permiten a las células fusionadas sobrevivir más tiempo, lo cual, a su vez, resulta en una replicación viral mejorada. De hecho, el virus NDV(F3aa)-NS1 replicaba a títulos más altos que el virus NDV(F3aa) (Figura 4C). Curiosamente, cuando se comparó la replicación de los virus en la línea celular Vera deficiente en interferones y los huevos de pollo embrionados, NDV(F3aa)-NS1 replica en títulos similares o incluso más bajos que el virus NDV(F3aa) (Figura 8 y datos no mostrados). Estos datos apoyan que el efecto citolítico mejorado y la replicación del virus NDV(F3aa)-NS1 dependen de su capacidad para antagonizar la respuesta de interferones de mamíferos.

Para confirmar que el NDV(F3aa)-NS 1 antagoniza de hecho la inducción de interferón en líneas celulares de melanoma, se realizó un ELISA para IFN β humano y murino secretado a partir de las células SkMel-2 y B-16F infectadas por NDV, respectivamente. Como se muestra en la Figura 4D, la inducción de IFN β se retrasó en células infectadas con NDV(F3aa)-NS1, cuando se compara con los controles infectados con NDV(F3aa).

En general, estos hallazgos sugieren que el virus NDV(F3aa)-NS1 era un agente citolítico eficaz para las líneas celulares de melanoma *in vitro*. Con el fin de evaluar si el efecto citolítico observado *in vitro* por NDV se traduciría en una mejor eficacia antitumoral *in vivo*, se utilizó el modelo singénico de melanoma de la almohadilla de la pata de

ratón B16-F10. La línea celular B16-F10 es conocida por su crecimiento del tumor particularmente agresivo, metástasis tempranas y respuestas muy malas a la terapia (Poste et al (1980). In vitro selection of murine B16 melanoma variants with enhanced tissue-invasive properties. *Cancer Research* 40:1636-1644; Lee et al. (2006). Enhanced antitumor effect of oncolytic adenovirus expressing interleukin-12 and B7-1 in an immunocompetent murine model. *Clin Cancer Res* 12:5859-5868, Entin et al. (2003). Tumor growth retardation, cure, and induction of antitumor immunity in B16 melanoma-bearing mice by low electric field-enhanced chemotherapy. *Clin Cancer Res* 9: 3190-3197; Rochlitz et al. (2002). Immunotherapy of metastatic melanoma by intratumoral injections of Vero cells producing human IL-2: phase II randomized study comparing two dose levels. *Cancer Gene Ther* 9: 289-295; Seliger et al. (2001). Characterization of the major histocompatibility complex class I deficiencies in B16 melanoma cells. *Cancer Res* 61: 1095-1099). Dado que el virus NDV(B1) que se produce de forma natural demostró previamente ser menos eficaz en la oncolisis que el NDV(F3aa) fusogénico (Vigil et al (2007) Use of reverse genetics to enhance the oncolytic properties of Newcastle disease virus. *Cancer Research* 67: 8285-8292), y los estudios *in vitro* mostraron una eficacia superior de los virus NDV(F3aa), NDV(B1) no se utilizó en los estudios con ratones.

Los estudios de toxicidad se llevaron a cabo inicialmente mediante la inoculación de tres (3) ratones C57/BL6 por vía subcutánea y tres (3) ratones C57/BL6 por vía intravenosa con 5×10^7 upf de virus NDV(F3aa) y NDV(F3aa)-NS1. A lo largo de la siguientes 2 semanas, ninguno de los animales exhibió signos de sufrimiento y continuaron ganado peso (datos no mostrados). Para demostrar la eficacia del virus NDV(F3aa)-NS1 en la terapia oncolítica, se utilizó un régimen de tratamiento a dosis bajas (5×10^6 upf) extendido a lo largo de 4 a 6 dosis.

Para los estudios de tumores, los ratones C57/BL6 de cada uno de los grupos fueron inoculados en la pata posterior derecha con 1×10^5 células B16-F10 cultivadas. Los tumores se dejaron desarrollar durante 7 días, momento en el que era visible un foco de tumor pigmentado en cada uno de los animales. El día 7, a la almohadilla de la pata posterior derecha de cada uno de los animales se inyectaron 5×10^6 de NDV(F3aa), NDV(F3aa)-NS1 o de control PBS. Ocho ratones fueron incluidos en el grupo de control, mientras que se utilizaron 12-13 ratones para cada uno de los grupos de tratamiento con el virus. La inoculación con 5×10^6 de cada uno de los virus respectivos se repitió los días 9, 11 y 13 (4 inyecciones en total). El efecto secundario más común fue el desarrollo de hinchazón localizado en el lugar de la inyección, que cedió a lo largo de los días siguientes a la última inoculación.

Ninguno de los animales mostró pérdida de peso significativa a lo largo del período de estudio (datos no mostrados). El día 25 después de la implantación del tumor, 8/8 de los ratones control desarrollaron tumores de tamaño significativo y fueron sacrificados. Además, seis animales del grupo NDV(F3aa) y 5 animales del grupo NDV(F3aa)-NS1 fueron seleccionados al azar, sacrificados y los bazos se retiraron para el análisis de la inmunidad celular del tumor, mientras que el resto de los animales continuó siendo vigilado en cuanto al crecimiento del tumor (véase más abajo). Tal como se muestra en la Figura 5A, en el día 25 sólo 2/13 animales en el grupo de NDV(F3aa) y sólo 1/12 animales en el grupo NDV(F3aa)-NS1 exhibió tumores significativamente visibles, que eran aún más pequeños que la mayoría de los tumores en el grupo de control.

Para determinar si los virus serían eficaces en la curación de tumores en una etapa posterior, los tumores se dejaron desarrollar durante 10 días y se utilizaron un total de 6 inyecciones de cada uno de los virus. Tal como se muestra en la Figura 5B, el tratamiento con virus tanto NDV(F3aa) como NDV(F3aa)-NS1 reprimió notablemente el crecimiento del tumor en todos los animales, con sólo unos tumores menores siendo detectable el día del sacrificio. Estos resultados indican que el número incrementado de tratamientos puede ser eficaz en la curación de tumores en etapas posteriores de desarrollo. Los tumores fueron tratados adicionalmente para el análisis de la infiltración de linfocitos (véase más adelante).

Los animales restantes del grupo de tratamiento tumoral temprana continuaron siendo vigilados para determinar la eficacia a largo plazo de cada uno de los tratamientos virales. A lo largo de los siguientes 120 días, 4/7 animales del grupo NDV(F3aa) desarrollaron tumores importantes y tuvieron que ser sacrificados, mientras que sólo 2/7 animales en el grupo NDV(F3aa)-NS1 desarrollaron tumores que requirieron una eutanasia de los animales (Figura 5C). Es de destacar que estos tumores tardaron más tiempo en desarrollarse que los de los animales del grupo NDV(F3aa). Los restantes animales en cada uno de los grupos se curaron completamente del tumor (1/3 en el grupo NDV(F3aa) y 1/6 en el grupo NDV(F3aa)-NS1), o tenían un foco pigmentado persistente que se mantuvo estable. La supervivencia general para la animales en el estudio a largo plazo fue de 0/8 para el grupo control, 3/7 para el grupo NDV(F3aa) y 7.5 para el grupo NDV(F3aa)-NS1 (Figura 5D).

Se evaluó el efecto de los tumores tratados con virus en el nivel de infiltración de células inmunes. Dado que los tumores del grupo de tratamiento temprano eran demasiado pequeños o indetectables en tamaño para el fraccionamiento celular, se utilizaron tumores del grupo de tratamiento posterior en el análisis. Los tumores de los ratones sacrificados arriba descritos se recogieron el día 22, se diseccionaron y se filtraron, y se tiñeron para la expresión de antígenos CD4 y CD8. Tal como se muestra en la Figura 6A, los tumores de los animales tratados con virus NDV(F3aa) y NDV(F3aa)-NS1 exhibieron un alto grado tanto de infiltración de células tanto CD4 como CD8, lo que sugiere el desarrollo de una respuesta inmune a la infección y/o al tumor. Estos resultados también indicaron que la supresión de la respuesta inmune innata por parte del virus NDV(F3aa)-NS1 no tuvo efecto negativo alguno en la respuesta inmune adaptativa al tumor y la infección.

Para determinar si los ratones tratados desarrollan una respuesta inmune adaptativa a las células de melanoma, los

animales sacrificados el día 25 fueron evaluados en cuanto al desarrollo de respuestas de CTL contra células B16-F10. Esplenocitos de los animales fueron co-cultivados con células B16-F10 inactivadas con mitomicina C durante 5 días y evaluadas para la liberación de IFN γ el día 3 y para la actividad de CTL específica para B16-F10 el día 5. Tal como se muestra en las Figuras 6B y 6C, el tratamiento con virus tanto NDV(F3aa) como NDV(F3aa)-NS1 resultó en una liberación potenciada de IFN y en una actividad potenciada de CTL, cuando se compara con el control. Estos resultados sugirieron que el tratamiento del tumor con NDV resultó en la generación de respuestas de CTL específicas para tumores, que pueden haber contribuido al efecto anti-tumor duradero del virus.

6.3 DISCUSIÓN

Se ha propuesto previamente que la sensibilidad de NDV a los efectos antivirales de IFN es la base de sus propiedades oncolíticas selectivas (Fiola et al (2006) Tumor selective replication of Newcastle disease virus: association with defects of tumor cells in antiviral defence. *Int J Cancer* 119: 328-338; Krishnamurthy et al. (2006). La respuesta de interferón regulada diferencialmente determina el resultado de la infección por virus de la enfermedad de Newcastle en líneas de células normales y tumorales *J Virol.* 80:5145-5155). Sobre la base de estos hallazgos, se ha sugerido el uso de virus sensibles a IFN para la terapia de virus oncolítico, ya que muchos tumores han demostrado ser deficientes en la respuesta a IFN de tipo I. A pesar de estos hallazgos, el uso de cepas de NDV que se producen de forma natural en ensayos clínicos en seres humanos sugirió que muchos de los tumores humanos todavía demuestran una resistencia a la infección por NDV (Freeman et al (2006) Phase I/II trial of intravenous NDV-HUI oncolytic virus in recurrent glioblastoma multiforme. *Mol Ther.* 13: 221-228; Lorence et al. (2007). Phase 1 clinical experience using intravenous administration of PV701, an oncolytic Newcastle disease virus. *Curr Cancer Drug Targets* 7: 157-167). Estudios de líneas celulares tumorales humanas han demostrado que las células tumorales son todavía capaces de organizar respuestas antivirales que podrían limitar la replicación del NDV y su eficacia oncolítica (Geiss et al (2002) Cellular transcriptional profiling in influenza A virus-infected lung epithelial cells: the role of the nonstructural NS1 protein in the evasion of the host innate defense and its potential contribution to pandemic influenza. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99: 10736-10741; Haralambieva et al. (2007). Engineering oncolytic measles virus to circumvent the intracellular innate immune response. *Mol Ther.* 15: 588-597; Vigil et al. (2007) Use of reverse genetics to enhance the oncolytic properties of Newcastle disease virus. *Cancer Res.* 67: 8285-8292).

Tal como se describe en esta memoria, se utilizó el sistema de inversión genética para la cepa NDV Hitchner B1 (NDV(B1)) lentogénica (no virulenta) para tratar mediante ingeniería genética un virus con dos alteraciones para mejorar las propiedades oncolíticas virales: la modificación de la proteína de fusión viral para permitir una distribución más eficiente entre las células infectadas y la introducción de una proteína antagonista de IFN para atenuar la respuesta inmune innata a la infección.

La modificación del sitio de escisión de la proteína NDV F a una secuencia de aminoácidos polibásica permite que la proteína sea escindida por proteasas intracelulares, haciendo que el virus más eficaz para penetrar en células y la formación de sincitios (de Leeuw et al (2005) Virulence of Newcastle disease virus is determined by the cleavage site of the fusion protein and by both the stem region and globular head of the haemagglutinin-neuraminidase protein. *J Gen Virol.* 86: 1759-1769; Peeters et al. (1999). Rescue of Newcastle disease virus from cloned cDNA: evidence that cleavability of the fusion protein is a major determinant for virulence. *J Virol.* 73: 5001-5009). Tal como se demuestra en esta memoria, un virus con una proteína de fusión modificada (NDV(F3aa)) permitió una propagación del virus más eficiente entre las células tumorales a través de formación de sincitios, dando como resultado una replicación viral incrementada, y mostró una oncolisis potenciada en diversas líneas de células tumorales, en comparación con el NDV de tipo salvaje. Sin embargo, a pesar de la replicación y propagación potenciadas, el virus NDV(F3aa) seguía todavía induciendo la señalización antiviral significativa en las células tumorales infectadas, imponiendo una limitación de la eficacia oncolítica de NDV *in vivo*.

Para amortiguar la señalización antiviral en las células infectadas con NDV, manteniendo la patogenicidad del virus en modelos animales, la proteína NS1 del virus de la gripe A, que previamente demostró bloquear la inducción de la señalización antiviral en células infectadas con virus de la gripe, se introdujo en el NDV con la proteína F modificada (García-Sastre et al (1998) Influenza A virus lacking the NS1 gene replicates in interferon-deficient systems. *Virology* 252: 324-330; Mibayachi et al. (2007). Inhibition of retinoic acid-inducible gene I-mediated induction of beta interferon by the NS1 protein of influenza A virus. *J Virol.* 81: 514-524; Wang et al. (2000). Influenza A virus NS1 protein prevents activation of NF-kappaB and induction of alpha/beta interferon. *J Virol.* 74: 11566-11573). La infección de fibroblastos primarios humanos con virus NDV(F3aa)-NS1 demostró que el virus era aún capaz de inducir una fuerte respuesta antiviral en las células no cancerígenas, aunque la inducción se retrasó en comparación con NDV(B1) y NDV(F3aa). Cuando se comparó con el virus NDV(F3aa), NDV(F3aa)-NS1 replicaba de manera más eficiente y dio lugar a una formación potenciada de sincitios entre células tumorales. Esta eficacia se demostró adicionalmente en el modelo de melanoma murino B16-F10 singénico. El tratamiento intratumoral con el virus NDV(F3aa)-NS1 condujo a una detención o a la regresión eficaz del tumor y a un alto porcentaje de supervivencia de los animales. Además de ello, la supresión de respuestas innatas por la proteína NS1 no tuvo efecto importante alguno en la generación de respuestas inmunitarias adaptativas a las células tumorales infectadas tal como se demostró por la infiltración de linfocitos tumorales y la generación de respuestas de CTL específicas para tumores.

Cabe destacar que ninguno de los animales desarrolló efectos secundarios al virus, lo que sugiere que el virus sigue siendo lo suficientemente atenuado como para provocar enfermedades. Hay varios factores que juegan un papel en

el mantenimiento del margen de seguridad terapéutica observado. En primer lugar, mientras que la proteína NS1 potencia la capacidad de NDV de replicar de manera más eficiente en células de mamífero, la pérdida de especificidad de especies virales para células aviares no es absoluta (véase Park et al, 2003, J. Virol. 77:9522-9532). En particular, la especificidad del receptor viral para células de aves como resultado de la unión de HN viral a sialogli-coproteínas $\alpha 2,3$ -enlazadas limita su infectividad en células de mamífero tal como se ha demostrado para la proteína hemaglutinina de la gripe (véase Rivetz et al, 1985, Arch. Virol. 85: 231-255; y Suzuki, 2005, Biol. Pharm. Bull. 28:399-408). En segundo lugar, la cepa Hitchner B1 utilizada es una cepa aviar lentogénica (no patógena), que posee otras mutaciones atenuantes, lo que probablemente también limitan su replicación en células de mamífero. En tercer lugar, mientras que el virus NDV(F3aa)-NS1 retrasó la inducción de la respuesta de IFN en las células humanas HFF-1 primarias, no la abolió por completo. De hecho, hacia las 16 horas resultó una inducción de IFN suficiente para suprimir adicionalmente la replicación de NDV.

Tal como se ha demostrado, la inyección intravenosa o subcutánea de al menos 5×10^7 pfu de NDV(F3aa) o NDV(F3aa)-NS1 no dio como resultado efectos secundarios significativos. Para el estudio de la eficacia oncolítica viral, se utilizó una dosis diez veces inferior (5×10^6 pfu) por inyección para un total de cuatro tratamientos, principalmente debido a la limitación de un volumen de disolución que puede ser inyectado en la almohadilla de la pata. Esta dosis es inferior a las dosis utilizadas en la mayoría de los estudios previos utilizando cepas de NDV que se producen de forma natural (véase Vigilia et al, 2007, Cancer Res. 67:8285-8292, Schimnacher et al., 2001, Int. J. Oncol. 18:945-952; y Phuangsab et al., 2001, Cancer Lett. 172:27-36). El uso de dosis más altas y la administración de regímenes de tratamiento más largos podrían resultar en un efecto oncolítico y una supervivencia aún más significativos. De hecho, el tratamiento de tumores B16-F10 en etapas posteriores con seis dosis de NDV era eficaz en la inducción de regresiones de tumores, en comparación con los controles no tratados. Mientras que el modelo de melanoma de ratón singénico se utilizó en esta memoria como la herramienta de evaluación primaria de la eficacia oncolítica viral, se demostró también que el virus NDV(F3aa)-NS1 es un agente oncolítico más eficaz en una diversidad de líneas celulares tumorales humanas. En particular, el virus demostró ser citotóxico para todas las líneas celulares de melanoma maligno humanas sometidas a ensayo, en donde se replica en títulos significativamente más altos y formó sincitios mayores que su antagonista NDV(F3aa). Estos hallazgos demuestran la eficacia oncolítica del virus en los modelos *in vivo* de melanomas humanos y otros tumores.

REIVINDICACIONES

1. Un virus quimérico de la enfermedad de Newcastle (NDV), que comprende un genoma empaquetado que codifica un antagonista de interferón heterólogo y una proteína F modificada con un sitio de escisión mutado, en donde el antagonista de interferón heterólogo y la proteína F modificada son expresados por el virus.
- 5 2. El NDV quimérico de la reivindicación 1, en donde el antagonista de interferón heterólogo es una proteína NS1 del virus de la gripe, proteína W del virus Nipah, proteína V de Nipah, proteína VP35 del virus del Ébola, proteína E3L del virus vacuna, proteína (RSV)NS2 del virus sincitial respiratorio o proteasa NS3-4 del virus de la hepatitis C.
3. El NDV quimérico de la reivindicación 1 ó 2, en donde el genoma empaquetado codifica, además, un antígeno tumoral, de modo que el antígeno tumoral es expresado por el virus.
- 10 4. El NDV quimérico de la reivindicación 3, en donde dicho antígeno tumoral es antígeno específico de la próstata (PSA), antígeno asociado a carcinoma (CAA), antígeno de mucina epitelial (MC5), antígeno de melanoma, antígeno asociado a melanoma p97, antígeno de melanoma gp75, antígeno de melanoma de elevado peso molecular (HMW-MAA), gangliósido GD2, gangliósido GD3, gangliósido GM2, gangliósido GM3, receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), antígeno HER2 (p185.sup.HER2), epítipo HER2neu, antígeno cancerígeno 15-3, M18, M39, CEA, TAG-72, CO17-1A, GICA 19-9, CTA-1 LEA, C14, MAGE-1, MAGE-3, BAGE, GAGE-1, GAGE-2, N-acetilglucosaminiltransferasa-V, p-15, gp100, MART-1/MelanA, TRP-1 (gp75), tirosinasa, quinasa 4 ciclina-dependiente, β -catenina, MUM-1, CDK4, HER-2/neu, papilomavirus humano-E6, papilomavirus humano E7, CD20, antígeno carcinoembrionario (CEA), receptor del factor de crecimiento epidérmico, MUC-1, caspasa-8, CD5, mucina-1, Lewisx, CA-125, p185HER2, IL-2R, Fap- α , tenascina, antígenos asociados con una metaloproteína, CAMPATH-1.
- 15 5. Una composición farmacéutica, que comprende el NDV quimérico de la reivindicación 1, 2, 3 ó 4 y un soporte farmacéuticamente aceptable.
- 20 6. Un método para producir una composición farmacéutica, comprendiendo el método:
 - a. propagar el NDV quimérico de la reivindicación 1, 2, 3 ó 4 en una línea celular que es susceptible a una infección por NDV; y
 - b. recoger el virus de la progenie,
 en donde el virus se hace crecer a cantidades suficientes y bajo condiciones suficientes de modo que el virus esté exento de contaminación, de forma que el virus de la progenie sea adecuado para la transformación en una composición farmacéutica.
- 30 7. Un método para producir una composición farmacéutica, comprendiendo el método:
 - a. propagar el NDV quimérico de la reivindicación 1, 2, 3 ó 4 en un huevo embrionado; y
 - b. recoger el virus de la progenie,
 en donde el virus se hace crecer a cantidades suficientes y bajo condiciones suficientes de modo que el virus esté exento de contaminación, de forma que el virus de la progenie sea adecuado para la transformación en una composición farmacéutica.
- 35 8. Una línea celular, que comprende el NDV quimérico de la reivindicación 1, 2, 3 ó 4.
9. Un huevo embrionado no humano que comprende el NDV quimérico de la reivindicación 1, 2, 3, ó 4.
10. Una composición farmacéutica según la reivindicación 5, para uso en un método de tratar el cáncer en un sujeto.
- 40 11. La composición farmacéutica para uso de la reivindicación 10, en donde el método comprende, además, administrar un segundo NDV quimérico, en donde el segundo NDV quimérico comprende un genoma empaquetado que codifica interleuquina-2 (IL-2), de manera que la IL-2 es expresada por el virus.
12. La composición farmacéutica para uso de la reivindicación 10, en donde el método comprende, además, administrar un segundo NDV quimérico, en donde el segundo NDV quimérico comprende un genoma empaquetado que codifica IL-2 y una proteína F modificada con un sitio de escisión mutado, de modo que la IL-2 y la proteína F modificada son expresadas por el virus.
- 45 13. La composición farmacéutica para uso de la reivindicación 10, en donde el cáncer es melanoma, cáncer colorrectal, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de próstata, carcinoma, cáncer de estómago, cáncer esofágico, cáncer de pulmón, cáncer cervical, mieloma múltiple, linfoma, leucemia, sarcoma, cáncer pancreático, cáncer pituitario, cáncer vulvar, cáncer uterino o cáncer de células renales.

14. La composición farmacéutica para uso de la reivindicación 10, en donde el cáncer es melanoma maligno, glioma maligno, carcinoma de células renales, adenocarcinoma pancreático, mesotelioma maligno, adenocarcinoma de pulmón, carcinoma de células pequeñas de pulmón, carcinoma, carcinoma de células escamosas de pulmón, cáncer de tiroides anaplásico o carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello.
- 5 15. La composición farmacéutica para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 14, en donde dicho sujeto es un ser humano.

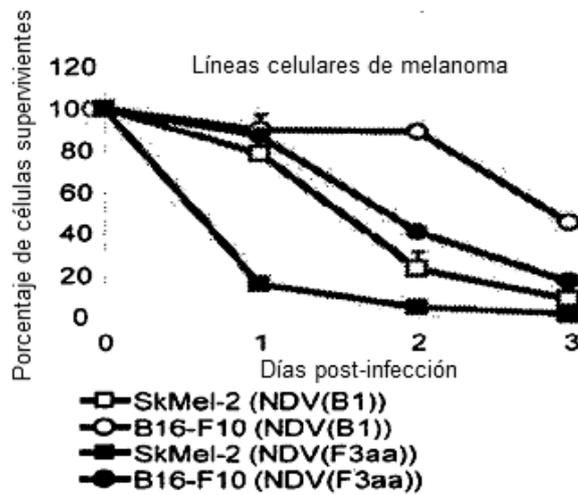
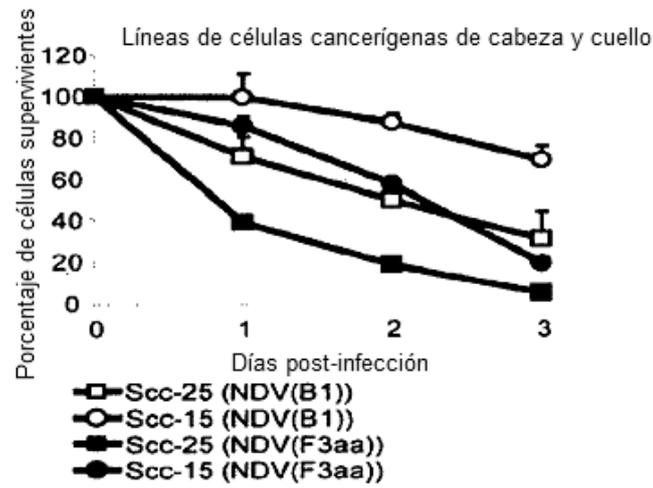
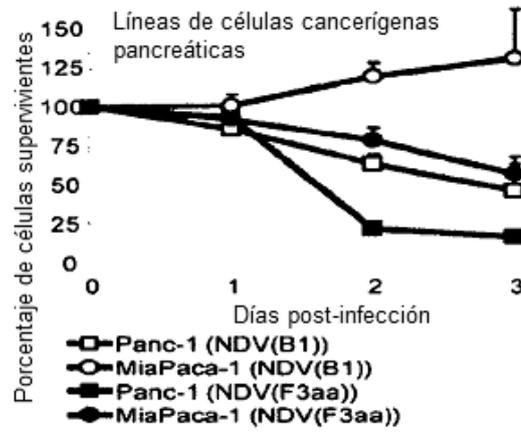


Fig. 1A

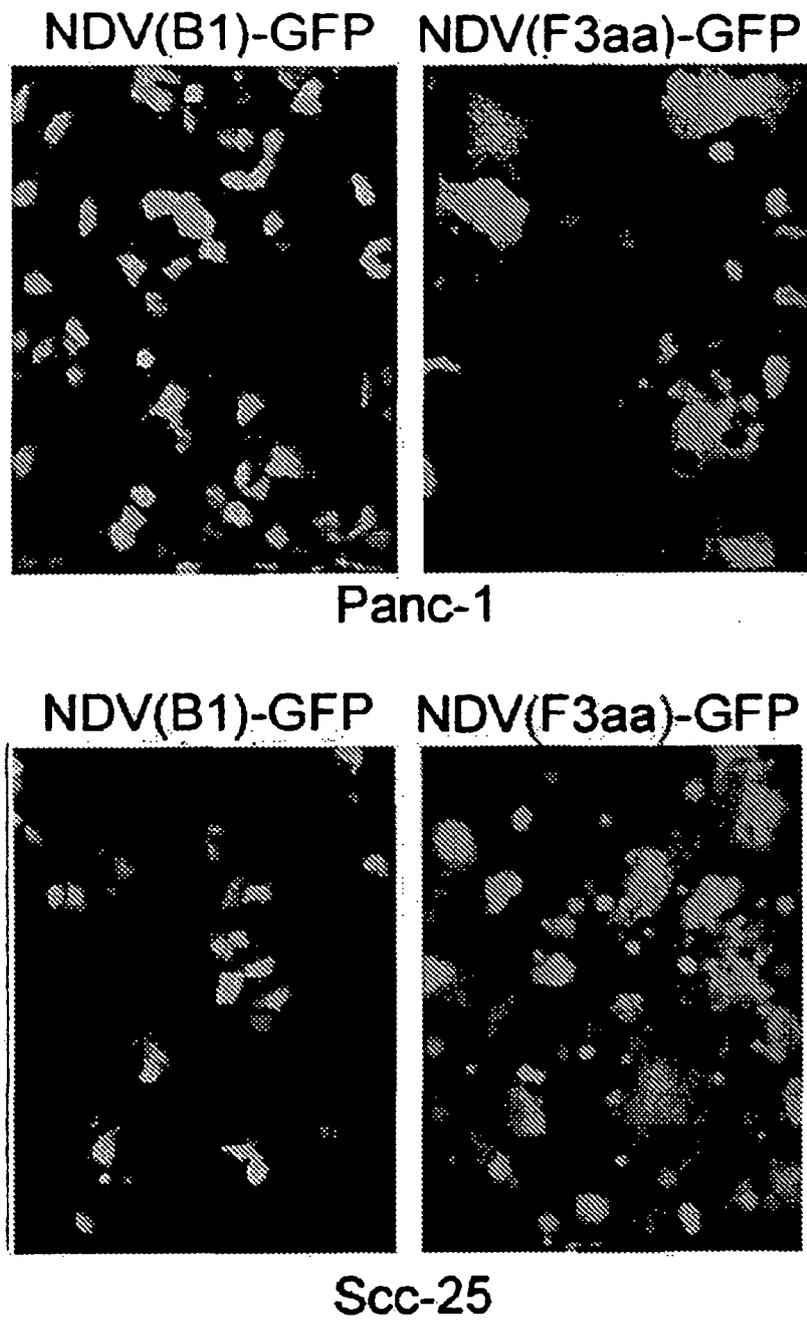


Fig. 1B

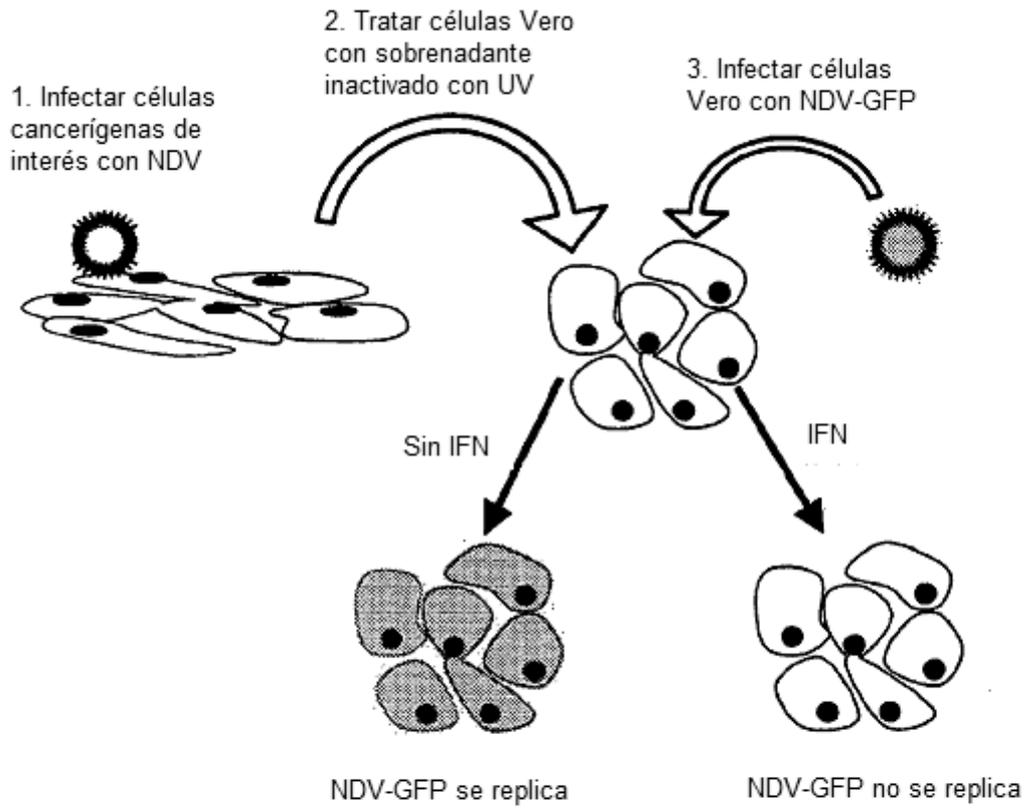


Fig. 2A

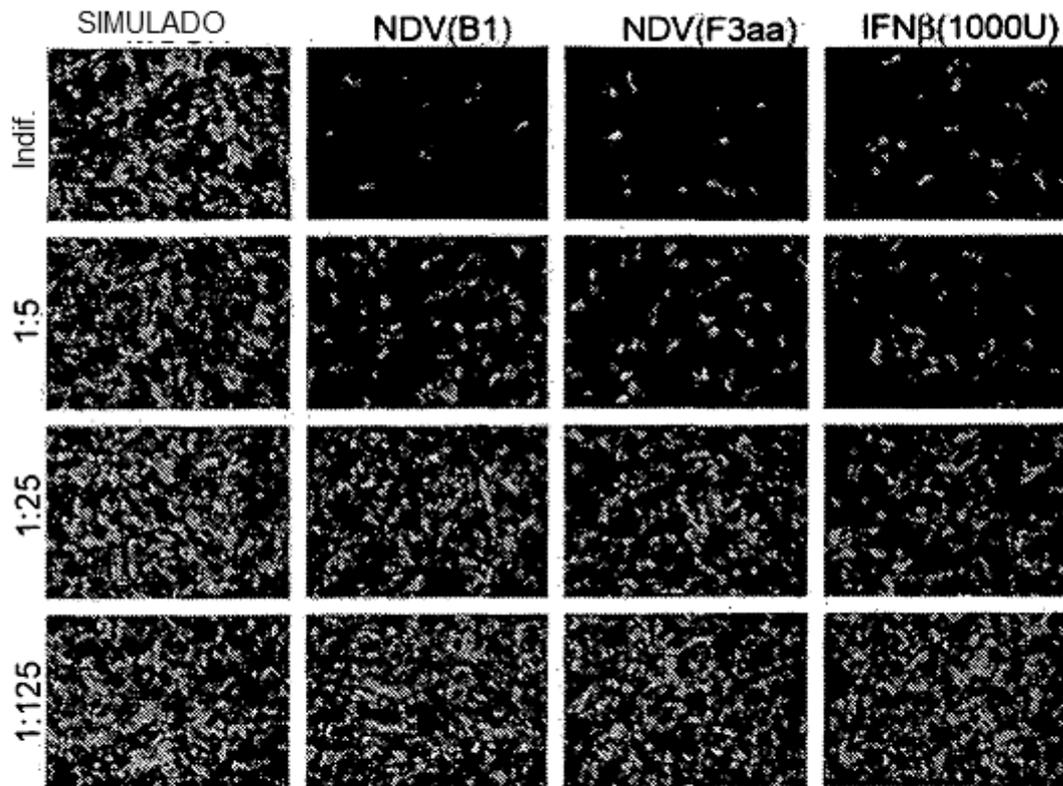


Fig. 2B

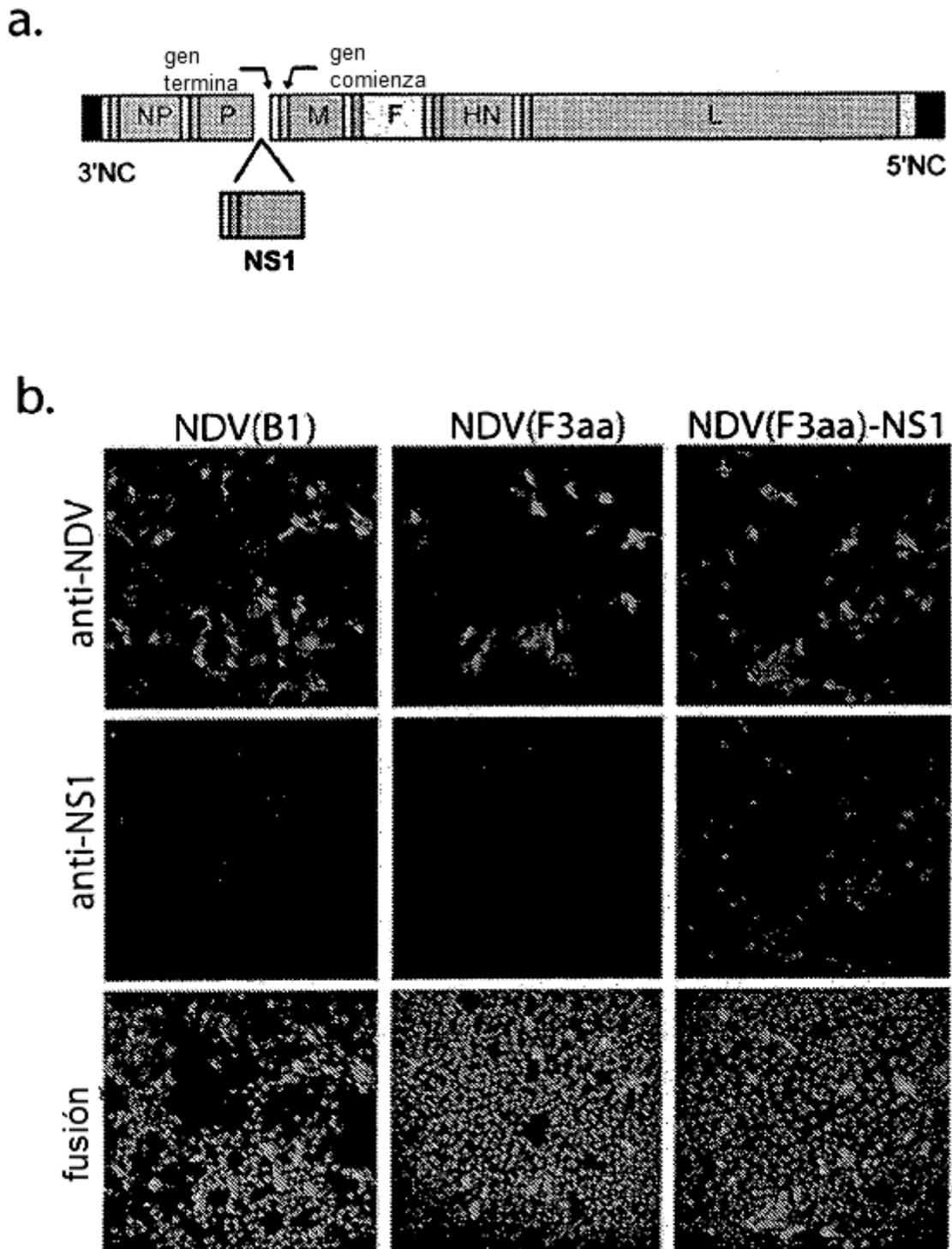


Fig. 3A-3B

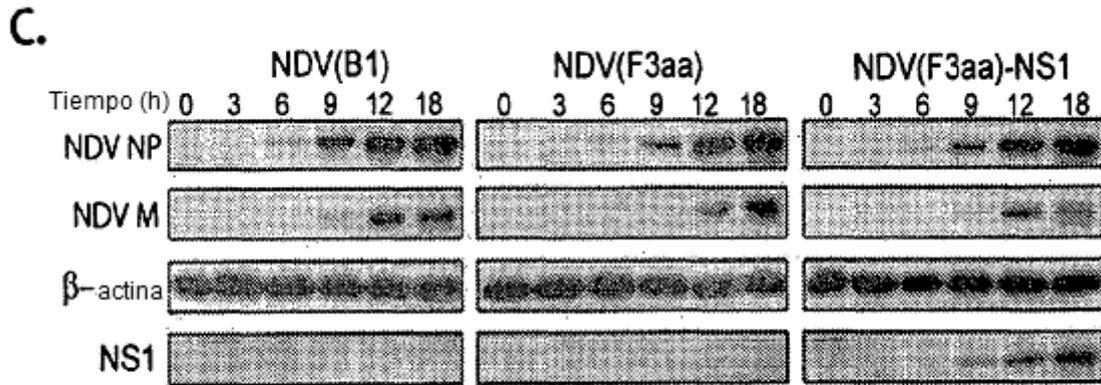


Fig. 3C

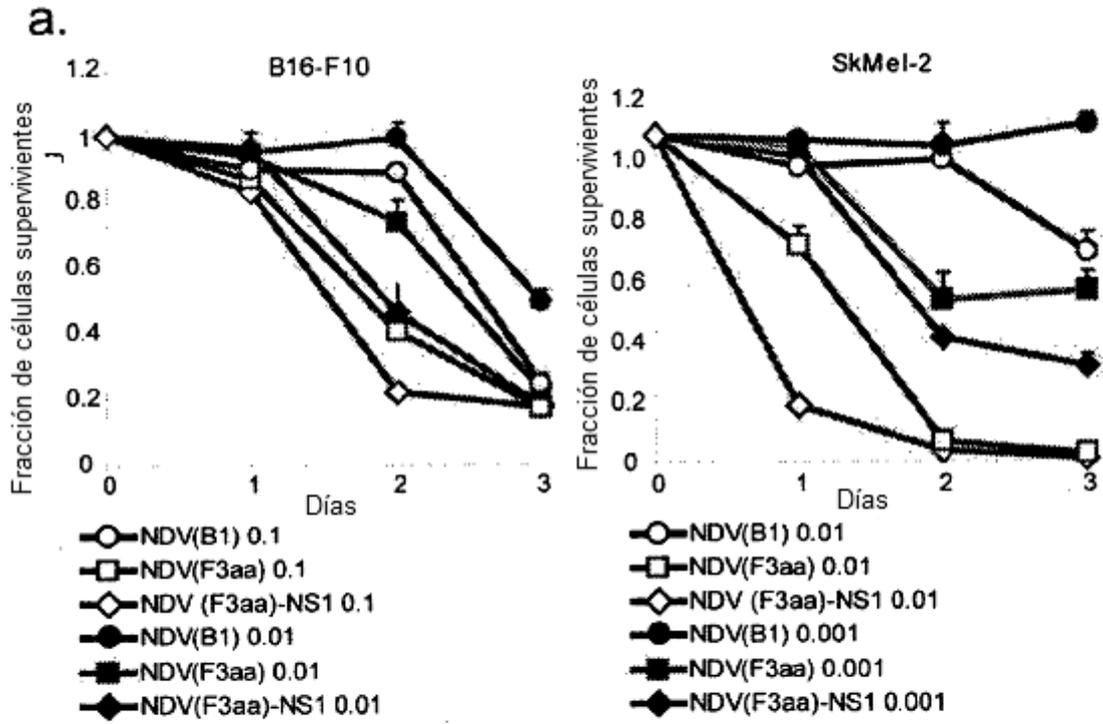


Fig. 4A

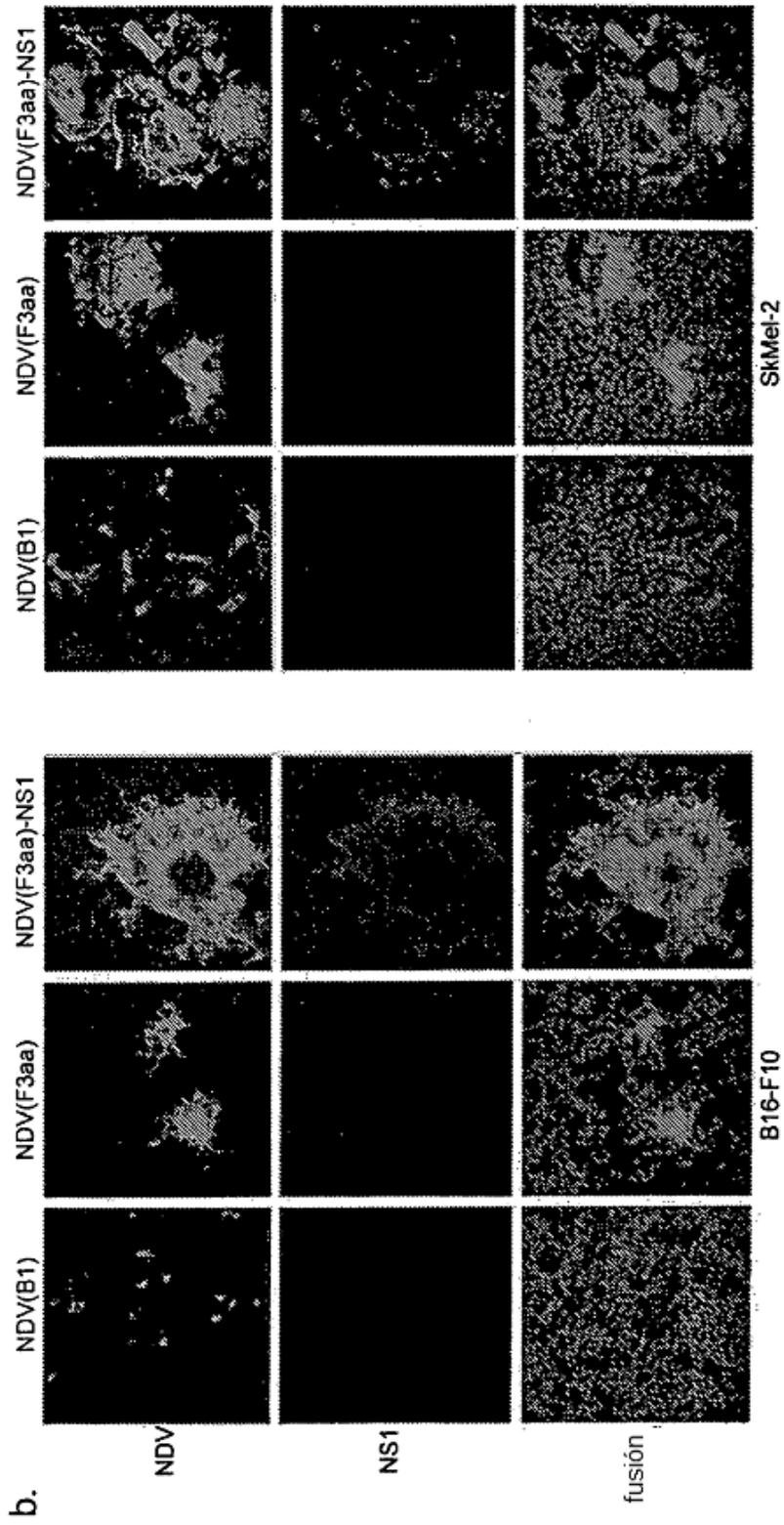


Fig. 4B

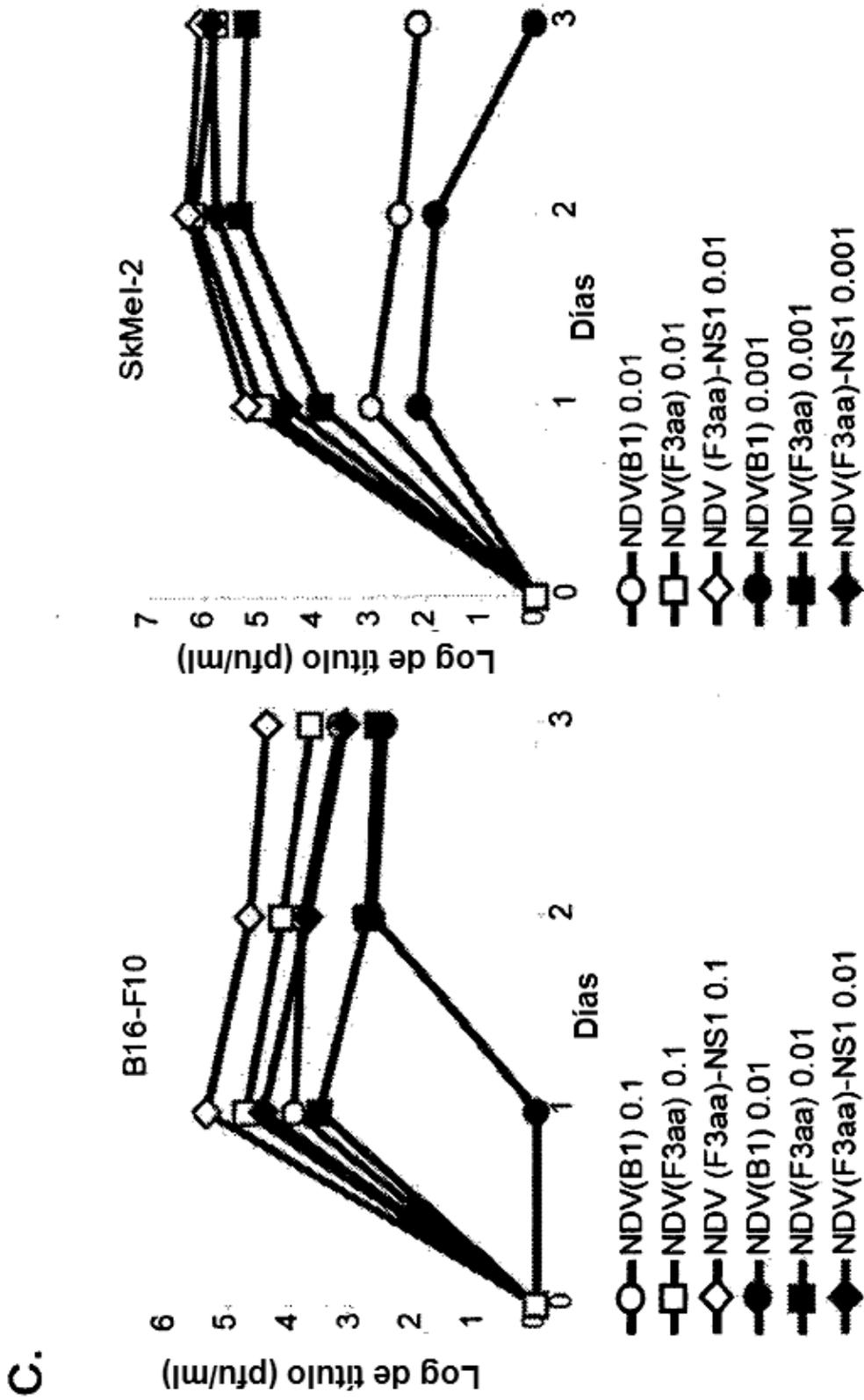


Fig. 4C

d.

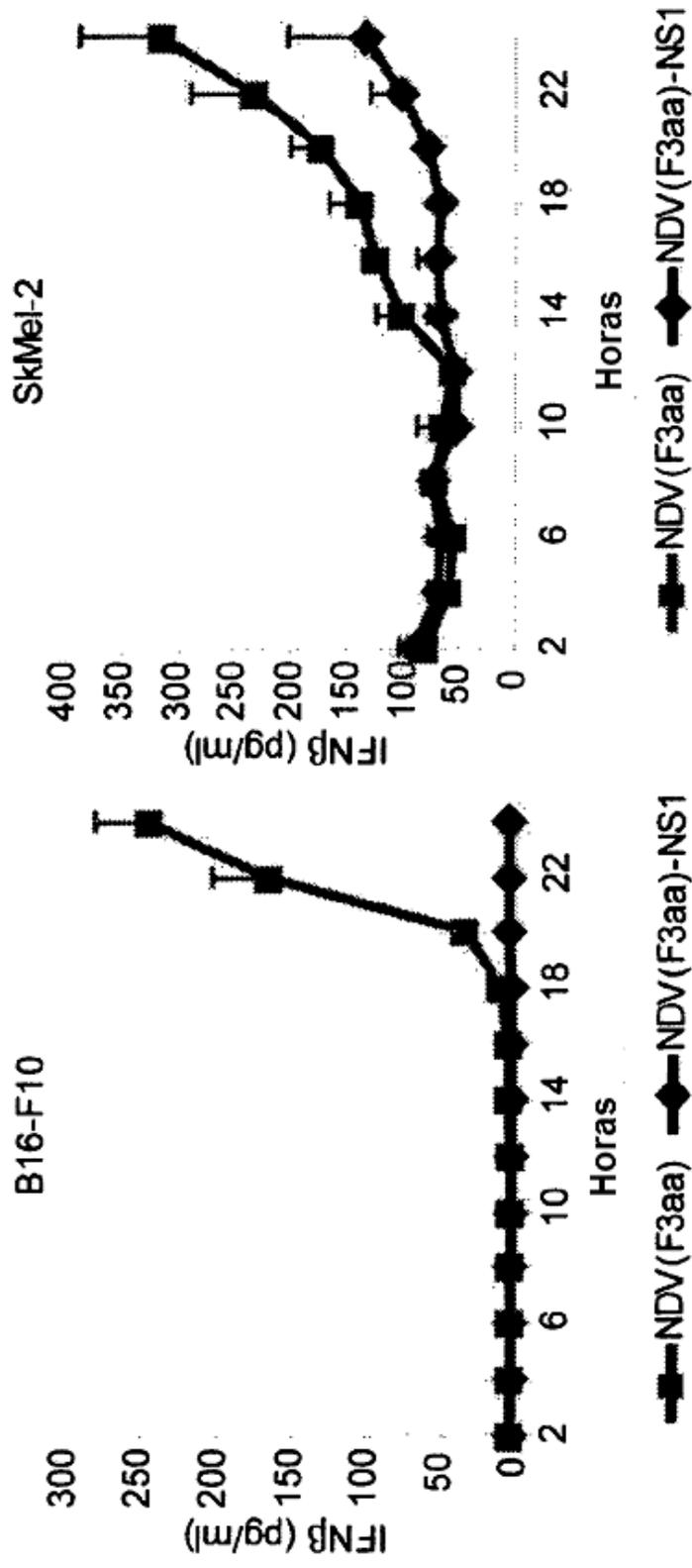


Fig. 4D

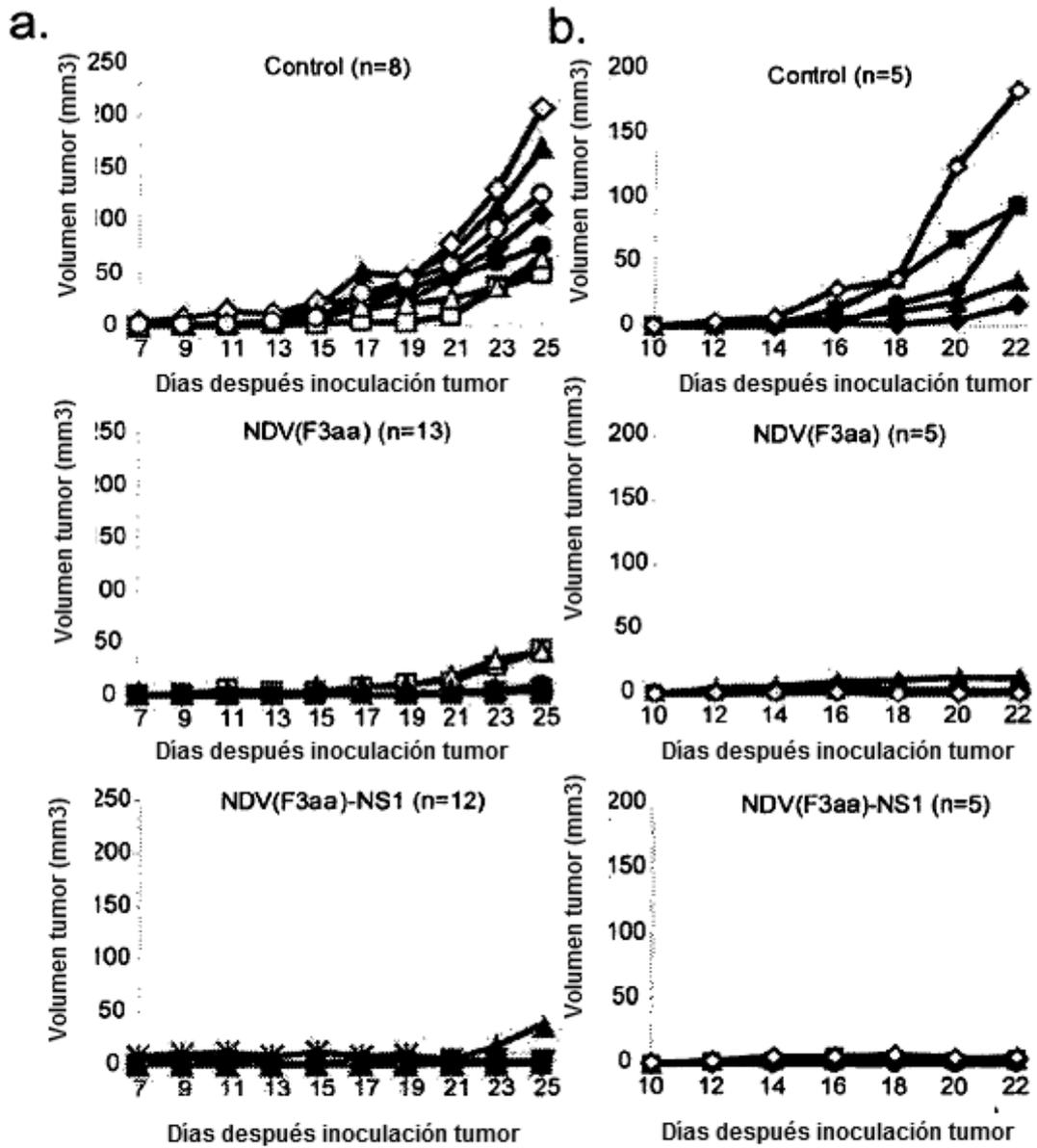
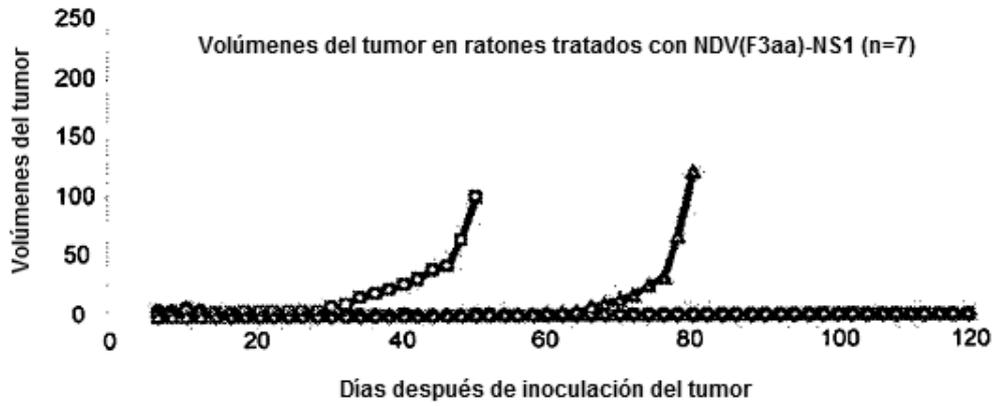
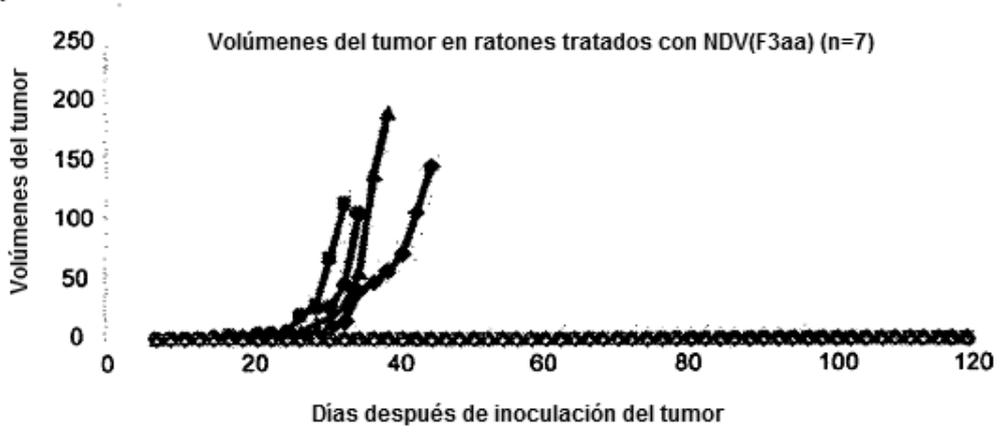


Fig. 5A-5B

c.



d.

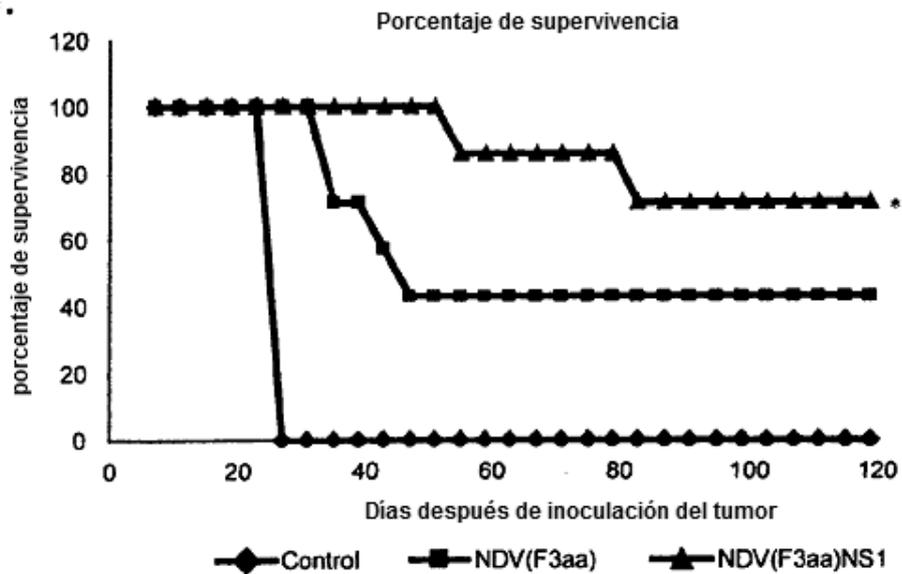


Fig. 5C-5D

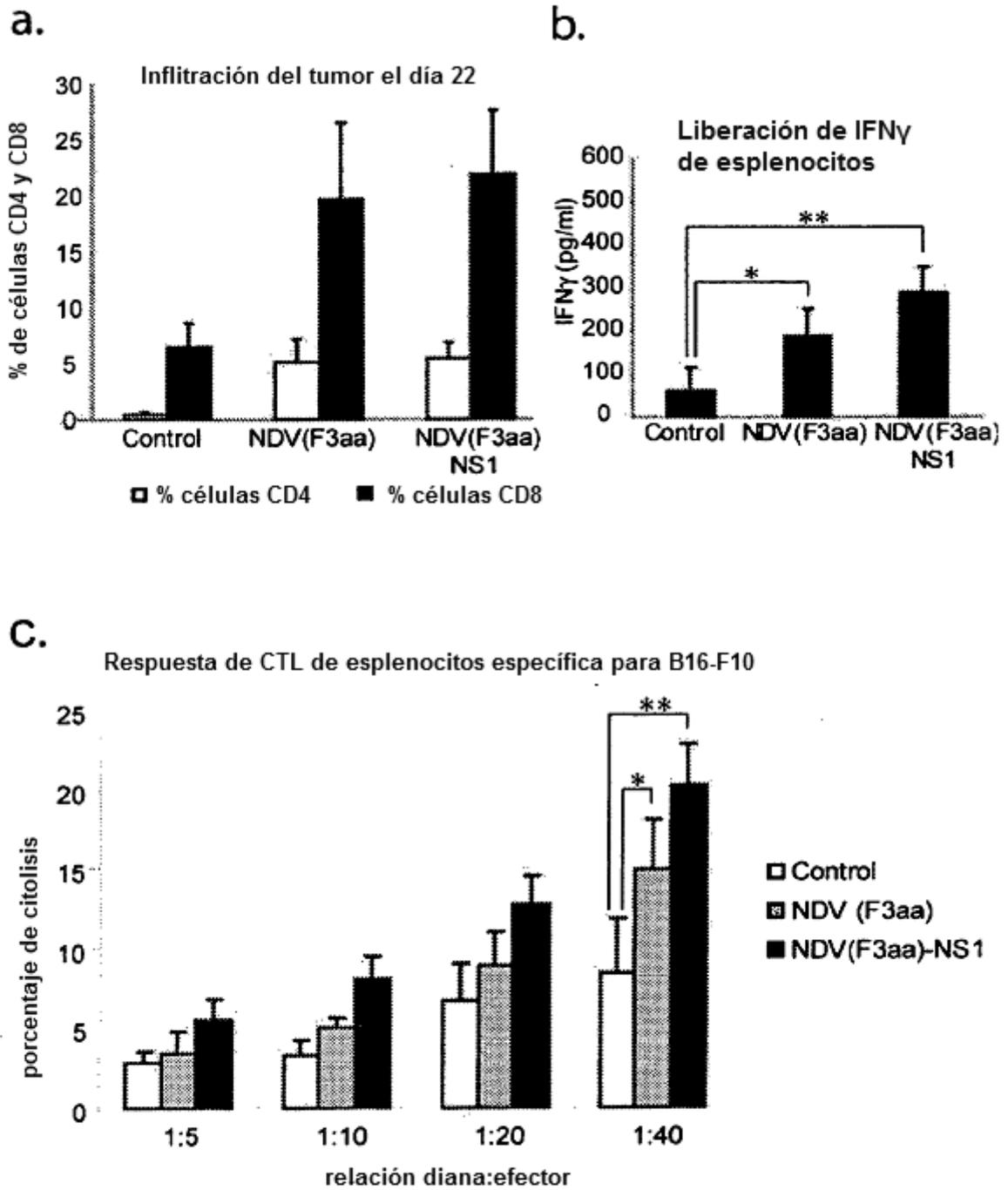


Fig. 6A-6C

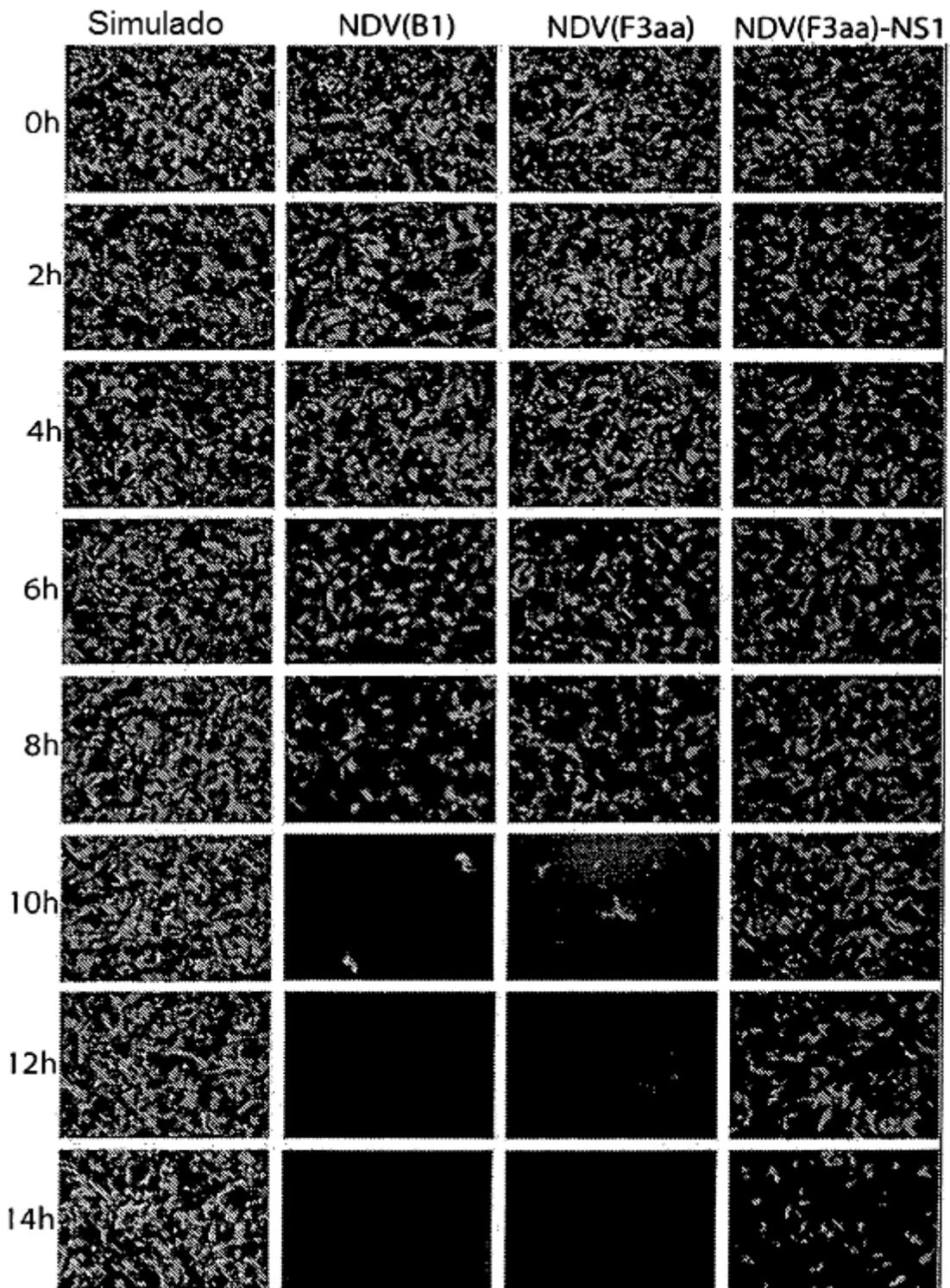


Fig. 7

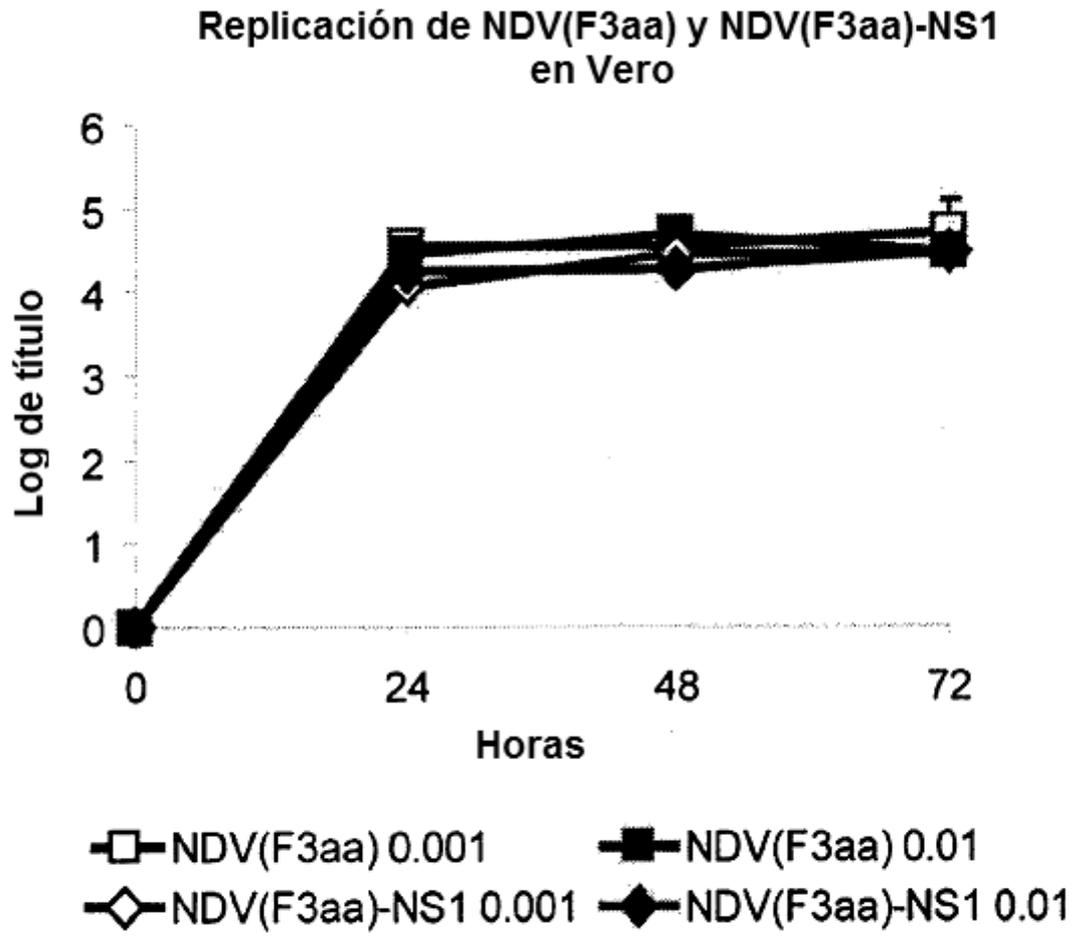


Fig. 8