

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 626 657**

51 Int. Cl.:

C12N 7/04 (2006.01)
A61K 31/675 (2006.01)
A61K 31/7068 (2006.01)
A61K 35/76 (2015.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C12N 15/00 (2006.01)
C12N 15/863 (2006.01)
C12N 7/00 (2006.01)
A61K 31/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.07.2010 PCT/CA2010/001065**
 87 Fecha y número de publicación internacional: **13.01.2011 WO11003194**
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.07.2010 E 10796626 (9)**
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.04.2017 EP 2451945**

54 Título: **Virus oncolíticos y métodos para tratar trastornos neoplásicos**

30 Prioridad:

10.07.2009 US 224694 P
08.07.2010 CA 2709292

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.07.2017

73 Titular/es:

THE GOVERNORS OF THE UNIVERSITY OF ALBERTA (100.0%)
4000 Enterprise Square, 10230 Jasper Avenue
Edmonton, Alberta T5J 4P6, CA

72 Inventor/es:

EVANS, DAVID H. y
GAMMON, DON B.

74 Agente/Representante:

ZEA CHECA, Bernabé

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 626 657 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 oncolíticos y métodos para tratar trastornos neoplásicos

5 Campo

La divulgación se refiere a virus oncolíticos, construcciones de vectores y composiciones así como métodos para tratar trastornos neoplásicos y más específicamente a poxvirus que comprenden un gen de R2 funcionalmente inactivado y métodos para tratar cánceres con niveles aumentados de R2 celular.

10

Antecedentes

Las ribonucleótido reductasas (RR) son enzimas conservadas evolutivamente que catalizan la reducción de ribonucleótido difosfatos (rNDP) a desoxirribonucleótido difosfatos (dNDP), que es crítica en la producción y el mantenimiento de grupos de dNTP. Los ortopoxvirus codifican genes para subunidades de RR tanto grandes (~90 kDa) como pequeñas (~40 kDa), y homodímeros de subunidades grandes y pequeñas interaccionan para formar un complejo de RR funcional.

15

Los estudios de proteínas RR de vaccinia descubrieron que la inactivación de inserción de *I4L* en la cepa WR no provocaba defectos observables en la replicación en cultivo y solamente atenuaba levemente estos virus en modelos de ratón con un aumento aproximadamente décuplo en los valores de dosis letal 50 para esta cepa $\Delta I4L$ en comparación con virus de tipo silvestre (6). Lee *et al.* (23) presentaron un mutante de supresión de 180 pb en las cepas NYCBH y Wyeth de vaccinia aunque los sitios específicos de esta supresión dentro del gen *F4L* (o R2) no se presentan. Estos autores indican que cuando el crecimiento de este mutante se evaluó en células BSC-40 a una multiplicidad de infección (MOI) de 10, este mutante de supresión se replicó con cinética y rendimientos similares a la cepa parental (de tipo silvestre) aunque los autores no presentan los datos cuantitativos reales (23). Estos autores también indican que este mutante de supresión se replicaba en títulos similares en la piel de ratón (23).

20

25

Se han usado clínicamente virus vaccinia y otros poxvirus. Por ejemplo se ha usado virus vaccinia como una vacuna para la viruela. Además, se ha investigado virus vaccinia como un virus oncolítico para terapia de cáncer.

30

El documento WO2009/065546 desvela un virus en el que se suprime el gen de F4L (R2).

Resumen

35

Como se desvela en el presente documento, se generó y aisló una serie de cepas de virus vaccinia (VACV) que comprenden subunidad de RR pequeña inactivada funcionalmente (F4, también denominada R2), por ejemplo que comprende una mutación puntual que reduce y/o anula la actividad de RR, sola o en combinación con otras inactivaciones funcionales. Los mutantes que comprendían R2 funcionalmente inactivada se replicaron más escasamente que el virus de tipo silvestre en experimentos de curva de crecimiento pero el grado de los defectos de replicación observados dependió de las líneas celulares ensayadas. Los mutantes de R2 también presentaron capacidades de replicación del genoma gravemente reducidas en comparación con virus de tipo silvestre. También se demuestra en el presente documento que los virus vaccinia que comprenden un gen de R2 funcionalmente inactivado, solo o en combinación con genes R1 y/o *J2R* funcionalmente inactivados, preferentemente replican e inducen muerte en células cancerosas que tienen niveles de RR aumentados. Dichos virus son útiles para tratar trastornos neoplásicos, por ejemplo cánceres, con niveles de RR aumentados.

40

45

En consecuencia, en un aspecto, la divulgación proporciona un poxvirus aislado, opcionalmente un poxvirus recombinante, que comprende un gen de R2 funcionalmente inactivado que comprende una mutación negativa dominante, una mutación puntual o una mutación de supresión, en el que la proteína codificada por el gen de R2 funcionalmente inactivado es capaz de interaccionar con subunidades de ribonucleótido reductasa (RR) celulares.

50

En una realización, la proteína codificada de la mutación de supresión carece de al menos 2 aminoácidos, o al menos 7 aminoácidos, por ejemplo, todo o parte del dominio de unión a R1. En una realización adicional, la proteína codificada carece de al menos 61 aminoácidos. En una realización, los aminoácidos suprimidos comprenden la supresión de al menos un resto catalíticamente importante y/o el sitio de unión a R1, por ejemplo como se proporciona en la Figura 1B. En otra realización, el R2 funcionalmente inactivado comprende una mutación Y300, tal como una mutación Y300F, y/o cualquier mutación de uno o más de los siguientes restos que provoca pérdida o reducción de la actividad catalítica: W34, E38, D70, E101, H104, Y108, F167, F171, G181, I193, D196, E197, H200, Y254 y E294. Las mutaciones anteriores se proporcionan en relación con la secuencia de SEQ ID NO: 1. Un experto en la materia que usa por ejemplo software de alineamiento de secuencias, sería capaz fácilmente de identificar las posiciones correspondientes en cualquier otro polipéptido de R2.

55

60

En un ejemplo, el poxvirus es un género o una cepa que comprende de forma nativa un gen de R2 y es infeccioso para células de mamífero. En otro ejemplo, el poxvirus es infeccioso para células humanas. En otro ejemplo más, el

65

poxvirus es infeccioso para células tumorales humanas.

En una realización, el poxvirus es un Orthopoxvirus tal como un virus vaccinia. En otro ejemplo, el poxvirus no está clasificado, por ejemplo es un virus de viruela de cocodrilo (CRV). En otro ejemplo, el virus vaccinia es una cepa de virus vaccinia seleccionada de WR (referencia de Genbank: NC_006998), Tian Tian (AF095689.1), NYCBH, Wyeth, Copenhagen (M35027), Lister (AY678276), MVA (U94848), Lederle, Temple of Heaven, Tashkent, USSR, Evans, Praha, LIVP, Ikeda, IHD, DIs, LC16 (AY678275), EM-63, IC, Malbrán, DUKE (DQ439815), Acambis (AY313847), 3737 (DQ377945), CVA (AM501482) y AS.

10 En una realización, el gen de R2 funcionalmente inactivado de virus vaccinia codifica una proteína que tiene una supresión de al menos 2 restos de aminoácidos, opcionalmente que tiene una supresión de 2 aminoácidos de SEQ ID NO: 1. En otra realización, el mutante de supresión carece de al menos 7 aminoácidos, opcionalmente el dominio de unión a RR1. En un ejemplo adicional, el mutante de supresión carece de al menos 310 restos de aminoácidos, u opcionalmente carece de restos de aminoácidos 1 a 310. En otro ejemplo, los nucleótidos correspondientes a los
 15 nucleótidos 33948-32987 del genoma de WR se suprimen o el poxvirus comprende una mutación descrita en las Tablas 1 o 2.

En una realización, el virus aislado o recombinante comprende además un gen de R1 funcionalmente inactivado, gen de timidina quinasa y/o gen del factor de crecimiento de virus vaccinia.

20 En otro aspecto, la divulgación proporciona una composición que comprende el virus opcionalmente recombinante aislado desvelado en el presente documento y un diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable. En un ejemplo, la composición comprende además hidroxiurea, gemcitabina y/o un análogo de nucleósido

25 Se desvela un método para inducir muerte en una célula de trastorno neoplásico, comprendiendo el método poner en contacto la célula con un virus aislado o recombinante o composición de la divulgación. La célula puede estar *in vivo*.

Se desvela un método para tratar un trastorno neoplásico que comprende administrar una cantidad eficaz del virus
 30 aislado o recombinante o la composición desvelado en el presente documento a un sujeto que lo necesite. El virus puede ser un virus oncolítico. El trastorno neoplásico puede ser cáncer.

El cáncer puede seleccionarse de cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer colorrectal, cáncer hepático tal como carcinoma hepatocelular, cáncer pancreático, cáncer de piel tal como melanoma, cáncer esofágico, leucemia, cáncer ovárico, cáncer de cabeza y cuello, gliomas y cáncer gástrico. El cáncer puede ser un carcinoma. El cáncer puede
 35 ser un carcinoma epitelioide. El cáncer puede ser un tipo de cáncer descrito en la Tabla 4.

El sujeto puede haberse tratado previamente con hidroxiurea y/o gemcitabina. La célula cancerosa o el cáncer pueden ser resistentes a quimioterapia. La célula cancerosa o el cáncer pueden ser resistentes a hidroxiurea o gemcitabina.

40 La célula cancerosa o el cáncer pueden comprender niveles aumentados de ribonucleótido reductasa en comparación con una célula normal del mismo tipo tisular. El nivel de ribonucleótido reductasa puede evaluarse determinando el nivel de actividad de la ribonucleótido reductasa, el nivel de proteínas de la ribonucleótido reductasa, el nivel de ARN de la ribonucleótido reductasa o los niveles de dNTP, en el que un aumento del nivel de
 45 actividad, proteínas o ARN de ribonucleótido reductasa o un aumento en los niveles de dNTP es indicativo de que la célula cancerosa o el cáncer tiene niveles aumentados de ribonucleótido reductasa. El nivel de ribonucleótido reductasa puede ser al menos 10 % más en comparación con una célula normal del mismo tipo tisular.

La célula cancerosa o una muestra del cáncer del sujeto pueden evaluarse con respecto a los niveles de
 50 ribonucleótido reductasa antes de la administración del virus aislado o recombinante o composición de la divulgación. También puede administrarse al sujeto hidroxiurea en la que la hidroxiurea se administra antes de, contemporáneamente con, o después de la administración del virus aislado o recombinante o composición de la divulgación.

55 También puede administrarse al sujeto un análogo de nucleósido, en el que el análogo de nucleósido se administra antes de, contemporáneamente con o después de la administración del virus aislado o recombinante y/o composición desvelado en el presente documento. También puede administrarse al sujeto gemcitabina en la que la gemcitabina se administra antes de, contemporáneamente con o después de la administración del virus aislado recombinante o composición desvelada en el presente documento. El análogo de nucleósido puede ser cidofovir
 60 (CDV) y/o cualquier otro compuesto de fosfonato de nucleósido acíclico y/o derivado de alcoxi éster del mismo.

La invención se refiere a un virus aislado y/o recombinante o una composición desvelado en el presente documento para uso en la inducción de muerte en una célula cancerosa o para tratar cáncer.

Un aspecto adicional incluye un poxvirus aislado que comprende un gen de R2 funcionalmente inactivado o una composición que comprende el poxvirus aislado para uso en la inducción de muerte en una célula de trastorno neoplásico y/o para su uso en el tratamiento de un trastorno neoplásico. En una realización, el trastorno neoplásico comprende un nivel aumentado de una subunidad de RR.

5 También se proporciona, en otro aspecto, una construcción de vector para generar un poxvirus con un R2 funcionalmente inactivado que comprende:

una cadena principal de vector;

10 un ácido nucleico 5' que comprende una secuencia flanqueante 5' de una región genómica de un gen para reemplazar tal como un gen de R2;

un casete de intercambio cadena abajo de la secuencia flanqueante 5', unido operativamente con un promotor y que codifica una proteína que carece de al menos 2 aminoácidos del dominio de unión a ribonucleótido reductasa (R1) grande, o una proteína que comprende una mutación Y300, comprendiendo el casete de intercambio opcionalmente un casete de gen NEO (por ejemplo unido operativamente con un promotor p7.5), un casete de gen de gusA (por ejemplo unido operativamente con un promotor H5 modificado) o un gen mutante del gen para reemplazar tal como un casete de gen de R2 mutante; y

15 un ácido nucleico 3' que comprende secuencia flanqueante 3' de la región genómica del gen para reemplazar tal como un gen de R2, cadena abajo del ácido nucleico del casete de intercambio.

20 En un ejemplo, el gen para reemplazar es el gen de R2. En otra realización, el gen es un gen de R1. Cuando el gen para reemplazar es un gen de R2, la distancia entre el inicio del ácido nucleico 5' y el final del ácido nucleico 3' es mayor de o menor de 180 pb.

En un ejemplo, el gen para reemplazar es el gen de R2. En otra realización, el gen es un gen de R1. Cuando el gen para reemplazar es un gen de R2, la distancia entre el inicio del ácido nucleico 5' y el final del ácido nucleico 3' es mayor de o menor de 180 pb.

25 En un ejemplo, la cadena principal del vector comprende pZIPPY-NEO/GUS (11). La construcción del vector se genera usando uno o más cebadores de la Tabla 5.

Se desvela un método para preparar un poxvirus recombinante aislado que comprende un gen de R2 funcionalmente inactivado como se define por las reivindicaciones, que comprende construir una construcción de vector para generar un poxvirus con gen de R2 funcionalmente inactivado descrito en el presente documento; transfectar la construcción de vector en células infectadas con un poxvirus, tal como una célula infectada por poxvirus de tipo silvestre, en condiciones adecuadas para recombinación; y aislar un poxvirus recombinante funcionalmente inactivado para R2.

35 Se describe una célula aislada que comprende un poxvirus aislado y/o recombinante que comprende un gen de R2 funcionalmente inactivado.

Se describe un anticuerpo generado usando antígeno de R2 de virus de ectromelia que detecta el antígeno R2 de virus de ectromelia y F4 de virus vaccinia. En una realización, el anticuerpo es monoclonal.

40

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Las realizaciones de la divulgación se describirán en relación con los dibujos en los que:

45 **Figura 1:** estrategia para la construcción de virus vaccinia recombinantes y caracterización de cepas mutantes. **A)** Esquema de genoma de vaccinia que ilustra las posiciones relativas y estrategias usadas para mutaciones de supresión/inserción en *F4L*, *I4L* y *J2R* (véase Materiales y Métodos para detalles). **B)** Alineamiento de subunidades R2 humana (HR2; referencia de Genbank: NP_001025); R2 de ratón (MR2; referencia de Genbank: NP_033130); p53R2 humana (Hp53R2; referencia de Genbank: BAD12267); p53R2 de ratón (Mp53R2; referencia de Genbank: Q6PEE3) y R2 de vaccinia (VACVR2; referencia de Genbank: AAO89322). Adaptado de (5). (*) Indica restos catalíticamente importantes y los restos encuadrados representan el dominio de unión a R1 (5). El alineamiento se realizó con software ClustalW. **C)** Geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio que ilustran el análisis de PCR de cepas mutantes. **D)** Análisis de transferencia de Western de cepas mutantes de ribonucleótido reductasa después de infección en células HeLa (MOI = 10) durante 8 h. Obsérvese que la banda superior en la mancha I4 aparece debido a reactividad cruzada del anticuerpo anti I4 con HR1. La transferencia para las proteínas celulares o víricas expresadas de forma constitutiva (actina y 13, respectivamente) actuaron como controles de carga.

60 **Figura 2:** Las cepas $\Delta F4L$ muestran un fenotipo de placas pequeñas y replicación alterada *in vitro*. **A)** Placas representativas formadas por cada una de las cepas indicadas 48 h después de la infección en células BSC-40. **B)** Representaciones de dispersión que ilustran mediciones de área de placa independientes (n = 20) así como medias (barra horizontal) en unidades arbitrarias (UA) para cada una de las cepas indicadas. Los círculos abiertos indican que el área de placa medio fue estadísticamente diferente (P<0,05) de virus de tipo silvestre basándose en ANOVA de una vía. **C)** y **D)** Crecimiento de virus en células HeLa infectadas con cada una de las cepas indicadas a una MOI de 0,03. Los virus se recogieron en los puntos temporales indicados y se titularon en

65

células BSC-40. Obsérvese que los experimentos presentados en (C) y (D) se realizaron en paralelo, pero se presentan en dos gráficos para mayor claridad. Por lo tanto, la curva de tipo silvestre es idéntica en ambos gráficos. Los símbolos representan títulos medios de tres experimentos independientes y las barras de error representan el ET. Algunas barras son aproximadamente del mismo tamaño que los símbolos.

Figura 3: capacidades de replicación de genoma y crecimiento del virus $\Delta F4L$ en células BSC-40. **A)** Curva de crecimiento (MOI = 2) de virus indicados en células BSC-40 que muestran títulos medios (\pm ET) determinados en los puntos temporales indicados. Obsérvese que en algunos casos las barras de error son del mismo tamaño que los símbolos. **B)** Se analizaron muestras paralelas de A) para replicación de genoma por transferencias por ranuras basadas en radioisótopos de extractos de ADN de células infectadas con los virus indicados en presencia o ausencia de hidroxurea (HU) 0,5 mM en células BSC-40.

Figura 4: coinmunoprecipitación de F4 de virus vaccinia con proteínas de ribonucleótido reductasa (RR) celular endógena. **A)** Se infectaron células HeLa (MOI = 10) durante 6 h con virus vaccinia de tipo silvestre después de lo cual se lisaron las células recogidas y se sometieron los extractos proteicos resultantes a inmunoprecipitación usando anticuerpos comerciales que reconocen las proteínas celulares indicadas o suero de cabra normal (control). **B)** Coinmunoprecipitación de F4 con HRI en presencia o ausencia de I4. Se infectaron células HeLa con cepas de VAVC $\Delta I4L$ o de tipo silvestre como en (A) y se sometieron a inmunoprecipitación con HRI o anticuerpos de control 8 h después de la transfección. Estos inmunoprecipitados y los extractos celulares completos correspondientes (lisados) se sometieron a SDS-PAGE, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se sometieron a transferencia de Western (WB) con anticuerpos que reconocían las proteínas celulares o víricas indicadas.

Figura 5: las proteínas RR de poxvirus recombinante interactúan con proteínas RR humanas endógenas. **A)** Coinmunoprecipitación de subunidades de RR grandes celulares/víricas marcadas con Flag con subunidades RR pequeñas víricas/celulares. Se infectaron células HeLa (MOI = 10) durante 8 h con las cepas de virus vaccinia indicadas (véase Materiales y Métodos para descripciones) después de lo cual los lisados se sometieron a inmunoprecipitación con un anticuerpo anti Flag. **B)** Coinmunoprecipitación de proteínas R2 marcadas con His₆ de VAC, ectromelia (ECTV), mixoma (MYX) y fibroma de Shope (SFV) con HR1. Se infectaron células HeLa con las cepas indicadas a una MOI de 10 durante 8 h y después se sometieron los extractos de proteínas a inmunoprecipitación con anticuerpos anti HR1 o suero de control (indicado por “*”). LC, cadena ligera. Después los inmunoprecipitados y los extractos celulares completos correspondientes se sometieron a transferencia de Western como se describe en la en la leyenda de la Figura 4.

Figura 6: se localizan proteínas RR humanas y víricas en el citoplasma durante la infección con VACV. **A)** Localización de subunidades de RR humanas en ausencia o presencia de infección. Las células HeLa se infectaron de forma simulada (simulación) o se infectaron con VACV de tipo silvestre (VAC) a una MOI de 5 durante 10 h después de lo cual se fijaron cubreobjetos y se tiñeron con anticuerpos contra R1 (HR1), R2 (HR2) o p53R2 humano endógeno. **B)** Localización de subunidades de RR humana y de VACV recombinante durante infección. Se coinfectaron células HeLa con las cepas indicadas (MOI de 5 para cada virus) durante 10 h después de lo cual se fijaron cubreobjetos y se tiñeron con anticuerpos que reconocían epítopos de Flag o His₆. Las flechas indican posiciones de ADN vírico citoplasmático. CID, contraste de interferencia diferencial.

Figura 7: la expresión de restos C terminales de F4 inhibe la interacción con HR1 y altera el crecimiento del virus. **A)** Coinmunoprecipitación de proteínas F4 recombinantes con HR1. Se infectaron células HeLa con las cepas indicadas a una MOI de 10 durante 8 h y después se sometieron extractos proteicos a inmunoprecipitación (IP) con anticuerpos anti HR1 o suero de control (indicado por “*”). Se muestran transferencias de Western (WB) de material IP y lisados totales. LC, cadena ligera. **B)** Análisis de área de placas de cepas mutantes para RR. Se infectaron monocapas de BSC-40 en placas de 60 mm de diámetro con ~100 UFP de las cepas indicadas y se tiñeron durante 48 h después de la infección con violeta cristal. Las representaciones de dispersión ilustran mediciones de área de placa independientes (n = 20) así como medias (barra horizontal) en unidades arbitrarias (UA) para cada una de las cepas indicadas. Los círculos abiertos indican que el área de placa media era estadísticamente diferente ($P < 0,05$) del virus de tipo silvestre como se determina por un ANOVA de una vía.

Figura 8: correlación de la expresión de subunidades de RR celulares y replicación de cepa de virus vaccinia mutante en dos líneas celulares de cáncer pancreático humano. **A)** Análisis de transferencia de Western de expresión de subunidad de RR vírica y celular de extractos proteicos preparados a partir de células PANC-1 y Capan-2 infectadas de forma simulada e infectadas con tipo silvestre (MOI = 5) en los tiempos indicados después de la infección. **B)** Rendimientos de virus medios (+ET) después de 48 h o 72 h de infección (MOI = 0,03) de células PANC-1 (P) o Capan-2 (C) con las cepas indicadas. C) Nueva representación de los datos en B) para mostrar la diferencia relativa en las eficacias de replicación medias entre las dos líneas celulares para las cepas indicadas. Los virus que carecen de los genes tanto *I4L* como *F4L* replican 30-40 veces mejor en células PANC-1 que sobreexpresan subunidades de RR celulares en comparación con células Capan-2. Los virus que codifican la sustitución Y300F replican ~100-115 veces mejor en células PANC-1 en comparación con células Capan-2.

Figura 9: replicación de cepas de VACV en células primarias humanas. Las células de pulmón embrionario humano primarias (HEL) se cultivaron durante 96 h en DMEM que contenía 10 % (Suero) **A)** o 0,5 % (Sin Suero) **B)** FBS antes de la infección (MOI = 0,03) con las cepas de VACV indicadas. En los tiempos indicados las células se recogieron, se congelaron-descongelaron tres veces y se titularon en células BSC-40. Las barras de error representan DT aunque algunas barras de error son aproximadamente del tamaño de los símbolos. **C)** Se cultivaron células HEL como en (A) y (B) y después se infectaron con VACV de tipo silvestre (MOI = 5) o se infectaron de forma simulada. En los tiempos indicados se prepararon extractos proteicos de lisados celulares. Se separaron cantidades iguales de proteína por SDS-PAGE seguido de transferencia de Western (WB) con anticuerpos dirigidos contra R1 humano (HR1), R2 humano (HR2), p53R2 humano (Hp53R2), VACV 14 o VACV F4. Las transferencias para actina celular actuaron como controles de carga.

Figura 10: requisito diferencial de subunidades de RR de VACV para patogénesis. (A) Análisis del peso corporal del animal después de infección con cepas mutantes para RR. Se inocularon grupos de 5 ratones NMRI por una vía intranasal con 40.000 UFP de las cepas de VACV indicadas o se infectaron de forma simulada con tampón estéril. Los símbolos representan la media del peso corporal de cada grupo de ratones (o miembros supervivientes) durante los tiempos indicados después de la infección. El número de ratones supervivientes en cada grupo de tratamiento se indica entre paréntesis. Las barras de error representan DT. (B) Títulos de pulmón después de infección con cepas mutantes para RR. La representación de dispersión muestra títulos de virus de ratones individuales con medias (barras horizontales) para cada grupo. Los ratones se infectaron en paralelo con los estudios en (A) y se sacrificaron 5 días después de la infección. Los títulos de virus de pulmón se determinaron como se describe en Materiales y Métodos.

Figura 11: la cepa $\Delta F4L$ tiene expresión reducida de la proteína de VACV tardía B5. (A) se infectaron células BSC-40 (a una MOI de 5) con cepas de tipo silvestre o VACV con una supresión de $F4L$ ($\Delta F4L$) o una cepa revertida $\Delta F4L$ en la que el gen $F4L$ se reintrodujo en el locus $F4L$ en un fondo de $\Delta F4L$ ($\Delta F4L^{REV}$). (B) Se infectaron células BSC-40 como en (A) con virus de tipo silvestre o una cepa de VACV con una supresión de $I4L$ ($\Delta I4L$). Se recogieron células en los tiempos indicados después de la infección y se prepararon extractos proteicos para transferencia de Western. Se usaron anticuerpos contra la proteína tardía de VACV B5, las proteínas víricas tempranas F4 e I4 o actina celular para transferencia en membranas de nitrocelulosa en paralelo. Los asteriscos indican lisados infectados de forma simulada recogidos después de 24 h.

Figura 12: perfil de expresión de proteínas RR celulares después de la infección con VACV. Se infectaron células HeLa con cepas de tipo silvestre, $\Delta F4L$ o $\Delta F4L^{REV}$ (revertida) (MOI de 5) o se infectaron de forma simulada (IS). Se prepararon extractos proteicos en los tiempos indicados después de la infección y se sometieron cantidades iguales de proteínas a SDS-PAGE seguido de Transferencia de Western (WB) para R1 humana (HR1), R2 humana (HR2) o p53R2 humano (Hp53R2). Las transferencias para actina celular y proteína I3 de VACV actuaron como controles de carga.

Figura 13: Coimmunoprecipitación de F4 marcado con His₆ con R1 humana (HR1). Se infectaron células HeLa con las cepas indicadas (MOI de 10) durante 8 h y después se sometieron los extractos proteicos a inmunoprecipitación (IP) con anticuerpos anti-His₆. Se muestran transferencias de Western (WB) de material IP y lisados totales. HC, cadena pesada. Obsérvese que VACV F4 es ~37 kDa mientras que Hp53R2 (control positivo para interacción de HR1) es ~43 kDa.

Figura 14: Propiedades de crecimiento de cepas recombinantes seleccionadas en células BSC-40. Las células se infectaron a una MOI de 0,03, se recogieron en los puntos temporales indicados, se congelaron y descongelaron tres veces, y se titularon en células BSC-40. Aunque los experimentos en (A) y (B) se realizaron en paralelo, se separan para mayor claridad y por lo tanto la curva de tipo silvestre es la misma en ambos gráficos. Los marcadores en superíndice encima de ciertas cepas de virus se refieren a si el locus $I4L$ se inactivó usando vectores basados en pDGloxPKO^{INV} (INV)- o pDGloxPKO^{DEL} (DEL)- o pZIPPY-NEO/GUS (pZippy). Un superíndice "REV" se refiere a un revertido de la cepa $\Delta F4L$. Todos los virus basados en pDGloxPKO pasaron por un procedimiento de purificación de placas de tres ciclos final en células U20S que expresaban Cre recombinasa. Los símbolos representan títulos medios determinados por triplicado y las barras de error representan DT. Algunas barras de error son de aproximadamente el mismo tamaño de los símbolos.

Tabla 1: Principales cepas de VACV usadas en este estudio.

Tabla 2: Susceptibilidad de las cepas de VACV mutantes para RR a cidofovir (CDV), hidroxurea (HU) y ácido fosfonoacético (APA).

Tabla 3: Conservación diferencial de genes de RR de *Chordopoxirinae*.

Tabla 4: Lista de tipos de cáncer que sobreexpresan proteínas RR.

Tabla 5: Lista de secuencias.

Descripción detallada

i. Definiciones

5 La expresión "gen funcionalmente inactivado" se refiere a un gen que comprende una o más mutaciones (p. ej., naturales o modificadas técnicamente), tales como una mutación puntual, una mutación negativa dominante y/o una mutación de supresión, por ejemplo que produce un mutante de supresión, en el que una función biológica de la proteína codificada por el gen, y/o una función biológica de cualquier complejo en el que participe la proteína, está inactivada, por ejemplo, reducida en al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 %, 10 al menos 95 % o más y/o está anulada por ejemplo totalmente inhibida en comparación con una molécula de tipo silvestre. La función biológica puede reducirse por diversos mecanismos, por ejemplo la secuencia codificante o el gen puede suprimirse completamente y/o parcialmente, anulando o reduciendo por ejemplo las funciones enzimáticas y/o estructurales de la proteína codificada, la proteína codificada puede actuar como un negativo dominante (tal como un mutante catalítico) y formar complejos inactivos y/o la proteína codificada puede estar 15 estructural y/o catalíticamente inactiva (p. ej., cuando el gen codifica una enzima). Además por ejemplo, el promotor de un gen tal como R2 puede suprimirse, inactivando la función de R2 inhibiendo su expresión. Por ejemplo, "gen de R2 funcionalmente inactivado" significa una secuencia codificante de R2 que codifica una proteína que tiene función biológica reducida, tal como actividad catalítica reducida, o que reduce la actividad catalítica de un complejo RR. La secuencia codificante de R2 puede mutarse por ejemplo suprimiendo o mutando una secuencia que codifica uno o 20 más restos catalíticamente importantes, suprimiendo una secuencia que codifica un dominio de unión a R1 u otra mutación que reduce los niveles de la proteína y/o actividad de R2. Un experto en la materia, basándose en la presente divulgación, sería capaz fácilmente, comparando con el tipo silvestre y/o un mutante descrito en el presente documento, de determinar si una mutación o supresión particular inactivó funcionalmente R2.

25 El término "trastorno neoplásico" como se usa en el presente documento se refiere a trastornos proliferativos y/o displásicos que incluyen, por ejemplo, cánceres de cualquier tipo y origen, así como estadios precursores de los mismos, incluyendo por ejemplo, cánceres, neoplasia, precáncer y/o tumor.

El término "cáncer" como se usa en el presente documento se refiere a un cáncer de cualquier tipo y origen 30 incluyendo células formadoras de tumores, cánceres sanguíneos y/o células transformadas.

La expresión "célula de trastorno neoplásico" se refiere a una o más células derivadas de o fenotípicamente similares a células de trastorno proliferativo y/o displásico tales como células cancerosas de cualquier tipo y origen así como estadios precursores de las mismas, incluyendo por ejemplo, células neoplásicas, células precancerosas 35 y/o células tumorales.

La expresión "célula cancerosa" incluye células formadoras de cáncer o tumor, células transformadas o una célula que es susceptible de convertirse en una célula formadora de cáncer o tumor.

40 La expresión "una célula" incluye una única célula así como una pluralidad o población de células. La administración de una composición a una célula incluye administraciones tanto *in vitro* como *in vivo*.

La expresión "poxvirus aislado" como se usa en el presente documento incluye pero sin limitación poxvirus de origen natural, seleccionados, tales como químicamente seleccionados, y recombinantes, que se han aislado, por ejemplo 45 purificado, por ejemplo por un método conocido por un experto en la materia. Un poxvirus aislado que comprende una R2 inactivada funcionalmente incluye por ejemplo poxvirus aislados que se han inactivado para R2 usando métodos recombinantes y/o variantes de origen natural y/o variantes aisladas bajo presión de selección o condiciones que dan como resultado mutaciones genómicas (p. ej., mutaciones inducidas químicamente o por irradiación) en las que el gen de R2 está funcionalmente inactivado.

50 La expresión "poxvirus recombinante" se refiere a un poxvirus modificado técnicamente, tal como un virus vaccinia modificado técnicamente para comprender una supresión que inactiva la actividad de un producto génico, que se genera *in vitro* generado usando tecnología de ADN recombinante y/o un poxvirus derivado de dicho poxvirus recombinado (p. ej., virus descendiente).

55 La expresión "oncolítico" como se usa en el presente documento se refiere a un virus replicativo selectivo para tumor que induce muerte celular en la célula y/o el tejido infectado. Aunque pueden infectarse células normales o no tumorales, las células tumorales se infectan y lisan selectivamente en comparación con las células normales o no tumorales. Por ejemplo, un poxvirus aislado es oncolítico si induce una muerte celular al menos 5 veces, al menos 6 60 veces, al menos 10 veces, al menos 15 veces o al menos 20 veces más en una población de células de trastorno neoplásico en comparación con células de control. Opcionalmente la actividad oncolítica del poxvirus es preferentemente oncolítica en células de trastorno neoplásico que sobreexpresan una subunidad de RR, opcionalmente R1 o R2.

65 La expresión "muerte celular" como se usa en el presente documento incluye todas las formas de muerte celular

incluyendo por ejemplo lisis celular y/o apoptosis. Se sabe que el virus vaccinia, por ejemplo, induce muerte celular por lisis celular y/o apoptosis. La muerte celular de una célula infectada por poxvirus y/o célula adyacente también puede denominarse por ejemplo eliminación de la célula por funciones del sistema inmunitario del hospedador.

- 5 El término "nivel" como se usa en el presente documento se refiere a una cantidad absoluta o relativa de un producto de transcripción, por ejemplo polipéptido o ARNm, o una actividad de dicho polipéptido, por ejemplo, un nivel de RR, tal como R1, se refiere al nivel o RR que es detectable o medible en una célula o tejido de un sujeto o una población de sujetos, opcionalmente de un sujeto o una población de sujetos que se sabe que tienen (p. ej., nivel de ensayo) o no tienen (p. ej., nivel de control) un trastorno neoplásico tal como un cáncer. El nivel puede ser un valor numérico
- 10 y/o intervalo y puede referirse a niveles de polipéptido, niveles de ácido nucleico o niveles de actividad. Cuando el nivel sea para una muestra de control, el nivel de control también puede referirse a un nivel de RR en célula o tejido no neoplásico y/o no canceroso, por ejemplo como se encuentra adyacente al tumor por ejemplo en una biopsia tumoral (p. ej., adyacente normal). Cuando el nivel es para una muestra de ensayo, el nivel de ensayo se refiere a un nivel de RR en una célula o un tejido neoplásico y/o canceroso. Por ejemplo, cuando se determina si un trastorno
- 15 neoplásico y/o cáncer tiene niveles de RR aumentados, el nivel de RR determinado usando una muestra de ensayo que comprende un trastorno neoplásico y/o una célula y/o un tejido canceroso (p. ej., nivel de ensayo), puede compararse con un nivel de RR en una muestra de control o un valor numérico correspondiente predeterminado (p. ej., nivel de control). Cuando el nivel de control es un valor o intervalo numérico, el valor o intervalo numérico es un valor o intervalo que corresponde a un nivel del nivel o intervalo de RR en una muestra de control o muestras de
- 20 control (p. ej., puede ser un nivel umbral o de punto en corte o un intervalo de control) y puede determinarse.

La expresión "nivel de expresión" como se usa en el presente documento se refiere a la cantidad absoluta o relativa del producto de transcripción y/o traducción de un gen descrito en el presente documento e incluye ARN y productos polipeptídicos. Un experto en la materia estará familiarizado con uno varios métodos que pueden usarse para

25 determinar los niveles de transcripción de ARN, tales como qRT-PCR y/o niveles de polipéptido tales como inmunohistoquímica y/o transferencia de Western.

La expresión "nivel aumentado" o "nivel elevado" como se usa en el presente documento en referencia a niveles de expresión de proteínas y/o ARNm de RR en una célula se refiere a cualquier aumento detectable en el nivel de

30 expresión medible de un producto de expresión de RR, como se mide por la cantidad de transcrito de ARN mensajero (ARNm) y/o la cantidad de polipéptido en una muestra en comparación con el nivel de expresión medible de un RR en una célula de control o comparadora del mismo tipo tisular. Por ejemplo, una célula cancerosa puede tener un nivel aumentado en comparación con una célula normal del mismo tipo tisular.

35 La expresión "tejido normal" como se usa en el presente documento se refiere a un tejido no neoplásico y/o tejido derivado de un sujeto que no tiene cáncer del tejido particular (p. ej., cuando el tejido es páncreas, puede obtenerse "tejido normal" de un sujeto que no tiene cáncer pancreático). La expresión "célula normal del mismo tipo tisular" como se usa en el presente documento se refiere a una célula o células derivadas de dicho tejido normal.

40 Como se usa en el presente documento, "inhibir" o "reducir" una función o actividad, tal como actividad y/o unión de RR, es cualquier reducción en la función o actividad en comparación con condiciones por lo demás iguales excepto por una condición o un parámetro de interés o, como alternativa, en comparación con otra condición.

El término "interacciona" o "interaccionar", por ejemplo con respecto a subunidades proteicas que forman un

45 complejo, se refiere a la unión física directa o indirecta de una subunidad con una o más subunidades adicionales. Por ejemplo, las subunidades de RR grandes y pequeñas pueden interaccionar para formar un complejo. La unión puede ser indirecta (p. ej., mediante un compañero de unión).

La expresión "cáncer resistente" o "cáncer resistente a quimioterapia" se refiere a un cáncer que tiene sensibilidad

50 reducida a uno o más fármacos quimioterapéuticos, por ejemplo amplificando un gen que permite que persista en presencia del fármaco, por ejemplo aumentando la expresión de RR.

La expresión "muestra" como se usa en el presente documento, por ejemplo para detectar niveles de RR o dNTPS, se refiere a cualquier muestra de fluido, celular o tisular de un sujeto que puede ensayarse con respecto a la

55 molécula de interés por ejemplo que comprende una célula o un tejido por ejemplo de un trastorno neoplásico que se trata. Por ejemplo, la muestra puede ser una biopsia del cáncer, o una muestra sanguínea para trastornos sanguíneos. Por ejemplo, si se están ensayando los niveles de polipéptido, la muestra comprende proteína. Si se ensaya una molécula de ácido nucleico, la muestra comprende ácido nucleico. Si se está determinando la actividad catalítica, la muestra se prepara convenientemente para permitir la detección de la actividad catalítica que se ensaya

60 de la manera con la que está familiarizado un experto en la materia.

La expresión "muestra de control" como se usa en el presente documento en el contexto de la determinación de los niveles de RR, se refiere a una muestra que comprende una célula o un tejido normal adecuado para determinar un nivel de RR, la célula o el tejido obtenido de un sujeto o una población de sujetos (p. ej., sujetos de control),

65 opcionalmente de un sujeto o una población de sujetos que se sabe que no tienen un trastorno neoplásico y/o

- cáncer, u opcionalmente obtenido de un sujeto con un trastorno neoplásico y/o cáncer en el que la muestra de control comprende tejido no neoplásico y/o no canceroso (p. ej., adyacente normal). Por ejemplo, la muestra de control puede compararse con una muestra del sujeto que comprende células tumorales, en el que la muestra de control es el mismo tipo de muestra que la muestra que comprende células tumorales (p. ej., tanto la muestra como el control son muestras de suero), o tanto la muestra como la muestra de control derivan del mismo tejido (p. ej., leucemia de linfocitos T en comparación con muestra de linfocitos T (control)). La muestra de control también puede comprender tejido normal adyacente, por ejemplo, comparando una muestra tumoral con un tejido de control normal adyacente.
- 10 Como se usa en el presente documento, "cadena principal del vector" se refiere a una molécula de ácido nucleico que se usa como un vehículo para suministrar una o más moléculas de ácido nucleico, tal como un gen de R2 mutante, a una célula, por ejemplo para permitir la recombinación. La cadena principal del vector puede referirse opcionalmente a la construcción plasmídica que se usa para generar el virus o a un genoma de virus (p. ej., el genoma de virus no recombinado). Opcionalmente, la cadena principal de vector se construye para permitir la
- 15 expresión de uno o más transgenes (p. ej., un casete de expresión) y la construcción (p. ej., cadena principal y transgén de vector) puede denominarse vector de expresión. Una cadena principal del vector en el que se han insertado uno o más ácidos nucleicos para transferir a una célula, se denomina una construcción de vector.

La expresión "construcción de vector aislado", como se usa en el presente documento se refiere a un ácido nucleico sustancialmente libre de material celular o medio de cultivo cuando se produce por ejemplo por técnicas de ADN recombinante.

La expresión "casete de detección" se usa para hacer referencia a un polinucleótido que dirige la expresión de una molécula que actúa como un marcador celular y que opcionalmente proporciona un modo de aislamiento de células que expresan dicho marcador. La molécula se usa opcionalmente para seleccionar células infectadas o transfectadas o para determinar la eficacia de la transducción o transfección celular. Las moléculas que son útiles como marcadores celulares o agentes de detección comprenden, por ejemplo, EGFP o derivados de la misma tales como YFP y RFP, HSA, GFP o derivados de la misma tales como YFP y RFP, GFP potenciada, mCherry, β -glucuronidasa, β -galactosidasa, luciferasa de luciérnaga o *Renilla*, etc. Un experto en la materia reconocerá que

25 pueden usarse de forma similar otras moléculas fluorescentes y no fluorescentes.

Se pretende que el término "anticuerpo" como se usa en el presente documento incluya anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales y anticuerpos quiméricos. El anticuerpo puede ser de fuentes recombinantes y/o producirse en animales transgénicos. Se pretende que la expresión "fragmento de anticuerpo", como se usa en el presente

35 documento, incluya Fab, Fab', F(ab')₂, scFv, dsFv, ds-scFv, dímeros, minicuerpos, diacuerpos y multímeros de los mismos y fragmentos de anticuerpos biespecíficos. Los anticuerpos pueden fragmentarse usando técnicas convencionales. Por ejemplo, pueden generarse fragmentos F(ab')₂ tratando el anticuerpo con pepsina. El fragmento F(ab')₂ resultante puede tratarse para reducir los enlaces disulfuro para producir fragmentos Fab'. La digestión con papaína puede conducir a la formación de fragmentos Fab, Fab' y F(ab')₂, scFv, dsFv, ds-scFv,

40 dímeros, minicuerpos, diacuerpos, fragmentos de anticuerpos biespecíficos y otros fragmentos también pueden sintetizarse por técnicas recombinantes. Se conocen bien en la técnica métodos para preparar anticuerpos.

La expresión "ácido nucleico" incluye ADN y ARN y puede ser bicatenario o monocatenario.

45 La expresión "ácido nucleico aislado", como se usa en el presente documento se refiere a un ácido nucleico sustancialmente libre de material celular o medio de cultivo cuando se produce por técnicas de ADN recombinante, o precursores químicos u otros productos químicos cuando se sintetiza químicamente. Un "ácido nucleico aislado" está también sustancialmente libre de secuencias que flanquean de forma natural el ácido nucleico (es decir secuencias localizadas en los extremos 5' y 3' del ácido nucleico) del que deriva el ácido nucleico. Se pretende que

50 la expresión "ácido nucleico" incluya ADN y ARN y puede ser bicatenario o monocatenario. Las secuencias de ácido nucleico contempladas por la presente solicitud incluyen secuencias de nucleótidos aisladas que hibridan con un producto de ARN de un biomarcador, secuencias de nucleótidos que son complementarias de un producto de ARN de un biomarcador de la presente solicitud, secuencias de nucleótidos que actúan como sondas o secuencias de nucleótidos que son conjuntos de cebadores específicos.

55 El término "cebador", como se usa en el presente documento se refiere a una secuencia de ácido nucleico, bien de origen natural como en un producto de digestión de restricción purificado o producida de forma sintética, que es capaz de actuar como un punto de síntesis cuando se coloca en condiciones en las que se induce la síntesis de un producto de extensión de cebador, que es complementario de una cadena de ácido nucleico (p. ej., en presencia de

60 nucleótidos y un agente inductor tal como ADN polimerasa y a una temperatura y pH adecuados). El cebador debe ser suficientemente largo para iniciar la síntesis del producto de extensión deseado en presencia del agente inductor. La longitud exacta del cebador dependerá de factores, incluyendo temperatura, secuencias del cebador y los métodos usados. Un cebador contiene típicamente 15-25 o más nucleótidos, aunque puede contener menos. Un experto en la materia conoce fácilmente los factores implicados en la determinación de la longitud apropiada del

65 cebador.

Los términos "R1" y "R2", como se usan en el presente documento se refieren a subunidades grandes y pequeñas de un complejo de ribonucleótido reductasa, respectivamente. "R1" y "R2" pueden referirse a las subunidades de ribonucleótido reductasa de, por ejemplo: mamíferos, incluyendo, pero sin limitación, seres humanos, y virus, incluyendo, pero sin limitación, poxvirus, tales como virus vaccinia. Los homodímeros de subunidades grandes y pequeñas interactúan para formar un complejo de ribonucleasa reductasa funcional. Los nombres alternativos para R1 incluyen, pero sin limitación, "I4L", "I4", "subunidad de RR grande", "subunidad grande", "M1" y "RRM1". Los nombres alternativos para R2 incluyen, pero sin limitación, "F4L", "F4" "subunidad de RR pequeña", "subunidad pequeña", "RRM2" y "M2". Puede hacerse referencia específicamente a especies adicionales, por ejemplo, R1 humana se indica como HR1 y R2 humana se indica como HR2. Además por ejemplo la proteína R1 vírica también se indica como I4 y el gen R1 vírico se indica como "I4L" o cuando se hace referencia a la cepa WR, VACV-WR-073. De forma similar, la proteína R2 vírica se denomina "F4" y el gen se denomina "F4L" o "VACV-WR-043" cuando se hace referencia a la cepa WR específicamente. Un experto en la materia estaría familiarizado con las diversas nomenclaturas usadas para genes de vaccinia. Por ejemplo, la nomenclatura "antigua", pero más común, para genes de vaccinia usa designaciones basadas en letras (es decir *E4L* e *I4L*), una nueva nomenclatura más reciente basada en el número de fase abierta de lectura (ORF) (desde el lado izquierdo de genoma al lado derecho) usa números para indicar el número de ORF del lado izquierdo (p. ej., *I4L* es la 73ª ORF desde el inicio del genoma).

El término "p53R2" como se usa en el presente documento se refiere a una subunidad R2 alternativa codificada en células de mamífero (p. ej., p53R2 de ratón; referencia de Genbank: Q6PEE3.1). El término "Hp53R2" como se usa en el presente documento se refiere a la forma humana de p53R2 (referencia de Genbank: BAD12267.1).

La expresión "RR celular" como se usa en el presente documento se refiere a las una o más subunidades de una proteína RR no vírica, por ejemplo una subunidad de RR humana. Se desvela en el presente documento, por ejemplo, que R1 de poxvirus puede interactuar (p. ej., unirse funcionalmente) con R2 celular (p. ej., de mamífero) para formar un complejo híbrido funcional.

La expresión "identidad de secuencia" como se usa en el presente documento se refiere al porcentaje de identidad de secuencia entre dos secuencias polipeptídicas o dos secuencias de ácido nucleico. Para determinar el porcentaje de identidad de dos secuencias de aminoácidos o de dos secuencias de ácido nucleico, las secuencias se alinean para fines de comparación óptima (p. ej., pueden introducirse huecos en la secuencia de una primera secuencia de aminoácidos o ácido nucleico para alineamiento óptimo con una segunda secuencia de aminoácidos o ácido nucleico). Los restos de aminoácidos o nucleótidos en posiciones de aminoácidos correspondientes o posiciones de nucleótidos se comparan después. Cuando una posición de la primera secuencia está ocupada por el mismo resto de aminoácido o nucleótido que la posición correspondiente en la segunda secuencia, entonces las moléculas son idénticas en esa posición. El porcentaje de identidad entre las dos secuencias está en función del número de posiciones idénticas compartido por las secuencias (es decir, % de identidad=número de posiciones solapantes idénticas/número total de posiciones x 100 %). En una realización, las dos secuencias tienen la misma longitud. La determinación del porcentaje de identidad entre las dos secuencias también puede conseguirse usando un algoritmo matemático. Un ejemplo no limitante, preferido, de un algoritmo matemático utilizado para la comparación de dos secuencias es el algoritmo de Karlin y Altschul, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87:2264-2268, modificado como en Karlin y Altschul, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90:5873-5877. Dicho algoritmo se incorpora en los programas NBLAST y XBLAST de Altschul *et al.*, 1990, J. Mol. Biol. 215:403. Pueden realizarse búsquedas de nucleótidos BLAST con los parámetros de programa de nucleótidos NBLAST ajustados, por ejemplo, para puntuación=100, longitud de palabra=12 para obtener secuencias de nucleótidos homólogas de una molécula de ácido nucleico de la presente solicitud. Pueden realizarse búsquedas de proteínas BLAST con los parámetros de programa XBLAST ajustados, por ejemplo, a puntuación=50, longitud de palabra=3 para obtener secuencias de aminoácidos homólogas de una molécula proteica de la presente solicitud. Para obtener alineamientos con huecos para fines de comparación, puede utilizarse BLAST con Huecos como se describe en Altschul *et al.*, 1997, Nucleic Acids Res. 25:3389-3402. Como alternativa, puede usarse PSI-BLAST para realizar una búsqueda por iteraciones que detecta relaciones distantes entre moléculas (misma referencia). Cuando se utilizan programas BLAST, BLAST con Huecos y PSI-Blast, pueden usarse los parámetros por defecto de los programas respectivos (p. ej., de XBLAST y NBLAST) (véase, por ejemplo, el sitio web del NCBI). El porcentaje de identidad entre dos secuencias puede determinarse usando técnicas similares a las descritas anteriormente, permitiendo o no huecos. Al calcular el porcentaje de identidad, típicamente se cuentan solamente las coincidencias exactas.

Una "sustitución de aminoácidos conservativa" como se usa en el presente documento, es una en la que un resto de aminoácido se reemplaza con otro resto de aminoácido sin anular las propiedades deseadas de la proteína. Se conocen en la técnica sustituciones de aminoácidos conservativas. Por ejemplo, las sustituciones conservativas incluyen sustituir un aminoácido en uno de los siguientes grupos por otro aminoácido en el mismo grupo: alanina (A), serina (S) y treonina (T); ácido aspártico (D) y ácido glutámico (E); asparagina (N) y glutamina (Q); arginina (R) y lisina (L); isoleucina (I), leucina (L), metionina (M), valina (V); y fenilalanina (F), tirosina (Y) y triptófano (W).

El término "híbrido" se refiere a la interacción de unión no covalente específica de secuencia con un ácido nucleico complementario.

65

Por "condiciones de hibridación al menos moderadamente rigurosas" se entiende que se seleccionan condiciones que promueven la hibridación selectiva entre dos moléculas de ácido nucleico complementarias en solución. Puede producirse hibridación de toda o una parte de una molécula de la secuencia de ácido nucleico. La parte de hibridación es típicamente de al menos 15 (p. ej., 20, 25, 30, 40 o 50) nucleótidos de longitud. Los expertos en la materia reconocerán que la estabilidad de una doble cadena de ácido nucleico, o híbridos, se determina por la T_m , que en tampones que contienen sodio está en función de la concentración de ion sodio y temperatura ($T_m = 81,5\text{ °C} - 16,6 (\text{Log}_{10} [\text{Na}^+]) + 0,41 (\% (\text{G} + \text{C}) - 600/\text{l})$, o una ecuación similar). En consecuencia, los parámetros en las condiciones de lavado que determinan la estabilidad híbrida son concentración de ion sodio y temperatura. Para identificar moléculas que sean similares, pero no idénticas, a una molécula de ácido nucleico conocida puede suponerse que un desapareamiento del 1 % da como resultado una reducción de aproximadamente 1 °C en la T_m , por ejemplo si se buscan moléculas de ácido nucleico que tengan una identidad >95 %, la temperatura de lavado final se reducirá en aproximadamente 5 °C. Basándose en estas consideraciones, los expertos en la materia podrán seleccionar fácilmente condiciones de hibridación apropiadas. En realizaciones preferidas, se seleccionan condiciones de hibridación rigurosas. Como ejemplo, pueden emplearse las siguientes condiciones para conseguir hibridación rigurosa: hibridación a cloruro sódico/citrato sódico (SSC) 5x/solución de Denhardt 5x/SDS 1,0 % a $T_m - 5\text{ °C}$ basándose en la ecuación anterior, seguido de un lavado de SSC 0,2x/SDS 0,1 % a 60 °C. Las condiciones de hibridación moderadamente rigurosas incluyen una etapa de lavado en SSC 3x a 42 °C. Se entiende, sin embargo, que pueden conseguirse rigurosidades equivalentes usando tampones, sales y temperaturas alternativos. Puede encontrarse orientación adicional con respecto a condiciones de hibridación en: *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley y Sons, N.Y., 2002, y en Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

El término "tratar" o "tratamiento" como se usa en el presente documento y como se entiende bien en la técnica, significa un enfoque para obtener resultados beneficiosos o deseados, incluyendo resultados clínicos. Los resultados beneficiosos o deseados pueden incluir, pero sin limitación, alivio o mejora de uno o más síntomas o afecciones, reducción del alcance de la enfermedad, estado estabilizado (es decir, sin empeoramiento) de la enfermedad, prevención de la propagación de la enfermedad, retardo o ralentización de la progresión de la enfermedad, alivio o paliación de la patología, disminución de la reaparición de la enfermedad y remisión (bien parcial o bien total), bien detectable o bien indetectable. "Tratar" y "Tratamiento" también significan prolongar la supervivencia en comparación con la supervivencia esperada si no se recibe tratamiento. "Tratar" y "Tratamiento", como se usan en el presente documento también incluyen tratamiento profiláctico. Por ejemplo, un sujeto con trastorno neoplásico en estadio temprano con niveles de RR aumentados puede tratarse para evitar la progresión o como alternativa un sujeto en remisión puede tratarse con un poxvirus aislado recombinante o una composición descrita en el presente documento para evitar la reaparición. Los métodos de tratamiento comprenden administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más poxvirus aislados o recombinantes o composiciones descritos en la presente solicitud y opcionalmente consisten en una única administración, o como alternativa comprenden una serie de aplicaciones. Por ejemplo, los virus aislados y/o recombinantes y composiciones descritos en el presente documento pueden administrarse al menos una vez a la semana, de aproximadamente una vez a la semana a aproximadamente una vez al día para un tratamiento dado o los poxvirus aislados o recombinantes y/o composiciones descritos en el presente documento pueden administrarse dos veces al día. Como otro ejemplo, el poxvirus aislado o recombinante se administra solamente una vez, o por ejemplo cada 3 semanas durante 4 ciclos. La duración del periodo de tratamiento depende de una diversidad de factores, tales como la gravedad de la enfermedad, la edad del paciente, la concentración, actividad de los poxvirus aislados o recombinantes y/o composiciones descritos en el presente documento y/o una combinación de los mismos. También se apreciará que la dosificación eficaz usada para el tratamiento o la profilaxis puede aumentar o reducirse a lo largo del transcurso de un régimen de tratamiento o profilaxis particular. Los cambios en la dosificación pueden dar como resultado y resultar evidentes por ensayos de diagnóstico convencionales conocidos en la técnica. En algunos casos, puede requerirse administración crónica.

La dosificación administrada variará dependiendo del uso y factores conocidos tales como las características farmacodinámicas de la sustancia particular, su modo y vía de administración, la edad, la salud y el peso del receptor individual, la naturaleza y el alcance de los síntomas, el tipo de tratamiento simultaneo, la frecuencia del tratamiento y el efecto deseado. El régimen de dosificación puede ajustarse para proporcionar la respuesta terapéutica óptima.

El término "sujeto" como se usa en el presente documento incluye todos los miembros del reino animal incluyendo mamíferos, y convenientemente se refiere a seres humanos.

Como se usa en el presente documento, "administración contemporánea" y "administrado de forma contemporánea" significa que dos sustancias se administran a un sujeto de modo que ambas estén biológicamente activas en el sujeto al mismo tiempo. Los detalles exactos de la administración dependerán de la farmacocinética de las dos sustancias en presencia de la otra, y pueden incluir administración de una sustancia en un intervalo de 24 horas de la administración de la otra, si las farmacocinéticas son adecuadas. Los diseños de regímenes de dosificación adecuados son rutinarios para los expertos en la materia. En realizaciones particulares, dos sustancias se administrarán sustancialmente de forma simultánea, es decir en un periodo de minutos entre sí, o en una

composición individual que comprende ambas sustancias.

Como se usa en el presente documento, la expresión "cantidad eficaz" o "cantidad terapéuticamente eficaz" significa una cantidad eficaz, a dosificaciones y durante periodos de tiempo necesarios para conseguir el resultado deseado.

5 Por ejemplo en el contexto o el tratamiento de un trastorno neoplásico, una cantidad eficaz es una cantidad que por ejemplo induce remisión, reduce la carga tumoral y/o previene la propagación o el crecimiento tumoral en comparación con la respuesta obtenida sin la administración de los poxvirus aislados o recombinantes y/o composiciones descritas en el presente documento. Las cantidades eficaces pueden variar de acuerdo con factores tales como la patología, la edad, el sexo, el peso del sujeto. La cantidad de un poxvirus aislado o recombinante y/o

10 composición dados descritos en el presente documento que corresponderán a dicha cantidad variará dependiendo de diversos factores, tales como el poxvirus aislado o recombinante y/o la composición descritos en el presente documento, la formulación farmacéutica, la vía de administración, el tipo de enfermedad o trastorno, la identidad del sujeto u hospedador que se trate y similares, pero puede determinarse no obstante de forma rutinaria por un experto en la materia.

15 En el entendimiento del alcance de la presente divulgación, se pretende que la expresión "que comprende" y sus derivados, como se usan en el presente documento, sean expresiones abiertas que especifiquen la presencia de las características, los elementos, los componentes, los grupos, los números enteros y/o las etapas indicados, pero no excluyen la presencia de otras características, elementos, componentes, grupos, números enteros y/o etapas no

20 indicados. Lo anterior también se aplica a palabras que tengan significados similares tales como las expresiones "que incluye", "que tiene" y sus derivados. Finalmente, los términos de grado tales como "sustancialmente", "alrededor de" y "aproximadamente" como se usan en el presente documento significan una cantidad razonable de desviación del término modificado de modo que el resultado final no cambie significativamente. Estos términos de grado deberían interpretarse como incluyentes de una desviación de al menos $\pm 5\%$ del término modificado si esta

25 desviación no negara el significado de la palabra que modifica.

Como se usa en la presente memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un" y "el" incluyen referencias plurales a menos que el contenido claramente indique otra cosa. Por lo tanto, por ejemplo, una composición que contiene "un virus" incluye una mezcla de dos o más virus. También debería observarse que el

30 término "o" se emplea de forma general en su sentido que incluye "y/o" a no ser que el contenido claramente indique otra cosa.

Se pretende que las definiciones y las realizaciones descritas en secciones particulares sean aplicables a otras realizaciones descritas en el presente documento para las que son adecuadas como entendería un experto en la

35 materia.

ii. Virus, Vectores, Anticuerpos y Composiciones

La divulgación se refiere a poxvirus con mutaciones de la subunidad de RR pequeña, por ejemplo en cepas de virus vaccinia (VACV), y métodos de uso de estos virus. Estas cepas mutantes muestran una capacidad alterada de replicación, sin embargo, la replicación se rescata (bien completamente o bien en parte) en células que sobreexpresan subunidades de RR celulares, tales como células cancerosas con niveles de RR aumentados.

40

Se ha descubierto que las subunidades de RR celulares se coinmunoprecipitan con F4 de VACV en presencia o

45 ausencia de. Además, la divulgación proporciona estudios de inmunofluorescencia que indican que se encuentran subunidades de RR víricas por todo el citoplasma de células infectadas, posicionándolas bien para interactuar con subunidades de RR celulares que también tienen una localización exclusivamente citoplasmática. Sin desear quedar ligados a la teoría, se cree que la producción de estos complejos de RR de hospedador/virus puede ayudar a rescatar defectos de replicación en presencia o ausencia de I4 (subunidad de RR grande también denominada R1).

50 La divulgación posibilita que los poxvirus requieran al menos una subunidad de RR pequeña para su replicación apropiada bien para proporcionar dNTP requeridos o bien debido a alguna otra función, desconocida, de estas proteínas.

En consecuencia en un aspecto, la divulgación proporciona un poxvirus aislado que comprende un gen de R2

55 funcionalmente inactivado que comprende una mutación negativa dominante, una mutación puntual o una mutación de supresión, en el que la proteína codificada por el gen de R2 funcionalmente inactivo es capaz de interactuar con subunidades de ribonucleótido reductasa (RR) celulares. En otra realización, la divulgación proporciona un poxvirus recombinante que comprende un gen de R2 funcionalmente inactivado que comprende una mutación negativa dominante, una mutación puntual o una mutación de supresión, en el que la proteína codificada por el gen

60 de R2 funcionalmente inactivo es capaz de interactuar con subunidades de ribonucleótido reductasa (RR) celulares.

Se demuestra en el presente documento que virus con una supresión del gen de R2 o una mutación puntual en R2 que actúa como un negativo dominante e inhibe la función enzimática de RR, son oncolíticos y útiles para

65 tratamiento de trastornos neoplásicos. Es predecible que otras mutaciones en R2 que interfieren con y/o anulan la

actividad de RR en comparación con el tipo silvestre, por ejemplo, mutantes de R2 que son catalíticamente inactivos, preferentemente que comprenden supresiones de al menos un resto catalíticamente importante, tales como los ilustrados en la Figura 1B y opcionalmente que forman complejo con otras subunidades de RR que interfieren con la actividad de RR (p. ej., mutantes negativos dominantes), o mutantes de R2 que tienen una supresión de todo o parte del dominio de unión a R1, son útiles en los métodos desvelados en el presente documento. En consecuencia en una realización, el gen de R2 funcionalmente inactivado comprende una mutación negativa dominante, una mutación puntual o una mutación de supresión, en el que la proteína codificada por R2 del mutante de supresión carece de al menos 2 aminoácidos. En otra realización, la proteína codificada por el gen de R2 funcionalmente inactivo forma complejos con subunidades de RR celulares cuando se expresa en una célula. En una realización adicional, el mutante de supresión carece de al menos 5, al menos 7, al menos 10, al menos 20, al menos 30, al menos 35, al menos 40, al menos 50, al menos 60, al menos 70, al menos 80, al menos 100, al menos 110, al menos 120, al menos 130, al menos 140, al menos 150, al menos 160, al menos 170, al menos 180, al menos 181, al menos 190, al menos 200, al menos 210, al menos 220, al menos 230, al menos 240, al menos 250, al menos 260, al menos 270, al menos 280, al menos 290, al menos 300, al menos 310 o al menos 320 restos de aminoácidos. En otra realización, los aminoácidos suprimidos comprenden la supresión de al menos un resto catalíticamente importante y/o el sitio de unión a R1, por ejemplo como se proporciona en la Figura 1B. En una realización, el virus aislado o recombinante en el que el R2 funcionalmente inactivado comprende una mutación Y300 tal como una mutación Y300F, y/o cualquier mutación de uno o más de los siguientes restos que provoca pérdida o reducción de la actividad catalítica: W34, E38, D70, E101, H104, y 108, F167, F171, G181, 1193, D196, E197, H200, Y254 y E294. En una realización, los aminoácidos suprimidos comprenden parte o todo el dominio de unión a R1, reduciendo la unión con R1 en, por ejemplo, al menos 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o más.

El grupo de poxvirus que se espera que sean útiles incluye por ejemplo poxvirus que son capaces de infectar células de mamífero, particularmente células humanas y que en su forma de tipo silvestre expresan un gen de R2. En consecuencia en una realización, el poxvirus de tipo silvestre comprende un gen R2 y es infeccioso para células de mamífero. En una realización, el poxvirus es infeccioso para células humanas. El género de Poxvirus, que comprende un gen R2 y que son infecciosos para células de mamífero incluyen por ejemplo géneros enumerados en la Tabla 3, tales como Orthopoxvirus tales como virus Vaccinia, Leporipoxvirus y Yatapoxvirus. En consecuencia en una realización, el poxvirus se selecciona de Orthopoxvirus tales como virus Vaccinia, Leporipoxvirus y Yatapoxvirus. En una realización, el poxvirus se selecciona de un género en la Tabla 3, opcionalmente un Orthopoxvirus, un Leporipoxvirus, un Suipoxvirus, un Capripoxvirus, un Cervidpoxvirus, un Avipoxvirus, un Moluscipoxvirus, un Parapoxvirus y un Yatapoxvirus. En otra realización, el poxvirus no está clasificado, por ejemplo, es un poxvirus de cocodrilo (CRV). En una realización, la especie de poxvirus es una especie enumerada en la Tabla 3, tal como poxvirus de caballo (HSPV), taterapoxvirus (TATV), virus variola (VARV), poxvirus porcino (SPXV), etc.

Los virus vaccinia, por ejemplo, son útiles como agentes oncolíticos. Los virus vaccinia, así como muchos otros Orthopoxvirus (p. ej. ECTV), tienen un ciclo de vida rápido y eficaz, formando viriones maduros en unas 6 h y el virus vaccinia se propaga eficazmente de célula a célula aumentando de este modo la eficacia de una infección *in vivo*. Los virus vaccinia pueden infectar una amplia serie de tejidos humanos y existe un gran conjunto de conocimiento acerca de su biología y experiencia extensiva con él clínicamente como parte del programa de vacunación de viruela. En consecuencia, en una realización preferida, el poxvirus es un virus vaccinia.

Los experimentos desvelados en el presente documento se han realizado en una cepa adaptada de laboratorio de virus vaccinia. Un experto en la materia conoce varias cepas clínicas y adaptadas en laboratorio. Para aplicaciones humanas, es útil un virus de uso clínico. En consecuencia en una realización, el poxvirus aislado o recombinante es un virus de uso clínico. En una realización, la cepa de virus vaccinia es WR, Tian Tian, NYCBH, Wyeth, Copenhagen, Lister, MVA, Lederle, Temple of Heaven, Tashkent, USSR, Evans, Praha, LIVP, Ikeda, IHD, Dis, LC16, EM-63, IC, Malbran, DUKE, Acambis, 3737, CVA y AS. En una realización, la cepa es NYCBH a condición de que el gen de R2 funcionalmente inactivado no codifique un gen de R2 suprimido para 180 pb. En otra realización la cepa es Wyeth a condición de que el R2 funcionalmente inactivado no codifique un R2 con una supresión de 180 pb. En una realización, el virus vaccinia aislado o recombinante comprende un R2 funcionalmente inactivado que tiene una supresión de al menos 2, al menos 5, al menos 10, al menos 20, al menos 30, al menos 35, al menos 40, al menos 50, al menos 60, al menos 61, al menos 70, al menos 80, al menos 90, al menos 100, al menos 110, al menos 120, al menos 130, al menos 140, al menos 150, al menos 160, al menos 170, al menos 180, al menos 190, al menos 200, al menos 210, al menos 220, al menos 230, al menos 240, al menos 250, al menos 260, al menos 270, al menos 280, al menos 290, al menos 300, al menos 310, al menos 320 restos de aminoácidos de SEQ ID NO: 1. En otra realización, el poxvirus y/o virus vaccinia aislado o recombinante comprende un R2 funcionalmente inactivado con supresión de al menos 2, al menos 5, al menos 10, al menos 20, al menos 30, al menos 35, al menos 40, al menos 50, al menos 60, al menos 61, al menos 70, al menos 80, al menos 90, al menos 100, al menos 110, al menos 120, al menos 130, al menos 140, al menos 150, al menos 160, al menos 170, al menos 180, al menos 190, al menos 200, al menos 210, al menos 220, al menos 230, al menos 240, al menos 250, al menos 260, al menos 270, al menos 280, al menos 290, al menos 300, al menos 310, al menos 320 restos de aminoácidos, en el que el R2 es al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95, al menos 98 %, al menos 99 % o más idéntico a SEQ ID NO: 1. En una realización, el mutante de supresión de R2 comprende supresión de al menos 310 restos de

aminoácidos. En otro ejemplo, el mutante de supresión de R2 comprende supresión de los restos de aminoácidos 1 a 310.

La supresión también puede describirse con respecto a posiciones de nucleótidos. Por ejemplo, una supresión de al menos 30 restos de aminoácidos de R2 corresponde a una supresión de al menos 90 nucleótidos. La supresión también puede describirse en referencia a posiciones genómicas específicas para una cepa particular, por ejemplo cepa WR. Un experto habitual en la materia sería capaz fácilmente de determinar las posiciones correspondientes en otras cepas. En consecuencia en un ejemplo, se suprimen nucleótidos correspondientes a los nucleótidos 33948-32987 del genoma de WR. La secuencia de nucleótidos de WR se proporciona por ejemplo en el número de referencia de Genbank NC-006998.

También se desvela en el presente documento que pueden combinarse inactivaciones funcionales adicionales, por ejemplo supresiones o mutaciones génicas, de otros genes de poxvirus tales como R1 y timidina quinasa (también denominado TK o J2R) con el R2. En consecuencia en una realización, el virus comprende además un gen de R1 funcionalmente inactivado, gen de timidina quinasa y/o gen de factor de crecimiento de virus vaccinia. Las mutaciones que incluyen mutaciones puntuales, mutaciones negativas dominantes y supresiones que afectan a los niveles de actividad o de expresión son útiles con los presentes métodos. En un ejemplo, el gen de R1 funcionalmente inactivado comprende una supresión de nucleótidos 61929-64240 en el genoma de WR de vaccinia que suprime los aminoácidos 1-771 de 14. En otro ejemplo, el gen J2R funcionalmente inactivado comprende una alteración en la ORF de J2R de modo que se produzca una inserción entre los nucleótidos 81001 y 81002 en el genoma de WR que provoca una alteración entre el aminoácido 92 y 93 de modo que solamente se expresan los primeros 92 restos de J2.

El virus aislado o recombinante preferentemente se replica en células de trastorno neoplásico, por ejemplo células de trastorno neoplásico con niveles de RR aumentados. Se ha demostrado que las células cancerosas amplifican genes de la subunidades de RR y pueden hacerse resistentes a productos quimioterapéuticos, particularmente a fármacos que se dirigen a la actividad de RR tales como hidroxurea y gemcitabina. Los poxvirus desvelados, como demuestran los resultados del presente documento, replicarían con eficacia aumentada en células con niveles de RR celulares aumentados. En otra realización, el poxvirus aislado o recombinante es oncolítico.

En otro aspecto, la solicitud proporciona una composición que comprende el virus aislado o recombinante desvelado en el presente documento, y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. El diluyente o vehículo comprende solución salina tamponada con fosfato. En otra realización, la composición comprende un producto quimioterapéutico útil para tratar trastornos neoplásicos con niveles de RR aumentados. En otro ejemplo, la composición comprende además hidroxurea, gemcitabina y/o un análogo de nucleósido.

En un aspecto adicional, la divulgación proporciona un vector para generar un poxvirus con un R2 funcionalmente inactivado que comprende:

- 40 una cadena principal de vector;
- un ácido nucleico 5' que comprende una secuencia flanqueante 5' de un gen de R2 genómico;
- un casete de intercambio unido operativamente con un promotor, tal como un casete de gen NEO y/o un gen de gusA (promotor H5) o un gen de R2 mutante y que codifica una proteína que carece de al menos 2 aminoácidos del dominio grande de unión a ribonucleótido reductasa (R1), o una proteína que comprende una mutación Y300;
- 45 y un ácido nucleico 3' que comprende secuencia flanqueante 3' del gen de R2 genómico,

en el que el ácido nucleico 5' está cadena arriba del casete de intercambio y el ácido nucleico 3' está cadena abajo del casete de intercambio. En una realización, la distancia entre el inicio del ácido nucleico 5' y el final del ácido nucleico 3' es mayor de o menor de 180 nucleótidos.

50 En un ejemplo, la cadena principal del vector es pZIPPY-NEO/GUS. Un experto habitual en la materia reconocerá que también serían útiles otras cadenas principales de vectores útiles como vectores de dirección que comprenden por ejemplo tecnología de recombinación de sitio Cre-loxP.

55 Un aspecto adicional se refiere a un anticuerpo generado usando antígeno R2 de virus ectromelia que detecta antígeno R2 de virus ectromelia y F4 de virus vaccinia. En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. En otra realización, el anticuerpo es un anticuerpo policlonal. Se conocen en la técnica y se desvelan en el presente documento métodos para preparar anticuerpos policlonales y monoclonales.

60 Se proporcionan en otro aspecto composiciones que comprenden el anticuerpo y un diluyente o vehículo, tal como un BSA opcionalmente en solución para estabilizar el anticuerpo. También se proporcionan composiciones que comprenden las construcciones de vector descritas en el presente documento con un diluyente o vehículo adecuado.

iii. Métodos

- Se desvelan en el presente documento poxvirus que comprenden genes de R2 funcionalmente inactivados. Estos virus son útiles como agentes oncolíticos para inducir muerte celular en una célula de trastorno neoplásico y/o para uso en el tratamiento de trastornos neoplásicos. En consecuencia en un aspecto la divulgación proporciona un método para inducir muerte en una célula de trastorno neoplásico, comprendiendo el método poner en contacto las células con un virus aislado o recombinante o composición descrito en el presente documento. En una realización, la célula está *in vivo*.
- 10 En otra realización, la divulgación proporciona un método para tratar un trastorno neoplásico que comprende administrar una cantidad eficaz del virus aislado o la composición descrito en el presente documento. En una realización, el virus aislado es un virus recombinante. En ciertas realizaciones, el virus aislado o recombinante descrito en el presente documento es oncolítico. En una realización, el virus aislado es un virus descrito en el presente documento. En una realización, el virus aislado es un virus descrito en la Tabla 1, 2 o 3.
- 15 Los virus aislados o recombinantes son útiles para tratar una diversidad de trastornos neoplásicos. En una realización, el trastorno neoplásico es cáncer. Se ha mostrado que varios cánceres tienen niveles de RR aumentados y/o se tratan con productos quimioterapéuticos que se dirigen a RR. En una realización, el cáncer se selecciona de cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer hepático tal como carcinoma hepatocelular, cáncer pancreático, cáncer cutáneo tal como melanoma, cáncer esofágico, leucemia, cáncer ovárico, cáncer de cabeza y cuello, gliomas y cáncer gástrico.
- 20 Hidroxiurea y gemcitabina son productos quimioterapéuticos que se dirigen a RR. En consecuencia, en una realización, la célula cancerosa o el cáncer es resistente a hidroxiurea y/o gemcitabina. El uso de productos quimioterapéuticos tales como hidroxiurea y gemcitabina puede inducir resistencia. En consecuencia, en una realización, el cáncer es un cáncer resistente, tal como un cáncer resistente a HU y/o gemcitabina. En otra realización, el cáncer resistente es resistente a hidroxiurea y/o gemcitabina.
- 30 Los trastornos neoplásicos, por ejemplo cánceres, pueden tener niveles de RR aumentados como se ha mencionado. En consecuencia en una realización, la célula cancerosa o el cáncer comprende niveles aumentados de ribonucleótido reductasa en comparación con una célula normal del mismo tipo tisular.
- Los niveles de RR aumentados pueden reflejarse en niveles aumentados de proteínas, ARN y/o actividad. Por ejemplo, la expresión de RR aumentada se ha correlacionado directamente con la actividad de RR aumentada (9).
- 35 En una realización, el nivel de ribonucleótido reductasa se evalúa determinando el nivel de actividad de la ribonucleótido reductasa (p. ej., una o más subunidades, tales como R2), el nivel de proteínas de la ribonucleótido reductasa, el nivel de ARN de la ribonucleótido reductasa o los niveles de dNTP, en los que un aumento en el nivel de actividad, proteína o ARN de ribonucleótido reductasa o un aumento en los niveles de dNTPS es indicativo de que la célula cancerosa o el cáncer tiene niveles aumentados de ribonucleótido reductasa. Un experto habitual en la materia reconocerá que se pueden usarse varios métodos, tales como métodos desvelados en el presente documento para evaluar el nivel de RR, incluyendo por ejemplo inmunoensayos para niveles de proteínas, RT-PCR cuantitativa para niveles de ARN y ensayos enzimáticos o de unión para niveles de actividad o análisis cuantitativo automático.
- 40 El aumento del nivel de ribonucleótido reductasa (p. ej., de una subunidad tal como R2, o nivel catalítico complejo) es, en una realización, al menos 10 %, al menos 20 %, al menos 30 %, al menos 40 % al menos el 50 %, al menos 60 %, al menos 70 % al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 100 % o más de 100 % mayor en comparación con una célula normal del mismo tipo tisular. En otra realización, el aumento del nivel de ribonucleótido reductasa (p. ej., de RR celular) es al menos aproximadamente 2 veces, al menos aproximadamente 3 veces, al menos aproximadamente 4 veces, al menos aproximadamente 5 veces, al menos aproximadamente 6 veces, al menos aproximadamente 7 veces, al menos aproximadamente 8 veces, al menos aproximadamente 9 veces, al menos aproximadamente 10 veces, al menos aproximadamente 15 veces, al menos aproximadamente 20 veces o más. El aumento puede ser por ejemplo un aumento en los niveles de proteína, ARN y/o actividad.
- 45 En ciertas realizaciones, el sujeto se evalúa en primer lugar con respecto a niveles de RR de trastorno neoplásico. En consecuencia, en una realización, el método comprende determinar el nivel de RR en la célula cancerosa o una muestra del sujeto que comprende células cancerosas antes de la administración del virus aislado o recombinante descrito en el presente documento.
- 50 En una realización, el sujeto también se trata con otra terapia indicada. Por ejemplo, en una realización, también se administra al sujeto un producto quimioterapéutico. Como se ha mencionado, la hidroxiurea es un producto quimioterapéutico usado para tratar una amplia diversidad de cánceres, incluyendo cánceres con niveles de RR aumentados. En una realización, también se administra al sujeto hidroxiurea en el que la hidroxiurea se administra antes de, contemporáneamente con, o después de la administración del virus aislado o recombinante o la composición de la divulgación.
- 55
- 60
- 65

En otra realización, en la que también se administra al sujeto un análogo de nucleósido, en el que el análogo de nucleósido se administra antes de, contemporáneamente con o después de la administración del virus aislado o recombinante o la composición de la divulgación. En una realización, el análogo de nucleósido es cidofovir (CDV). CDV es un compuesto antivírico usado para tratar infecciones clínicas por poxvirus en situaciones de emergencia.

- 5 Se ha mostrado que CDV es eficaz en la destrucción de células cancerosas. Por ejemplo, CDV puede usarse si se considera que la replicación del virus oncolítico es perjudicial para el paciente y el virus ha tenido que eliminarse. Como se ha mostrado en el presente documento, los virus mutantes son hipersensibles a CDV y por lo tanto serían altamente susceptibles a dicho tratamiento.
- 10 En otra realización, también se administra al sujeto gemcitabina en la que la gemcitabina se administra antes de, contemporáneamente con o después de la administración del virus o la composición aislado o recombinante desvelado en el presente documento.

- En una realización, la terapia de combinación se administra de forma contemporánea. En otra realización, la terapia de combinación se administra en un tratamiento de dos etapas, o de tipo consecutivo. En una realización, el fármaco, por ejemplo el producto quimioterapéutico, se administra en primer lugar, y el poxvirus aislado o recombinante desvelado en el presente documento se administra posteriormente por ejemplo para destruir cualquier célula resistente o residual, por ejemplo tumor residual o células cancerosas resistentes.
- 15

- 20 En otra realización, el método comprende además detectar la presencia del poxvirus aislado o recombinante administrado, por ejemplo el virus vaccinia administrado en la célula de trastorno neoplásico y/o en una muestra de un sujeto al que se ha administrado un virus aislado o recombinante o una composición descrito en el presente documento. Por ejemplo, el sujeto puede ensayarse antes de la administración y/o después de la administración del poxvirus aislado o recombinante o la composición descrito en el presente documento para evaluar por ejemplo la progresión de la infección. En una realización, el poxvirus aislado o recombinante de la divulgación comprende un casete de detección y detectar la presencia del poxvirus aislado o recombinante aislado administrado comprende detectar la proteína codificada por el casete de detección. Por ejemplo, cuando el casete de detección codifica una proteína fluorescente, se capturan imágenes del sujeto o la muestra usando un método de visualización de fluorescencia.
- 25

- 30 Un aspecto adicional incluye el uso de un virus aislado o recombinante o una composición descrita en el presente documento para inducir la muerte en una célula de trastorno neoplásico tal como una célula cancerosa o para tratar un trastorno neoplásico tal como cáncer.

- 35 Un aspecto adicional incluye un poxvirus aislado que comprende un gen de R2 funcionalmente inactivado o una composición que comprende el poxvirus aislado para su uso en la inducción de muerte en una célula de trastorno neoplásico y/o para su uso en el tratamiento de un trastorno neoplásico.

Los siguientes ejemplos no limitantes son ilustrativos de la presente solicitud:

40

Ejemplos

Ejemplo 1

45 RESULTADOS

- Generación de mutantes de vaccinia para ribonucleótido reductasa.** Para investigar la necesidad genética de los genes que codifican las subunidades pequeña (*F4L*) y grande (*I4L*) de la ribonucleótido reductasa (RR) de VACV para replicación vírica, se generó una serie de cepas de VACV mutantes en las que uno ($\Delta I4L$; $\Delta F4L$) o ambos ($\Delta I4L/\Delta F4L$) de estos genes de RR víricos se suprimieron del genoma WR (Fig. 1A; véase materiales y métodos para descripciones detalladas de construcción de virus). Dado que los complejos de RR están implicados en la ruta de novo de biogénesis de dNTP y VACV codifica una timidina quinasa (*J2R*) implicada en la ruta de recuperación alternativa y complementaria, se decidió determinar si la inactivación de inserción del locus *J2R* agravaría cualquier fenotipo posible de las cepas de supresión de RR. Por lo tanto, la inactivación de *J2R* se llevó a cabo en algunos de los fondos mutantes de RR para generar cepas $\Delta I4L/\Delta F4L/\Delta J2R$ y $\Delta F4L/\Delta J2R$. En algunos casos, se insertó un gen *F4L* marcado con His₆ o un gen *F4L* marcado con His₆ que codificaba la sustitución de aminoácidos Y300F en el locus *J2R* de cepas $\Delta F4L$. Y300 representa un resto de tirosina altamente conservado hallado esencialmente en todas las subunidades pequeñas de RR de mamífero (R2) (Fig.1B). El resto homólogo en R2 de ratón (Y370) se requiere para la transferencia de radicales entre las subunidades grandes (R1) y pequeñas que se requieren para la catálisis (30). La sustitución de fenilalanina por Y370 anula la catálisis pero no impide la interacción física de R2 con R1 (30). La sustitución del resto homólogo en p53R2 humano (Y331) con fenilalanina también anula la actividad RR de complejos p53R2/R1 (43). Por lo tanto se ha predicho que la sustitución Y300F en F4 inactiva la ruta de transferencia de radicales entre subunidades RR pequeñas y grandes manteniendo al mismo tiempo la capacidad de estas subunidades para interactuar.
- 50
- 55
- 60

65

Se usaron amplificaciones por PCR con cebadores específicos para la región del genoma WR que se alteró en cada mutante para confirmar la supresión o inactivación de los loci diana. Los resultados de estos experimentos para las cepas principales desveladas en el presente documento se muestran en la Fig. 1C junto con diagramas modelo que representan los sitios de unión aproximados de los cebadores para cada tipo de reacción de PCR. Se usaron
 5 cebadores específicos para una región del gen de la ADN polimerasa vírica (*E9L*) como un control positivo para amplificación a partir de los diversos moldes de ADN víricos. Los cebadores usados para análisis de loci *I4L* y *F4L* solamente amplifican fragmentos de estos loci si las ORF respectivas están intactas. La amplificación de productos de PCR de *I4L* solamente fue evidente en las cepas no transfectadas con el vector de supresión *I4L* (Fig. 1C). De forma similar, las porciones de PCR de *F4L* confirmaron la presencia de secuencia de *F4L* solamente en las cepas
 10 no transfectadas con el vector de supresión de *F4L* (Fig. 1D). Los cebadores para análisis de locus *J2R* se unen con secuencias que flanquean el sitio de inserción del vector pSC66 (véase materiales y métodos). Por lo tanto, loci *J2R* intactos dan lugar a productos de PCR pequeños (~0,5 kb) mientras que la inserción del gen *lacZ* (y secuencias flanqueantes) de pSC66 produce un producto mucho mayor (~4 kb). En los casos en los que el vector pSC66 contenga un gen *F4L* clonado, el producto de PCR aumenta en tamaño hasta ~5 kb debido a los ~1 kb de secuencia
 15 de la ORF de *F4L*. Todas las amplificaciones por PCR de *J2R* produjeron productos de tamaño esperado dentro de cada construcción lo que confirmaba la integridad o inactivación de inserción del gen *J2R* (Fig. 1C). La transferencia de Western confirmó la presencia o ausencia de las subunidades de RR víricas en cada uno de los aislados (Fig. 1D). Aunque se cargaron cantidades iguales de proteína en cada carril, la cepa que expresaba un gen *F4L* de tipo silvestre en el locus *J2R* parecía tener niveles elevados de F4 en comparación con virus de tipo silvestre mientras
 20 que se observó que la cepa que expresaba el gen *F4L* Y300F sustituido tenía expresión de F4 ligeramente reducida (Fig. 1D). El caso anterior es probablemente el resultado de que el gen *F4L* esté bajo el control de un promotor temprano/tardío fuerte mientras que el promotor *F4L* endógeno se activa solamente en momentos tempranos durante la infección (29). La menor expresión de F4 del mutante puntual probablemente refleja la capacidad replicativa reducida en general de este virus (véase posteriormente). Estas y otras cepas de VACV se resumen en la
 25 Tabla 1. Véase Materiales y Métodos para detalles de la construcción de virus.

Caracterización de la morfología de placas y tamaño de mutantes de vaccinia para ribonucleótido reductasa.

Como una etapa inicial para caracterizar las propiedades de crecimiento de los virus descritos en la Fig. 1, se analizó el tamaño de las placas y la morfología de estas cepas en células BSC-40. Las cepas de tipo silvestre y $\Delta I4L$
 30 tuvieron morfologías de placa similares con espacios abiertos grandes en el centro de las placas y las placas primarias se asociaron típicamente de forma estrecha con placas secundarias, más pequeñas, que probablemente surgen por la liberación de virus con envoltura extracelular de los sitios de placas primarias mayores (Fig. 2A). El análisis cuantitativo de áreas de placas también indicó que no había diferencias estadísticamente significativas entre cepas de tipo silvestre y $\Delta I4L$ (Fig. 2B). Por el contrario, los virus con *F4L* o *F4L* y *J2R* suprimidos presentaron
 35 placas significativamente más pequeñas ($p < 0,05$) que los virus de tipo silvestre con áreas de placas medias solamente 55-60 % de la de tipo silvestre. Además, estas placas primarias estaban típicamente desprovistas de placas secundarias cercanas a diferencia de las cepas de tipo silvestre y $\Delta I4L$. Sin embargo, las cepas $\Delta F4L/\Delta J2R$ que expresaban una proteína F4 marcada con His₆ de locus *J2R* ($\Delta F4L/\Delta J2R^{\text{His}F4L}$) presentaron placas características del virus de tipo silvestre con respecto al tamaño y la presencia de placas secundarias.
 40 Sorprendentemente, las cepas que codificaban la sustitución Y300F produjeron placas que no eran solamente significativamente más pequeñas ($p < 0,05$) que las del virus de tipo silvestre (Fig. 2B), sino que tras análisis adicional, también tenían 35-40 % del tamaño de todas las otras cepas $\Delta F4L$ y estas diferencias eran estadísticamente significativas ($p < 0,05$). Estos resultados sugieren que la supresión de *F4L* tiene un efecto más perjudicial en el tamaño de las placas que la supresión de *I4L*. Sugiere además que la reintroducción de un gen *F4L*
 45 marcado con His₆ en el locus *J2R* puede rescatar este fenotipo de placas menores de las cepas $\Delta F4L$. Sin embargo, la expresión de la proteína F4 Y300F parece inhibir más gravemente la formación de placas incluso en comparación con cepas que carecen tanto de genes de subunidad de RR como del gen de la timidina quinasa vírica.

También se ensayó la capacidad de otras proteínas R2 del hospedador o de *Chordopoxvirus* marcadas con His₆
 50 para rescatar el fenotipo de placas pequeñas de la cepa $\Delta F4L$. Los genes de R2 codificados por genes de R2 de ECTV, MYXV y SFV fueron todos capaces de rescatar el fenotipo de placas pequeñas, pero resulta interesante que el gen de Hp53R2 no consiguió rescatar este fenotipo (Fig. 2B). Estos resultados implicaron que las proteínas R2 de *Chordopoxvirus* han conservado una función específica y/o un nivel de actividad que no está recapitulado por Hp53R2.
 55

Caracterización de capacidades de replicación de mutantes de vaccinia para ribonucleótido reductasa. Para explorar la cinética de crecimiento de estos mutantes de RR, se realizaron curvas de crecimiento adicionales en células HeLa. Como se ha indicado anteriormente (6), la supresión de *I4L* tuvo poco efecto en los rendimientos de virus totales después de 48 h de replicación con la cepa de tipo silvestre que replica hasta títulos solamente 2 veces
 60 mayores que la cepa $\Delta I4L$ (Fig. 2C). Por el contrario, las diferencias entre cepas de tipo silvestre y $\Delta F4L$ fueron fácilmente evidentes a las 18 h después de la infección y esta tendencia continuó hasta el final del experimento de modo que los títulos de tipo silvestre fueron ~15-50 veces mayores que las cepas $\Delta F4L$ (Fig. 2C). La reintroducción del gen *F4L* en el locus *J2R* parecía rescatar los defectos de replicación observados en cepas *F4L* ya que este virus se replicó de forma similar a la cepa $\Delta I4L$. Por el contrario, la introducción del gen *F4L* Y300F sustituido inhibió la
 65 replicación productiva durante el transcurso del experimento (Fig. 2D). Estos resultados sugieren que la supresión

del gen *F4L* altera la replicación de vaccinia hasta un mayor grado que la supresión de *I4L* y que la supresión conjunta de *F4L* y *J2R* no parece tener ningún efecto sinérgico en las capacidades replicativas de vaccinia en cultivo celular. Además la observación de que la introducción de un gen *F4L* de tipo silvestre en el locus *J2R* puede rescatar el defecto de crecimiento de cepas $\Delta F4L$ sugiere que el defecto observado del $\Delta F4L$ se debe a la falta de expresión de *F4* y no a otros posibles efectos idiosincrásicos de la supresión del locus *F4L*. Finalmente, el hecho de que la cepa que expresa la proteína *F4* Y300F tiene capacidad de replicación más gravemente reducida que virus que carecen de ambas subunidades de RR sugiere que el mutante Y300F pueda actuar como un negativo dominante. Si la proteína *F4* normalmente se une con otras subunidades R1 celulares (y víricas) y forma complejos funcionales durante la infección, entonces se predeciría que la proteína *F4* Y300F forma complejos tras su unión, evitando que estas subunidades R1 interactúen con proteínas R2 celulares endógenas. La introducción del gen *F4L* Y300F en el locus *J2R* de cepas $\Delta I4L/\Delta F4L$ también conduce a la producción de placas pequeñas que son similares en tamaño a las halladas en la cepa $\Delta F4L/\Delta J2R^{HisY300FF4L}$ (Fig. 2B) lo que sugiere que la ausencia de *I4L* en estas cepas no impide que el mutante Y300F ejerza sus efectos negativos sobre la replicación.

Los resultados desvelados en el presente documento sugieren que las cepas de $\Delta F4L$ se alteraron en su capacidad para replicar en comparación con virus de tipo silvestre. Esto se debe a que RR desempeña un papel clave en la biogénesis de dNTP y los estudios iniciales de los inventores descubrieron que $\Delta F4L$ (Fig. 11A), pero no las cepas $\Delta I4L$ (Fig. 11B), mostraron expresión génica tardía reducida, lo que es una consecuencia común de defectos en la replicación de ADN. Para determinar si esta replicación vírica reducida puede ser el resultado de replicación genómica retardada o reducida, se infectaron células BSC-40 con cepa de tipo silvestre o la cepa $\Delta F4L$ para seguir la progresión de la producción de descendencia vírica y la replicación genómica en experimentos paralelos. Para determinar si la replicación genómica reducida puede ser un resultado de la actividad de RR reducida, se impusieron tratamientos en los que el medio de cultivo de tipo silvestre o $\Delta F4L$ contenía el inhibidor de RR HU debido a que la resistencia a inhibidores de RR se correlaciona con mayor expresión de RR (33). Los resultados de estos experimentos se muestran en la Fig. 3. Como se ha observado previamente, el $\Delta F4L$ tiene cinética de replicación alterada generando solamente 15 % del virus total observado para la cepa de tipo silvestre a las 24 h después de la infección (Fig. 3A). El análisis de replicación de genoma vírico también indica cinética de replicación de ADN retardada de la cepa $\Delta F4L$ siendo el ADN genómico solamente detectable a las 9 h después de la infección en comparación con infecciones de tipo silvestre en las que se detectó ADN tan pronto como a las 6 h. Incluso después de 24 h de infección, la cepa $\Delta F4L$ aún tenía solamente ADN genómico replicado hasta ~18 % del nivel de virus de tipo silvestre. Además, la adición de HU 0,5 mM a cultivos de $\Delta F4L$ impidió la detección de ADN genómico durante las 24 h del periodo de infección mientras que el virus de tipo silvestre produjo ADN genómico detectable aunque con cinética retardada y en cantidades reducidas de forma muy similar a la cepa $\Delta F4L$ en ausencia de HU (Fig. 3B). La comparación de la Fig. 3B y A sugiere que la replicación pico de la $\Delta F4L$ se produjo entre 9 y 12 h después de la infección ya que es cuando se observa el mayor aumento de títulos víricos así como replicación de genoma. Por el contrario, la cepa de tipo silvestre experimenta grandes aumentos de títulos y replicación genómica más temprano, entre 6 y 9 h después de la infección y después de nuevo entre 18 y 24 h después de la infección, con este segundo aumento esencialmente ausente en las infecciones por $\Delta F4L$. Estos resultados sugieren que la replicación alterada de la cepa $\Delta F4L$ puede deberse al menos parcialmente a síntesis de genoma reducida y la hipersensibilidad de esta cepa a HU sugiere que estas infecciones experimentan actividad de RR total reducida lo que se correlaciona directamente con niveles de expresión de proteínas de RR, lo que a su vez se correlaciona con sensibilidad a inhibidores de RR (9).

Las cepas $\Delta F4L$ son excepcionalmente hipersensibles a cidofovir y HU. Los estudios anteriores han sugerido que la menor capacidad de replicación de las cepas $\Delta F4L$ puede deberse a replicación de genoma reducida. Sin embargo, es difícil interpretar el significado de las mediciones bioquímicas de tamaños de grupos debido a las incertidumbres que rodean a cómo se distribuyen los dNTP en células infectadas. En su lugar, los inventores han ensayado si los mutantes de VACV para RR muestran una sensibilidad alterada al fármaco antivírico cidofovir (CDV). Quinasas celulares convierten CDV en el derivado difosforilo (CDVpp) [8] que es competitivo con respecto a dCTP (45) e inhibe la actividad de ADN polimerasa E9 de VACV (46, 47). Por lo tanto, puede usarse la sensibilidad de CDV como una sonda indirecta para cambios en los tamaños de grupos de dCTP. La Tabla 2 resume cómo las mutaciones de RR afectan a la sensibilidad de CDV como se evalúa por ensayos de reducción de placas y valores de concentración eficaz al 50 % (CE_{50}) calculados. Las cepas de tipo silvestre y $\Delta F4L/\Delta J2R^{HisF4L}$ mostraron valores CE_{50} medios similares de 42,0 y 41,2 μ M, respectivamente. La cepa $\Delta I4L$ fue significativamente más sensible que las cepas anteriormente mencionadas ($P < 0,05$) que tienen un valor de CE_{50} medio de 25,1 μ M. Sin embargo, la pérdida de *F4L* (o *F4L* y *J2R*) dio como resultado mayores hipersensibilidades a CDV ($P < 0,05$) con valores de CE_{50} ~5-7 veces menores que los valores de tipo silvestre. El virus $\Delta F4L/\Delta J2R^{HisY300FF4L}$ fue aún más sensible a CDV ($CE_{50} = 3,5 \mu$ M) que las cepas de tipo silvestre ($P < 0,05$) o $\Delta F4L$ ($P < 0,05$). Como se ha indicado previamente (21, 48), la inactivación de *J2R* no alteró adicionalmente la sensibilidad de VACV a CDV (Tabla 2). Las tendencias en la sensibilidad a CDV reflejaron estrechamente las halladas en mediciones de la sensibilidad a HU usando un ensayo de reducción de placas (Tabla 2). El orden de resistencia a HU (a partir de mediciones de CE_{50}) fue tipo silvestre $\geq \Delta F4L/\Delta J2R^{HisF4L} > \Delta I4L > \Delta F4L > \Delta F4L/\Delta J2R^{HisY300FF4L}$ y no pareció verse afectado por la presencia o ausencia del gen *J2R* (Tabla 2). Para determinar si las hipersensibilidades de las cepas $\Delta F4L$ y $\Delta F4L/\Delta J2R^{HisY300FF4L}$ a CDV y HU fueron específicas y no se debían simplemente a las capacidades replicativas reducidas de estos virus, se realizó un ensayo de reducción de placas usando ácido fosfonoacético (APA). APA es un análogo de pirofosfato e

inhibidor de ADN polimerasa que no es competitivo con dNTP (49). Por lo tanto, no debería esperarse que la eficacia de APA en la inhibición de replicación de virus dependiera de la actividad de RR o los tamaños de grupos de dNTP. De forma coherente con esto, las cepas de VACV mutantes para RR no fueron hipersensibles a APA en comparación con virus de tipo silvestre (Tabla 2). Estas cepas mutantes tampoco fueron hipersensibles a isatin- β -tiosemicarbazona (IBT), lo que provoca biogénesis de ARNm vírica tardía aberrante (50). Colectivamente, estos datos apuntan todos a una deficiencia en grupos de dNTP como la causa de la deficiencia de crecimiento de cepa $\Delta F4L$ (Fig. 2) y sugieren que F4, es el determinante crítico de la eficacia del crecimiento y sensibilidad farmacológica.

10 **Inmunoprecipitación de subunidades de ribonucleótido reductasa de vaccinia y humanas.** La observación de que las cepas $\Delta F4L$ se inhibían más con respecto a morfología de la placas y cinética de crecimiento que las cepas $\Delta I4L$ es sorprendente teniendo en cuenta que F4 e I4 deben interactuar entre sí para formar complejos de RR activos. La replicación de ADN reducida y la hipersensibilidad de cepas $\Delta F4L$ a CDV sugieren además un defecto heredado en el nivel de replicación genómica. Una posible explicación de estas observaciones es que F4 puede formar complejos RR funcionales con proteínas R1 celulares que normalmente contribuyen al establecimiento de grupos de dNTP suficientes para la replicación vírica. Las observaciones previas usando proteínas RR de ratón purificadas demostraron que tanto F4 como I4 podrían interactuar con subunidades de RR de ratón grandes y pequeñas, respectivamente, y formar enzimas catalíticamente activas (7). Resulta interesante que un complejo de F4-R1 de ratón era más activo que F4-I4, R2 de ratón-R1 de ratón, o complejo I4-R2 de ratón (7). Para investigar la posibilidad de la formación de complejos entre F4 y proteínas de ribonucleótido reductasa celulares, se realizaron inmunoprecipitaciones en células HeLa infectadas por virus de tipo silvestre usando anticuerpos contra subunidades de RR HR1, HR2 o Hp53R2 endógenas. Resulta interesante que F4 se coinmunoprecipitó en cada uno de estos casos pero no con anticuerpos de control (Fig. 4). Estos resultados sugieren que F4 interactúa físicamente con niveles endógenos de las tres subunidades de RR humanas incluyendo HR1, HR2 y Hp53R2. La interacción de F4 con subunidades R2 celulares era inesperada. No se sabía previamente que las subunidades R2 de vaccinia pudieran interactuar con proteínas R2 celulares y esto era inesperado. Se creyó que estas interacciones podían deberse en parte a la expresión de subunidades de RR celulares potenciada después de la infección. Sin embargo, los inventores no consiguieron observar la inducción de expresión de RR celular a las 24 h después de la infección (Fig. 12). Para confirmar adicionalmente estos resultados, se construyeron cepas de VACV que expresaban HR1 marcada con Flag ($\Delta J2R^{FlagHR1}$) o I4 marcada con Flag ($\Delta I4L/\Delta J2R^{FlagI4}$) y se usaron en nuevos experimentos de inmunoprecipitación. La inmunoprecipitación con anticuerpos anti-Flag confirmó la interacción de HR1 e I4 con F4 así como con HR2 y Hp53R2 (Fig. 5A). Se observaron típicamente bandas más débiles en las inmunoprecipitaciones de HR1 marcada con Flag en comparación con I4 marcada con Flag a pesar de que se inmunoprecipitan cantidades similares de estas proteínas (Fig. 5A). Este resultado probablemente se deba a la competición entre la proteína Flag-HR1 y HR1 endógena mientras que en Flag-I4 se expresa a partir de una cepa $\Delta I4L$ y por lo tanto no tiene que competir por la unión con proteínas R2 con I4 endógena. También se prepararon extractos de células infectadas con virus $\Delta F4L/\Delta J2R^{HisY300F4L}$ o $\Delta F4L/\Delta J2R^{HisF4L}$ y se observó que estas proteínas marcadas con His₆ también podrían coinmunoprecipitarse con proteína HR1 (Fig. 5B). Los experimentos de coinmunoprecipitación recíproca confirmaron una interacción entre proteínas F4 y HR1 (Fig. 13). Estos resultados confirman que las subunidades de RR humanas y víricas interactúan dentro de células infectadas.

Otras proteínas R2 de *Chordopoxvirus* rescataron el defecto de replicación de cepas $\Delta F4L$ de VACV (Fig. 2B). Por lo tanto, se determinó si estas proteínas podrían interactuar también con HR1. Todas las proteínas R2 de ECTV, MYXV y SFV coinmunoprecipitaron con HR1 (Fig. 5B). Aunque parecía haber diferencias en la eficacia de asociación de HR1, la transferencia de Western de lisados mostró que esto reflejaba diferencias en los niveles de expresión de R2 (Fig. 5B). Estos resultados confirman que las subunidades de RR de poxvirus que infectan una diversidad de hospedadores de mamíferos tienen conservada la capacidad de interactuar con HR1.

50 **Localización de subunidades de ribonucleótido reductasa víricas y humanas durante la infección por vaccinia.** Estudios previos han demostrado una distribución exclusivamente citoplasmática de proteínas RR de mamífero en células no infectadas (13, 14, 27). Estudios de microscopía confocal con anticuerpos dirigidos contra subunidades de RR endógenas (Fig. 6A) o marcadas con epitopos (Fig. 6B) han sugerido que la infección por VACV no altera la localización de RR en el hospedador y también se ha descubierto que subunidades de RR de VACV muestran una distribución citoplasmática similar. Estos resultados apoyan los datos de inmunoprecipitación de que se encuentran proteínas RR tanto víricas como humanas dentro del mismo compartimento celular general (el citoplasma) durante la infección, donde tienen la posibilidad de interactuar.

60 **Requisito de restos C-terminales de F4 para interacción con HR1.** Los estudios previos mostraron que F4 interactúa con HR1, pero no demostraron si dicha interacción era esencial para la replicación vírica. Numerosos estudios estructurales y de inhibición de péptidos de proteínas RR de clase I han identificado un péptido C-terminal (encuadrado en la Fig. 1B) en subunidades R2 como crítico para la interacción con proteínas R1 [11, 57, 58, 59, 60, 61]. Ya que este péptido C-terminal está bien conservado en F4 (Fig. 1B), se especuló que las interacciones HR1-F4 también dependían de este péptido. Para ensayar esta hipótesis, se generó la cepa de VACV $\Delta F4L/\Delta J2R^{HisF4\Delta R1BD}$, que codifica un mutante de truncamiento de F4 que carece de los siete restos C-terminales que representan el dominio de unión a R1 potencial (R1BD). También se generó un mutante de R1 BD que también codifica la

sustitución Y300F, ($\Delta F4L/\Delta J2R^{\text{HisY300FF4L}\Delta R1BD}$). Como se muestra en la Fig. 7A, F4 marcado con His₆ coinmunoprecipitó con HR1 en extractos de células HeLa. Sin embargo, hubo una clara reducción (en ~90 %) en la coinmunoprecipitación de proteínas F4 marcadas con His₆ que carecían del R1 BD, a pesar de niveles comparables de estas dos formas de F4 en lisados e inmunoprecipitados. Por lo tanto, F4 parece haber conservado el péptido de unión a R1 codificado por RR de clase I.

Se usaron mediciones de áreas de placas para determinar si la supresión de R1 BD alteraría las propiedades de siembra en placas de VACV (Fig. 7B). Los virus de control mostraron los mismos tamaños de placa relativos observados previamente (es decir, tipo silvestre = $\Delta F4L/\Delta J2R^{\text{HisF4L}} > \Delta F4L > \Delta F4L/\Delta J2R^{\text{HisY300FF4L}}$) y las diferencias fueron todas significativas ($P < 0,05$). Sin embargo, las cepas $\Delta F4L/\Delta J2R^{\text{HisF4L}\Delta R1BD}$ y $\Delta F4L/\Delta J2R^{\text{HisY300FF4L}\Delta R1BD}$ produjeron placas de tamaño igual al de las producidas por cepas $\Delta F4L$ ($P > 0,05$). Esto sugirió que el F4 R1 BD no solamente se requería para la actividad de RR, sino que la interacción de HR1-F4 también era responsable de los efectos negativos dominantes observados con cepas que codificaban la proteína F4 Y300F sustituida con un R1 BD intacto. También se confirmó en estos estudios que la inactivación de *J2R* solo no tuvo ningún efecto significativo en el tamaño de las placas (Fig. 7B).

Replicación de cepas de vaccinia mutantes para ribonucleótido reductasa en líneas celulares de cáncer pancreático. Basándose en los resultados previamente descritos se predijo que si el defecto de replicación de las cepas $\Delta F4L$ se debía a actividad ribonucleótido reductasa total reducida en células infectadas (y consecuentes grupos de dNTP menores) entonces el crecimiento de estas cepas debería potenciarse en líneas celulares que sobreexpresaban subunidades de RR celulares e impedirse en células que tienen niveles bajos de expresión de RR celular. Las células PANC-1 y Capan-2 son líneas celulares de cáncer pancreático que se ha indicado previamente que tiene niveles altos y bajos, respectivamente, de expresión de subunidad de RR (9, 10). Para confirmar estos resultados y para asegurar que estos resultados también son ciertos para cultivos infectados, se realizaron transferencias de Western en lisados preparados a partir de cultivos infectados de forma simulada o de tipo silvestre de células PANC-1 y Capan-2 (Fig. 8A). Los resultados muestran claramente la expresión reducida de HR1, HR2 y Hp53R2 en células Capan-2 en relación con células PANC-1, y esto fue cierto en cultivos tanto de simulación como infectados por VACV. Por lo tanto, se sembraron números aproximadamente iguales de células PANC-1 y Capan-2 en placas de cultivo y se infectaron con tipo silvestre y las diversas cepas mutantes de RR. Los títulos totales para cada una de estas infecciones a las 48 h o 72 h después de la infección se representan en la Fig. 8B. Todas las cepas se replicaron claramente menos en células Capan-2 en comparación con las células PANC-1. La división de los títulos medios obtenidos en células PANC-1 por los obtenidos en cultivos de Capan-2 para cada virus proporcionó una estimación del factor de diferencia en las eficacias de replicación de cada cepa en estas células (Fig. 8C). Después de 48 h de infección las cepas de tipo silvestre, $\Delta I4L$ y $\Delta F4L/\Delta J2R^{\text{HisF4L}}$ tuvieron títulos que eran 6-8 veces mayores en células PANC-1 que en células Capan-2. Sin embargo, las cepas de virus que carecían de $\Delta F4L$ mostraron mayores mejoras en replicación con aumentos de 18-30 veces en títulos víricos en células PANC-1. La cepa que expresa la F4 Y300F sustituida claramente se beneficiaba más de la replicación en células PANC-1 con un aumento de 113 veces en títulos en células PANC-1 en comparación con células Capan-2. Los resultados a las 72 h después de la infección tuvieron tendencias similares (Fig. 8C). Estos datos sugieren que el defecto de replicación de cepas $\Delta F4L$ se rescata al menos parcialmente en células PANC-1. Por ejemplo, las cepas $\Delta F4L$, y $\Delta I4L/\Delta F4L$ y $\Delta F4L/\Delta J2R$ tuvieron títulos solamente ~3-6 veces menores que el virus de tipo silvestre en infecciones de PANC-1 mientras que estas mismas cepas tuvieron títulos 13-15 veces menores que el tipo silvestre en células Capan-2 (Fig. 8A). La $\Delta I4L/\Delta F4L/\Delta J2R$ se replicó peor que otras cepas $\Delta F4L$ (títulos ~ 16 veces menores que el tipo silvestre en células PANC-1) lo que sugiere que en ausencia de F4 y J2, I4 puede proporcionar una contribución importante a la replicación vírica. Colectivamente, estos resultados sugieren que los defectos de replicación de las cepas $\Delta F4L$ y $\Delta F4L/\Delta J2R^{\text{HisY300FF4L}}$ pueden rescatarse al menos parcialmente en líneas celulares de cáncer humano que sobreexpresan subunidades de RR celulares.

Se requieren genes de metabolismo de nucleótidos de VACV para replicación en células primarias humanas en condiciones de bajo suero. Para ensayar adicionalmente la correlación de la expresión de RR celular y el rescate de replicación de virus mutante para RR, se infectaron células primarias humanas con una serie de mutantes de VACV que carecían de uno o más genes relacionados con el metabolismo de nucleótidos. Cuando las células se cultivaron en condiciones de alto suero, lo que estimula la replicación celular, la mayoría de cepas de VACV se replicaron productivamente en 72 h replicando todas las cepas de tipo silvestre, $\Delta I4L$, $\Delta F4L/\Delta J2R^{\text{HisF4L}}$ y $\Delta J2R$, a títulos similares que eran ~10 veces mayores que las cepas $\Delta F4L$. La cepa $\Delta F4L/\Delta J2R^{\text{HisY300FF4L}}$ no consiguió replicar en estas condiciones (Fig. 9A). Por el contrario, en condiciones de privación de suero en las que las células entran en quiescencia y tienen replicación limitada, el virus de tipo silvestre se replicó hasta títulos ~100 veces mayores que la mayoría de cepas de VACV y a niveles similares a los observados en condiciones de alto suero. De hecho, las cepas $\Delta F4L$ y $\Delta F4L/\Delta J2R^{\text{HisY300FF4L}}$ no consiguieron replicar. Además, las cepas $I4L$, $\Delta F4L/\Delta J2R^{\text{HisF4L}}$ y $\Delta J2R$ mostraron un fenotipo de replicación retardado y reducido, produciendo solamente un aumento de 10 veces en los títulos a las 72 horas después de la infección (Fig. 9B). Estos datos indican que en condiciones de alto suero las cepas $\Delta F4L$ aún muestran un defecto de replicación pero este fenotipo se agrava cuando las células se cultivan en condiciones de bajo suero. Ya que se sabe que el suero estimula la replicación celular y ya que la maquinaria de metabolismo de nucleótidos celular tal como RR está regulado por ciclo celular, se realizó transferencia de Western para determinar si los niveles de subunidades de RR celulares eran diferentes entre condiciones de alto y bajo

siero. Tanto HR1 como HR2, que se expresan de una manera específica de fase S, eran más abundantes en condiciones de alto suero en comparación con tratamientos con privación de suero. Hp53R2, que no está regulado por ciclo celular, se descubrió a niveles similares en ambas condiciones de suero (Fig. 9C). Estos resultados sugieren que el rescate de cepas de virus mutante para RR en condiciones de alto suero se correlaciona con abundancia aumentada de subunidades R1 y R2 celulares y en su ausencia, estas cepas mutantes son incapaces de replicar.

Las subunidades de RR de VACV se requieren de forma diferente para la patogénesis en ratones. Se usó un modelo animal para determinar si el requisito diferencial aparente para subunidades de RR de VACV para replicación en un cultivo se recapitularía *in vivo*. Se infectaron grupos de cinco ratones NMRI con dosis iguales de cepas de tipo silvestre, $\Delta I4L$, $\Delta F4L$ o $\Delta I4L/\Delta F4L$ y se siguieron los cambios en peso corporal de los animales durante 24 días. Las cepas de tipo silvestre y $\Delta I4L$ mostraron un grado similar de virulencia, provocando la muerte de 5/5 y 4/5 animales, respectivamente, en un periodo de siete días de infección. Por el contrario, las cepas tanto $\Delta F4L$ como $\Delta I4L/\Delta F4L$ estuvieron altamente atenuadas, representando los animales pocos o ningún signo de enfermedad y sobreviviendo a las infecciones (Figura 10A). Hubo descensos pequeños, transitorios, de peso corporal para animales infectados con la cepa $\Delta F4L$ alrededor del día 5 y 7, pero por lo demás estos animales, y los infectados con la cepa $\Delta I4L/\Delta F4L$, no mostraron ninguna señal evidente de morbilidad en comparación con el grupo de control infectado de forma simulada (Fig. 10A). Para obtener una medición más cuantitativa de la naturaleza patógena de estas infecciones, se aislaron tejidos de pulmón de ratones infectados con las cepas anteriormente mencionadas el día 5 después de la infección. Las cepas de tipo silvestre y $\Delta I4L$ tuvieron claramente una ventaja de replicación sobre las cepas $\Delta F4L$ y $\Delta I4L/\Delta F4L$ con títulos de pulmón aproximadamente 4 log mayores que las últimas dos cepas (Fig. 10B). Estos resultados indican que las subunidades de RR de VACV se requieren de forma diferente para virulencia en ratones.

25 ANÁLISIS

Contribución de F4 e I4 a la replicación de vaccinia. La observación de que la supresión de $F4L$ es más perjudicial tanto para la formación de placas como para los rendimientos de virus que la supresión de $I4L$ sugiere que $F4$ es más importante para la replicación de vaccinia que $I4$ (Fig. 2). Estudios tempranos de proteínas RR de vaccinia hallaron que la inactivación de inserción de $I4L$ en cepa WR no provocó efectos observables en replicación en cultivo y solamente atenuó levemente estos virus en modelos de ratón con un aumento de aproximadamente 10 veces en los valores de dosis letal 50 para esta cepa $\Delta I4L$ en comparación con el virus de tipo silvestre (6). Otro estudio realizó una supresión parcial de $F4L$ en la cepa de vaccinia NYCBH, así como la cepa de vacuna de Wyeth, en un intento de obtener cepas de vacunas alternativas con propiedades de replicación y virulencia adecuadas (23). Este estudio descubrió que su mutante $F4L$ se replicaba de forma comparable a virus de tipo silvestre en cultivo celular en contraste con los hallazgos desvelados en el presente documento (23). Esta observación puede deberse en parte a la alta multiplicidad de infección (MOI) usada en sus análisis de crecimiento (es decir una MOI de 10) ya que valores de MOI altos limitarían gravemente la replicación de los virus en cultivo celular y por tanto las diferencias entre una cepa de tipo silvestre y una cepa mutante se minimizarían y podrían no detectarse. Las MOI menores de los inventores (es decir, MOI de 0,03) proporcionan análisis de crecimiento que son más sensibles a la detección de defectos de crecimiento de cepa mutante ya que el virus debe experimentar múltiples ciclos de infección y replicación y con cada ciclo de replicación los defectos se agravan y son más fáciles de detectar. Además, ya que los autores no proporcionaron datos de RT-PCR o transferencia de Western para mostrar que la expresión de R2 ($F4$) se anula o se altera en el virus, por lo tanto no puede decirse con seguridad que su mutante de supresión inactivo realmente el locus R2 ($F4L$) en el virus.

El análisis detallado de las cepas $\Delta I4L$ y $\Delta F4L$ de la presente divulgación sugieren que las cepas $\Delta F4L$ probablemente están más atenuadas en su replicación que las cepas $\Delta I4L$. La observación de que el mutante de $F4$ Y300F atenúa la replicación de VACV más gravemente que la supresión tanto de $F4L$ como de $I4L$ (Fig. 2) sugiere que inhibe la producción de dNTP en la célula formando complejos de RR inactivos con proteínas RR celulares. Esta predicción es apoyada por la coimmunoprecipitación de $F4$ Y300F con HR1 (Fig. 5). Se predeciría que este resultado se conseguiría con cualquier mutación catalíticamente inactivante de $F4$ que aún permita la interacción con subunidades de RR celulares. Por ejemplo, se esperaría que las sustituciones en restos catalíticamente importantes, conservados, tales como otros restos (además de Y300) implicados en la ruta de transporte de radicales [Fig. 1B; (5)] entre subunidades grandes y pequeñas produjeran fenotipos similares en virus mutantes para $F4L$. La eficacia aumentada de estas subunidades R2 catalíticamente inactivas que interaccionan con proteínas R1 del hospedador para inhibir la replicación de VACV está apoyada por la observación de que el R1 BD, que se requiere para la interacción con la R1 del hospedador (Fig. 7A) también se requiere para el fenotipo de placas más pequeñas de virus que codifica la proteína $F4$ Y300F (Fig. 7B), en comparación con $\Delta F4L$.

Esto puede explicar por qué además de Orthopoxvirus y Suipoxvirus, la mayoría de los otros géneros de Chordopoxvirus contienen poxvirus que solamente codifican una subunidad R2 y no una R1. De hecho, recientemente se ha descubierto que el poxvirus equino (un orthopoxvirus) contiene un gen de R1 fermentado pero un gen de R2 intacto (37). La conservación de genes de R2 víricos puede reflejar la regulación diferencial de niveles de proteína R2 y R1 de mamífero durante el ciclo celular con proteínas R2 degradadas en fase S tardía mientras que los niveles de proteína R1 permanecen constantes en todo el citoplasma (3, 12). Aunque las células de mamíferos

también codifican una subunidad R2 alternativa, p53R2, esta subunidad se encuentra solamente en niveles bajos en todo el ciclo celular (38). Por lo tanto, la coevolución de poxvirus con su hospedador puede haber seleccionado conservación de proteínas R2 para formar complejo con las proteínas R1 celulares relativamente abundantes. Los datos de inmunoprecipitación (Figs. 4, 5 y 7) proporcionan pruebas directas de que las subunidades de RR víricas y celulares interaccionan durante la infección. Además, los estudios bioquímicos previos han mostrado que las subunidades de RR de ratón y vaccinia pueden formar complejos de RR funcionales *in vitro* (7), proporcionando un apoyo adicional a la predicción de que las subunidades R2 de poxvirus en general interaccionan y forman complejos funcionales con proteínas R1 celulares. Basándose en los hallazgos de los inventores con proteínas R2 de VACV, ECTV, MYXV y SFV, se predice que otras proteínas R2 de poxvirus mostrarán funciones similares. La hipersensibilidad aumentada de cepas $\Delta F4L$ a CDV en comparación con cepas $\Delta I4L$ (Tabla 2) sugiere adicionalmente que F4 es más importante en el establecimiento de grupos de dNTP apropiados para apoyar la replicación vírica.

Potencial oncolítico de poxvirus mutantes para RR. El efecto de rescate de células de cánceres humanos que sobreexpresan proteínas RR celulares en cepas que expresan F4 de $\Delta F4L$ e Y300F (Fig. 8) predice que cualquier tipo de cáncer humano con expresión de RR potenciada será altamente susceptible al tratamiento con cepas que expresan F4 Y300F o $\Delta F4L$. Los inventores han observado en la Fig. 2B que Hp53R2 no rescató el fenotipo $\Delta F4L$ de modo que la sobreexpresión de Hp53R2 por sí sola puede no ser suficiente para permitir la replicación fulminante de la cepa $\Delta F4L$ sin embargo esto se ensayó solamente en un tipo celular. Hp53R2 no parece formar un complejo tan activo con proteínas R1 del hospedador como R2 del hospedador, por lo tanto esto puede explicar por qué la sobreexpresión de Hp53R2 no es suficiente para rescatar el crecimiento de cepas $\Delta F4L$. Debido a que se requiere una subunidad tanto R1 como R2 para la actividad de RR, se predice que el efecto de rescate de la expresión de RR del hospedador en la replicación de cepa de $\Delta F4L$ dependerá de un aumento posterior en la actividad de RR en la célula. Por lo tanto si se sobreexpresa una única subunidad (es decir HR2) que normalmente no es limitante para la formación del complejo RR del hospedador en tejido de cáncer, entonces esto apoyaría probablemente la replicación de virus mutantes ya que los niveles de HR1 no están normalmente saturados con HR2 en tejido normal. Además, las células primarias humanas normales no apoyan la replicación productiva de cepas $\Delta F4L$ cuando están en condiciones de bajo suero (Fig. 9). Ya que las condiciones de bajo suero provocan que las células primarias se detengan en el ciclo celular y entren en quiescencia, estas condiciones imitan lo que se encontraría en tejido de mamífero donde la mayoría de células están en un estado altamente diferenciado y quiescente. Estos resultados sugieren que las cepas $\Delta F4L$ serían altamente selectivas para tejido transformado y serían incapaces de replicar en tejido normal *in vivo*. La falta de replicación de cepas $\Delta F4L$ en ratones apoya adicionalmente esta conclusión (Fig. 10). También se predice que otros poxvirus además de VACV que poseen un gen de R2 y son capaces de replicar en células de cáncer humano presentan este fenotipo de dependencia en los niveles de RR celulares en ausencia del gen de R2 vírico. Se ha mostrado que varios otros poxvirus que solamente codifican una subunidad R2 (Tabla 3) infectan células cancerosas humanas incluyendo Avipoxvirus (p. ej., poxvirus de canario; (16, 20)), Leporipoxvirus [p.ej., virus de mixoma; (35, 41)] y Yatapoxvirus [p. ej., virus de enfermedad tipo Yaba; (17)], aunque solamente estos dos últimos grupos experimentan replicación productiva, infecciones de tumores humanos con vectores de viruela de canarios recombinantes no replicativos pueden usarse para suministrar genes ajenos que inducen fuertes respuestas inmunitarias antitumorales. Se predeciría que la supresión y/o inactivación catalítica del gen R2 en poxvirus que se replican de forma productiva en células de mamífero haría estos virus aún más selectivos para neoplasias humanas con expresión de RR potenciada. La observación de que las proteínas R2 de MYXV y SFV pueden rescatar la replicación de la cepa $\Delta F4L$ (Fig. 2B) e interaccionar con proteínas R1 del hospedador (Fig. 5B) apoya la conclusión de que otras proteínas R2 poxvíricas realizan un papel similar a F4 de VACV y que se esperaría que la supresión y/o inactivación catalítica de estos genes en otros poxvirus dieran lugar a virus con propiedades similares a las cepas $\Delta F4L$ de VACV (p. ej., oncólisis potenciada). Además, los análisis de crecimiento de los inventores y los datos de patogenia de ratón muestran que la inactivación tanto de $I4L$ como de $F4L$ produce un fenotipo similar a una cepa $\Delta F4L$, reforzando el argumento de que son los genes de R2 de poxvirus los que son determinantes críticos de las eficacias de replicación y no los genes de R1 de poxvirus.

Susceptibilidad de tipos de cáncer humanos a poxvirus oncolíticos mutantes para RR. Se ha mostrado que una amplia diversidad de líneas celulares de cáncer humano y aislados clínicos presentan niveles de ARNm o proteínas de RR elevados (véase Tabla 4 para ejemplos y referencias), lo que sugiere que las cepas mutantes para $F4L$ tales como cepas que expresan F4 Y300F y $\Delta F4L$ pueden ser útiles en el tratamiento de una amplia serie de tipos tumorales humanos. Estos tipos tumorales incluyen pero sin limitación mama, pancreático, colorrectal, hepático, esofágico y piel. Además, HU se usa ampliamente para tratar leucemia, cánceres ováricos y cánceres de cabeza y cuello (25, 31, 42), lo que sugiere que estos tipos tumorales también muestran actividad de RR elevada y serían susceptibles de tratamiento con los poxvirus oncolíticos anteriormente mencionados. De hecho, el tratamiento prolongado de pacientes con inhibidores de RR tales como gemcitabina puede conducir a resistencia farmacológica con frecuencia como resultado de la amplificación del gen de HR2 y posterior sobreexpresión de HR2 (28, 34, 42). Por lo tanto, las cepas mutantes para $F4L$ tales como las cepas que expresan F4 Y300F y $\Delta F4L$ podrían formar un componente lógico de terapia combinada por el que los pacientes se tratan en primer lugar con HU (o gemcitabina) seguido de tratamiento con una de estas cepas de VACV oncolíticas para dirigirse al tejido tumoral resistente a fármacos restante. De hecho la terapia de combinación de inhibidores de RR y otros virus oncolíticos han tenido resultados prometedores (2, 40) que apoyan la eficacia de combinación de inhibidores de RR con cepas mutantes

F4L, tales como las cepas que expresan *F4 Y300F* y $\Delta F4L$. Con el desarrollo de RT-PCR rápida y análisis cuantitativo automático para la detección de expresión RR celular aumentada en cánceres humanos, las biopsias de pacientes podrían preexplorarse potencialmente para determinar si un tejido tumoral particular puede responder bien al tratamiento oncolítico (22). Por lo tanto, se predice que los virus poxvirus mutantes para RR son agentes oncolíticos altamente eficaces en una amplia serie de tipos de cánceres humanos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo celular y de virus. Se han descrito métodos de cultivo celular y de virus en otra parte (1). Se derivaron virus vaccinia de tipo silvestre (VACV) y sus derivados mutantes de una reserva de VACV (cepa WR) originalmente adquirida de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC). Se cultivaron de forma normal células de riñón de mono verde africano no transformadas (BSC-40) en medio de Eagle modificado (MEM) complementado con suero bovino fetal 5 % (FBS). Se cultivaron células de adenocarcinoma de cuello uterino humano HeLa en MEM de Dulbecco (DMEM) complementado con FBS 10 %. Las células Panc-1 y Capan-2 son líneas de carcinoma y adenocarcinoma epitelioide pancreático humano, respectivamente, y también se cultivaron en DMEM complementado con FBS 10 %. Todas las líneas celulares se obtuvieron originalmente de ATCC. Las células se cultivaron en medio Opti-MEM (Invitrogen) en experimentos que requirieron transfecciones. Todas las células desveladas en el presente documento tuvieron resultado de ensayo negativo para micoplasma.

Materiales. Se obtuvo Cidofovir [(S)-1-(3-hidroxi-2-fosfonilmetoxipropil) citosina (HPMPC)] de Gilead Sciences (Foster City, CA). Se obtuvo hidroximetilurea (HU) de Alfa Aesar (Ward Hill, MA). Se obtuvieron sustratos X-gal y X-glu de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO) y Clontech (Palo Alto, CA), respectivamente. Se obtuvieron ácido micofenólico (MPA) y xantina de Sigma Chemical Co. Se obtuvo hipoxantina de ICN Biomedicals, Inc. (Aurora, OH). Se diluyeron compuestos hasta su concentración final en MEM (Cidofovir, HU) o en una mezcla 1:1 de MEM y un agar noble 1,7 % (X-gal; X-glu) inmediatamente antes de su uso. Se obtuvieron ADN polimerasas Taq y PfuUltra™ de Fermentas (Burlington, ON) y Stratagene (La Jolla, CA), respectivamente.

Anticuerpos, transferencia de Western e inmunoprecipitación. El suero de cabra normal y anticuerpos policlonales de cabra contra R1 humana (HR1), R2 humana (HR2) y p53R2 humana (Hp53R2) fueron de Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA). Los anticuerpos monoclonales de ratón contra HR1 y HR2 fueron de Millipore (Billerica, MA) y Santa Cruz Biotechnology, Inc., respectivamente. Los anticuerpos monoclonales de ratón contra epítomos Flag y His₆ fueron de Sigma y Roche (Mississauga, ON), respectivamente. Se obtuvieron anticuerpos policlonales de conejo anti-epítomo Flag de Sigma. Se desarrolló un anticuerpo monoclonal de ratón contra el antígeno R2 de virus ectromelia recombinante y el anticuerpo resultante también reconoce F4 de VACV, y se usó para transferencia de Western (descrita posteriormente). Un anticuerpo policlonal anti-I4 de conejo se obtuvo del Dr. C. Mathews (Oregon State University). Aunque este anticuerpo reconoce I4 de VACV, también reacciona de forma cruzada con HR1 en transferencias de western. El anticuerpo monoclonal de ratón contra I3 de VACV se ha descrito (24) y el anticuerpo monoclonal de ratón contra actina celular fue de Sigma.

Se prepararon extractos proteicos para transferencias de Western e inmunoprecipitaciones de cultivos celulares lisando células en hielo en un tampón que contiene NaCl 150 mM, Tris 20 mM (pH 8,0), EDTA 1 mM y NP-40 0,5 % junto con fenilmetilsulfonilfluoruro recién añadido (100 µg/ml) y comprimidos inhibidores de proteasa (Roche;). Se retiró residuo celular de muestras después de 1 h de lisis por centrifugación (10.000 rpm, 10 min, 4 °C). Para transferencias de Western, se sometieron 20-40 µg de proteína total a SDS-PAGE 8 % y posteriormente se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Estas membranas se bloquearon después durante 1 h a temperatura ambiente (TA) en tampón de bloqueo Odyssey (Li-COR Biosciences, Lincoln, NB), después de lo cual se incubaron con el anticuerpo primario apropiado durante 1 h a TA diluido en tampón de bloqueo. Después de la incubación de 1 h, las membranas se lavaron tres veces en PBS que contenía Tween 0,1 % (PBS-T). Las membranas se incubaron después con anticuerpos secundarios apropiados (Li-COR Biosciences) durante 1 h a TA, después de lo cual las membranas se lavaron tres veces en PBS-T, una vez en PBS y se exploraron usando un explorador Odyssey (Li-COR Biosciences).

Se recuperaron rutinariamente extractos proteicos para las inmunoprecipitaciones como se ha descrito anteriormente 6-8 h después de la infección en células HeLa (10^7) infectadas con cepas indicadas a una MOI de 10. Estos extractos se preclarificaron después por incubación con perlas de proteína G sepharose (GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, NJ) durante 30 minutos a 4 °C con inversión constante. Las muestras se centrifugaron posteriormente (2.500 rpm, 1 min, 4 °C) y los sobrenadantes se transfirieron a tubos nuevos y los extractos se incubaron con el anticuerpo primario apropiado durante la noche a 4 °C con inversión constante. Después se añadieron perlas de proteína G a los extractos y se incubaron durante 2 h a 4 °C, después de lo cual las perlas se sedimentaron por centrifugación (2.500 rpm, 1 min, 4 °C) y se lavaron cuatro veces con tampón de lisis. Los complejos de perla-proteína resultantes se resuspendieron en tampón de carga de SDS-PAGE, se hirvieron durante 15 min y se cargaron en geles SDS. Después se realizó transferencia de Western como se ha descrito anteriormente con los anticuerpos indicados.

Análisis de morfología y replicación de placas. Se realizó análisis de morfología de placas en placas de 60 mm de diámetro de células BSC-40 confluentes infectadas con ~100 unidades formadoras de placas (UFP) de la cepa indicada. Después de 48 h de infección, las placas por triplicado se tiñeron con violeta cristal y las placas se exploraron usando un explorador HP ScanJet 6300C. Los archivos de imagen resultantes se sometieron a análisis de área de placas usando el software ImageJ v1.04g (National Institutes of Health, Estados Unidos). Se realizaron ensayos de t-Student para muestras no relacionadas en áreas de placas medias entre tipo silvestre y cada una de las diversas cepas mutantes para RR usando software GraphPad Prism (San Diego, CA) (versión 4.0). En algunos casos también se compararon dos cepas mutantes para RR diferentes con respecto a diferencias en áreas de placas medias. Se consideró que un p valor de <0,05 era estadísticamente significativo. Se realizaron análisis de crecimiento en cultivos de células BSC-40, HeLa, PANC-1 y Capan-2 usando las MOI y cepas indicadas. Las células se recogieron raspando monocapas al medio de cultivo en los puntos temporales indicados con tres ciclos de congelación-descongelación posteriores para liberar virus. Las reservas de virus se valoraron en monocapas confluentes de células BSC-40 infectadas durante 48 horas y después se tiñeron con violeta cristal. Para experimentos de PANC-1 y Capan-2, los rendimientos de virus medios de cada virus de PANC-1 se dividieron por los rendimientos medios obtenidos de cultivos de Capan-2 para obtener una relación que representa el factor de aumento en la capacidad replicativa de cada cepa en células PANC-1 en comparación con células Capan-2. Para análisis de replicación de genoma vírico, en los tiempos indicados, se extrajo ADN total de células BSC-40 infectadas con virus de tipo silvestre o $\Delta F4L$ a una MOI de 2. En algunos casos los cultivos contenían HU 0,5 mM en el medio que se añadió 1 h después de la infección. El ADN extraído se aplicó puntualmente en membrana Zetaprobe usando un aparato de transferencia por ranuras basado en vacío (BioRad) y el ADN del virus se detectó por hibridación con una sonda de gen E9L marcada con ^{32}P . El marcador ^{32}P se detectó usando un phosphorimager Typhoon 8600 y se procesó usando ImageQuant (24).

Ensayos de reducción de placas. Se realizaron ensayos de reducción de placas usando cidofovir (CDV) como se ha descrito previamente (1). Brevemente, se inocularon placas de 60 mm de diámetro de células BSC-40 confluentes con ~200 UFP de las cepas de virus indicadas, y 1 h después de la infección, se añadió medio sin suero o medio que contenía las dosis indicadas de CDV a los cultivos y las placas se incubaron a 37 °C durante 48 h. Las placas se tiñeron después con violeta cristal para visualizar y contar placas. Se calcularon los valores de CE_{50} medios y sus intervalos de confianza (IC) al 95 % usando software GraphPad Prism. En casos en los que los IC al 95 % de dos valores de EC_{50} diferentes no solaparon, estos dos valores de CE_{50} se consideraron estadísticamente significativos ($p < 0,05$). **Microscopía confocal.** Se cultivaron células HeLa en cubreobjetos en placas de 24 pocillos y se infectaron con las cepas de virus indicadas a una MOI de 5 durante 10 h. Las células se fijaron durante 30 min en hielo con paraformaldehído 4 % en PBS. Las células fijadas se bloquearon y se permeabilizaron durante 1 h a TA en PBS que contenía Tween (PBS-T) 0,1 % así como BSA 10 %. Los cubreobjetos se incubaron después con los anticuerpos primarios diluidos en PBS-T (BSA 1 %) durante 2 h a TA, se lavaron tres veces y después se incubaron con anticuerpos secundarios conjugados con Alexa 488 o 594 (Invitrogen) durante 1 h a TA. Las células se contratiñeron después con 4',6'-diamidino-2-fenilindol (DAPI) 10 ng/ml en PBS-T durante 15 min. Las muestras de ensayo se examinaron usando un microscopio confocal de exploración por láser Zeiss 710 equipado con filtros DAPI, Alexa 488 y Alexa 594. Las imágenes se capturaron y procesaron usando software ZEN 2009 y Adobe Photoshop (versión 10.0.1).

Estudios con animales. Se obtuvieron ratones NMRI hembras, de 3 a 4 semanas de edad, de Charles River Laboratories (Bruselas, Bélgica). Se utilizaron ratones a 5 ratones por grupo de infección o de control para estudios de morbilidad. Los ratones se anestesiaron usando ketamina-xilazina y se inocularon por vía intranasal (o se inocularon de forma simulada) con 4×10^4 UFP de virus diluido en 30 μ l de solución salina. Se registraron pesos corporales animales durante los siguientes 24 días o hasta que los animales tuvieron que sacrificarse debido a más del 30 % de pérdida de peso corporal. Para determinar los títulos víricos en pulmones, se sacrificaron dos (infecciones de tipo silvestre) o cinco animales (infecciones $\Delta I4L$, $\Delta F4L$ y $\Delta I4L/\Delta F4L$) el día 5. Se retiraron muestras de pulmón de forma aséptica, se pesaron, se homogeneizaron en MEM, y se congelaron a -70 °C hasta que se ensayaron por valoraciones en células HEL.

Construcción de plásmidos y rescate de marcadores. Se cultivaron células BSC-40 hasta su confluencia y después se infectaron durante 1 h con la cepa VACV apropiada (véase posteriormente) a una MOI de 2 en 0,5 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS). Las células se transfectaron después con 2 μ g de ADN plasmídico apropiado usando Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Las células se devolvieron a la incubadora durante otras 5 h, la solución de transfección se reemplazó con 5 ml de medio del cultivo nuevo, y las células se cultivaron durante 24-48 h a 37 °C. La descendencia del virus se liberó por congelación-descongelación, y el título del virus se determinó en células BSC-40. Estas reservas de "rescate-marcador" resultantes se volvieron a sembrar después en diluciones en serie en monocapas de BSC-40 nuevas. Estos cultivos de virus se sometieron después a selección visual de placas (es decir usando X-gal o X-glu) o selección farmacológica (es decir usando MPA). Se usaron X-gal y X-glu a una concentración final de 0,4 mg/ml en superposiciones de medios de cultivo sólidos. Se usaron xantina (250 μ g/ml) e hipoxantina (15 μ g/ml) para complementar una reserva de trabajo de MPA (25 μ g/ml) para las selecciones de cepas que codifican *yfp-gpt*. Las cepas que codifican *yfp-gpt* codifican una proteína de fusión entre YFP (un derivado de GFP) y xantina guanina fosforribosiltransferasa (GPT) de *E. coli* que permite la selección visual (YFP) o basada en ácido micofenólico. Todas las cepas se purificaron en placas en células BSC-40 un mínimo de tres veces y se

amplificaron en ausencia de tratamiento farmacológico para obtener reservas de trabajo finales. La confirmación de rescate de marcadores y posterior supresión/alteración de la secuencia genómica de VACV endógena se confirmó por análisis por PCR del ADN total extraído de células BSC-40 infectadas. En algunos casos se usó transferencia de Western para confirmar la presencia o ausencia de expresión génica en las cepas de VACV descritas. Se

5 proporcionan posteriormente detalles de cada cepa VACV recombinante.

Construcción del virus $\Delta F4L$. El plásmido pZIPPY-NEO/GUS (11) se usó para clonar un producto de PCR de ~500 pb que contenía secuencias que flanqueaban el lado “F5L” del locus *F4L* (cebadores: 5'-ACTAGTTAGATAAATGGAAATATCTT-3' [SEQ ID NO: 2] y 5'-AAGCTTTCAGTTATCTATATGCCTGT [SEQ ID NO: 3]), así como un producto de PCR de ~520 pb que contenía secuencias que flanqueaban el lado “F3L” del locus *F4L* así como los últimos 30 pb de la ORF de *F4L* (cebadores: 5'-CCGCGGAATCATTTTTCTTTAGATGT-3' [SEQ ID NO: 4] y 5'-AGATCTTATGATGTCATCTCCAGTT-3' [SEQ ID NO: 5]). El fragmento de PCR de 500 pb se clonó en pZIPPY-NEO/GUS utilizando sitios de restricción *SpeI* y *HindIII* y el fragmento de PCR de 520 pb se clonó en el vector resultante usando sitios de restricción de *SacI* y *BglII*. Estas regiones de homología se secuenciaron para asegurar la fidelidad de reacciones de PCR y clonación. El rescate de este vector (denominado ahora pZIPPY-*F5L^H+F3L^H*) en WR conduce a la supresión de los nucleótidos (nt) 33948-32987 en el genoma de WR (referencia de Genbank: NC_006998) que comprende 31 nt en la región intergénica entre las ORF de *F5L* y *F4L* y los primeros 930 nt de la ORF de *F4L* de 960 pb. Los últimos 30 pb de la ORF *F4L* se mantuvieron para mantener la señal de terminación de la transcripción endógena para expresión de F5 contenido en el extremo 3' de la ORF de *F4L* (29). Esta región se reemplaza por un gen de resistencia a neomicina (*neo*) promovido por p7.5 así como un gen *gusA* bajo el control de un promotor de H5 modificado (11). Para generar la cepa $\Delta F4L$, se transfeció ADN de pZIPPY-*F5L^H+F3L^H* (~2 µg) en células BSC-40 infectadas por VACV (MOI = 2) de tipo silvestre (cepa WR). Después de 24 h de replicación las células se recogieron para virus, se congelaron-descongelaron tres veces y las reservas de virus se volvieron a sembrar a múltiples diluciones en células BSC-40 nuevas superpuestas con medio de cultivo sólido. Después de 48-72 h de replicación las placas se superpusieron con una segunda capa de medio de cultivo sólido que contenía X-glu 0,4 mg/ml. Se aislaron placas azules y se volvieron a sembrar de una manera similar de modo que el virus $\Delta F4L$ había experimentado cuatro ciclos de purificación en placas. Se amplificaron aislados finales en células BSC-40 y se confirmó la ausencia de secuencia codificante de *F4L* por PCR (Figura 1C). También se confirmó la ausencia de expresión de F4 usando transferencia de Western con un anticuerpo monoclonal de ratón que reconocía F4 (Fig. 1D).

Construcción de virus $\Delta I4L$ y $\Delta I4L/\Delta F4L$. El plásmido pZIPPY-NEO/GUS (11) se usó para clonar un producto de PCR de ~430 pb que contenía secuencias que flanqueaban el lado “I5L” del locus *I4L* (cebadores: 5'-ACTAGTGGAAAGGGTATCTATACTTATAGAATAATC-3' [SEQ ID NO: 6] y 5'-GTCGACTTTTGTGGTGAATAAAAAAATTATTTAAAC-3' [SEQ ID NO: 7]), así como un producto de PCR de ~340 pb que contenía secuencias que flanqueaban el lado “I3L” del locus *I4L* (cebadores: 5'-CCGCGGGGTTAAACAAAAACATTTTTATTCTC-3' [SEQ ID NO: 8] y 5'-AGATCTGTTTAGTCTCTCTCCATCCAAC-3' [SEQ ID NO: 9]). El fragmento de PCR de 430 pb se clonó en pZIPPY-NEO/GUS usando sitios de restricción *SpeI* y *SaI* y el fragmento de PCR de 340 pb se clonó en el vector resultante usando sitios de restricción *SacI* y *BglII*. Estas regiones de homología también se clonaron en un vector separado, pDGloxPKO usando los mismos sitios de restricción que con clonación en pZIPPY-NEO/GUS. Estas regiones de homología se secuenciaron para asegurar la fidelidad de reacciones de PCR y de clonación. El rescate del primer vector (denominado ahora pZIPPY-*I5L^H+I3L^H*) o el segundo (ahora denominado pDGloxPKO-*I5L^H+I3L^H*) en WR conduce a la supresión de nt 61929-64240 en el genoma de WR. El primer vector (pZIPPY-*I5L^H+I3L^H*) reemplaza la región suprimida con un gen *neo* promovido por p7.5 así como un gen *gusA* bajo el control de un promotor H5 modificado (11). Este vector se usó para generar la cepa $\Delta I4L$. El segundo vector (pDGloxPKO-*I5L^H+I3L^H*) reemplaza la región suprimida con un gen de fusión *yfp-gpt* promovido por un promotor de viruela temprano/tardío sintético. Este vector se usó para generar la cepa $\Delta I4L/\Delta F4L$ por rescate de este vector en un fondo de $\Delta F4L$. Los virus se aislaron después de transfección de vectores apropiados y selección usando X-glu (para cepa $\Delta I4L$) o ácido micofenólico 25 µg/ml (para cepa $\Delta I4L/\Delta F4L$) en cultivo de células BSC-40. Todos los aislados se purificaron en placas un mínimo de tres veces. Se confirmó la supresión del locus *I4L* y pérdida de la expresión de I4 por PCR (Fig. 1C) y transferencia de western (Fig. 1D), respectivamente.

Construcción de virus $\Delta I4L/\Delta F4L/\Delta J2R$, $\Delta F4L/\Delta J2R$, $\Delta J2R$, $\Delta F4L/\Delta J2R^{HisF4L}$, $\Delta F4L/\Delta J2R^{HisY300FF4L}$, $\Delta I4L/\Delta J2R^{Flag/4L}$, $\Delta J2R^{FlagHR1}$ y $\Delta J2R^{HisHp53R2}$. El plásmido pSC66 (39), un derivado del vector de transferencia de vaccinia pSC65 (4) se usó para generar mutaciones inactivadoras en el locus *J2R* (timidina quinasa, TK) así como para introducir genes ajenos en el locus *J2R* para expresión bajo el control de un promotor de poxvirus temprano/tardío sintético (véase posteriormente). Este vector contiene regiones de homología que flanquean los lados tanto izquierdo como derecho de la ORF de *J2R* y crea una alteración en la ORF de *J2R* de modo que se realiza una inserción entre los nucleótidos 81001 y 81002 en el genoma de WR. Esta inserción de ~4 kb codifica un gen *lacZ* bajo el control de un promotor de poxvirus p7.5 así como introduce un segundo promotor de poxvirus sintético temprano/tardío que inicia la transcripción en la dirección opuesta del casete p7.5-*lacZ* (4). Un sitio de clonación múltiple cadena abajo del promotor sintético permite la inserción de ORF ajenas para expresar (4). La transfección de ADN de pSC66 en $\Delta I4L/\Delta F4L$, $\Delta F4L$ o células BSC-40 infectadas por VACV de tipo silvestre y posterior selección de placas azules (en presencia de X-gal en medio de cultivo sólido) permitió la creación de cepas de VACV $\Delta I4L/\Delta F4L/\Delta J2R$, $\Delta F4L/\Delta J2R$

y $\Delta J2R$, respectivamente. La alteración del locus $J2R$ se confirmó por análisis de PCR (Fig. 1C y datos no mostrados). Se usaron cebadores 5'-AAGCTTATGCATCACCATCACCATCACATGGAACCCATCCTTGCACC-3' [SEQ ID NO: 10] y 5'-GCGGCCGCTTAAAAGTCAACATCTAAAG-3' [SEQ ID NO: 11] para amplificar por PCR y clonar una ORF de $F4L$ marcada con His₆ (His) en pCR2.1 (Invitrogen). Se aisló después un fragmento de restricción $KpnI/NotI$ de este plásmido y se clonó en los sitios de restricción $KpnI/NotI$ de pSC66 (generando pSC66^{HisF4L}) para expresión bajo el promotor sintético temprano/tardío. El rescate de pSC66^{HisF4L} en el fondo de $\Delta F4L$ generó la cepa $\Delta F4L/\Delta J2R$ ^{HisF4L}. Se realizó mutagénesis dirigida usando los cebadores 5'-CGAAAAACGTGTGGGTGAATTCCAAAAATGGGAGTTATGTC-3' [SEQ ID NO: 12] y 5'-GACATAACTCCCATTTTTTGAATTCACCCACACGTTTTTCG-3' [SEQ ID NO: 13] con un kit Quick-Change® II XL (Stratagene) para generar una ORF de $F4L$ marcada con His₆ que codificaba la sustitución Y300F (creando pSC66^{HisY300FF4L}). El rescate de pSC66^{HisY300FF4L} en el fondo de $\Delta F4L$ generó la cepa $\Delta F4L/\Delta J2R$ ^{HisY300FF4L}. Se usaron los cebadores 5'-GTCGACATGGACTACAAGGACGACGATGACAAG-3' [SEQ ID NO: 14] y 5'-GCGGCCGCTTAACCACTGCATGATGTACAGATTTCCGG-3' [SEQ ID NO: 15] se usaron para amplificar por PCR una ORF de $I4L$ marcada con Flag a partir de un vector pCR2.1 que contenía un inserto de ORF de $I4L$ marcado con Flag previamente generado usando los cebadores 5'-AAGCTTATGGACTACAAGGACGACGATGACAAGATGTTTGTTCATTAACG AAATG-3' [SEQ ID NO: 16] y 5'-GCGGCCGCTTAACCACTGCATGATGTACAGATTTCCGG-3' [SEQ ID NO: 17]. El fragmento de PCR resultante se subclonó en pCR2.1 y se clonó un fragmento de restricción de $Sall/NotI$ en los sitios $Sall/NotI$ de pSC66 (generando pSC66^{FlagI4L}). El rescate de pSC66^{FlagI4L} en el fondo de $\Delta I4L$ generó la cepa $\Delta I4L/\Delta J2R$ ^{FlagI4L}. Se usaron los cebadores 5'-GTCGACATGGACTACAAGGACGACGATGACAAG-3' [SEQ ID NO: 18] y 5'-GCGGCCGCTCAGGATCCACACATCAGACATTC-3' [SEQ ID NO: 19] para amplificar por PCR una ORF de HR1 marcada con Flag a partir de un vector pCR2.1 que contenía un inserto de ORF de HR1 marcada con Flag previamente generado usando los cebadores 5'-CCAGTGTGGTGGATGGACTACAAGGACGACGATGACAAGATGCATGTGA TCAAGCGAGATG-3' [SEQ ID NO: 20] y 5'-GCGGCCGCTCAGGATCCACACATCAGACATTC-3' [SEQ ID NO: 21] y ADNc de HR1 (Invitrogen). El fragmento de PCR resultante se subclonó en pCR2.1 y se clonó un fragmento de restricción $Sall/NotI$ en los sitios $Sall/NotI$ de pSC66 (generando pSC66^{FlagHR1}). El rescate de pSC66^{FlagHR1} en el fondo de tipo silvestre generó la cepa $\Delta J2R$ ^{FlagHR1}. Se usaron los cebadores 5'-GGATCCATGCATCACCATCACCATCACATGGGGACCCGAAAGGCCG-3' [SEQ ID NO: 22] y 5'-GCGGCCGCTTAAAATCTGCATCCAAGG-3' para amplificar por PCR una ORF de Hp53R2 marcada con His₆ a partir de ADNc de Hp53R2 (Genecopeia Inc., Germantown, MD). El fragmento de PCR resultante se subclonó en pCR2.1 y se clonó un fragmento de restricción $KpnI/NotI$ en los sitios de restricción $KpnI/NotI$ de pSC66 (generando pSC66^{HisHp53R2}). El rescate de pSC66^{HisHp53R2} en el fondo de tipo silvestre generó la cepa $\Delta J2R$ ^{HisHp53R2}.

35 **Tabla 1.** Cepas de VACV principales usadas en este estudio.

Cepa ¹	Locus $I4L$ ²	Locus $F4L$ ²	Locus $J2R$ ²
Tipo silvestre (WR)	+	+	+
$\Delta I4L$	- (<i>neo; gusA</i>)	+	+
$\Delta F4L$	+	- (<i>neo; gusA</i>)	+
$\Delta J2R$	+	+	- (<i>lacZ</i>)
$\Delta I4L/\Delta F4L$	- (<i>yfp-gpt</i>)	- (<i>neo; gusA</i>)	+
$\Delta I4L/\Delta F4L/\Delta J2R$	- (<i>Yfp-gpt</i>)	- (<i>neo; gusA</i>)	- (<i>lacZ</i>)
$\Delta F4L/\Delta J2R$	+	- (<i>neo; gusA</i>)	- (<i>lacZ</i>)
$\Delta F4L/\Delta J2R$ ^{HisF4L}	+	- (<i>neo; gusA</i>)	- (<i>lacZ; HisF4L</i>)
$\Delta F4L/\Delta J2R$ ^{HisY300FF4L}	+	- (<i>neo; gusA</i>)	- (<i>lacZ; HisY300FF4L</i>)
$\Delta I4L/\Delta F4L/\Delta J2R$ ^{HisF4L}	- (<i>yfp-gpt</i>)	- (<i>neo; gusA</i>)	- (<i>lacZ; HisF4L</i>)
$\Delta I4L/\Delta F4L/\Delta J2R$ ^{HisY300FF4L}	- (<i>yfp-gpt</i>)	- (<i>neo; gusA</i>)	- (<i>lacZ; HisY300FF4L</i>)
$\Delta F4L/\Delta J2R$ ^{HisF4L$\Delta R1BD$}	+	- (<i>neo; gusA</i>)	- (<i>lacZ; HisF4L$\Delta R1BD$</i>)
$\Delta F4L/\Delta J2R$ ^{HisY300FF4L$\Delta R1BD$}	+	- (<i>neo; gusA</i>)	- (<i>lacZ; HisY300FF4L$\Delta R1BD$</i>)
$\Delta F4L/\Delta J2R$ ^{HisECTVVR2}	+	- (<i>neo; gusA</i>)	- (<i>lacZ; HisECTVVR2</i>)
$\Delta F4L/\Delta J2R$ ^{HisMYXR2}	+	- (<i>neo; gusA</i>)	- (<i>lacZ; HisMYXR2</i>)
$\Delta F4L/\Delta J2R$ ^{HisSFVR2}	+	- (<i>neo; gusA</i>)	- (<i>lacZ; HisSFVR2</i>)
$\Delta I4L/\Delta J2R$ ^{FlagI4L}	- (<i>neo; gusA</i>)	+	- (<i>lacZ; HisSFVR2</i>)
$\Delta J2R$ ^{FlagHR1}	+	+	- (<i>lacZ; FlagHR1</i>)
$\Delta J2R$ ^{HisHp53R2}	+	+	- (<i>lacZ; HisHp53R2</i>)
$\Delta F4L/\Delta J2R$ ^{HisHp53R2}	+	- (<i>neo; gusA</i>)	- (<i>lacZ; HisHp53R2</i>)

¹Todas las cepas se generaron en la cepa de Reserva de Western (WR) de VACV.

² "+" indica que el locus está intacto y "-" indica que el locus está alterado. Los genes marcadores y genes víricos o

Cepa ¹	Locus <i>I4L</i> ²	Locus <i>F4L</i> ²	Locus <i>J2R</i> ²
-------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------

humanos insertados presentes en loci alterados están entre paréntesis. Abreviaturas: His, marcador epitópico His₆; Flag, marcador epitópico Flag; R1BD, dominio de unión a R1; VACV, virus vaccinia; ECTV, virus ectromelia; MYX, virus mixoma; SFV, virus de fibroma de Shope; HR1, R1 humana; Hp53R2, p53R2 humana. Véase Materiales y Métodos para detalles adicionales.

Tabla 2. Susceptibilidad de cepas mutantes para RR de VACV a cidofovir (CDV), hidroxiurea (HU) y ácido fosfonoacético (APA).

Virus	CE ₅₀ media del Compuesto					
	CDV (µM) ¹	Factor de Cambio ²	HU (mM) ¹	Factor de Cambio ²	PAA (µg/ml) ¹	Factor de Cambio ²
	42,0				50,5	
Tipo silvestre	(36,2-48,7)	1,0	0,87 (0,72-1,06)	1,0	(41,9-61,0)	1,0
$\Delta I4L$	25,1 (22,0-28,7)	1,7	0,19(0,15-0,24)	4,6	55,6 (44,9-68,9)	1,1
$\Delta F4L$	6,2 (5,5-7,0)	6,8	0,05 (0,04-0,06)	17,4	56,6 (49,4-64,9)	1,1
$\Delta I4L/\Delta F4L$	6,8 (5,4-8,5)	6,2	0,05 (0,04-0,06)	17,4	54,7 (48,3-62,1)	1,1
$\Delta I4L/\Delta F4L/\Delta J2R$	7,6 (6,7-8,5)	5,5	0,05 (0,05-0,06)	17,4	47,4 (39,7-56,6)	1,1
$\Delta F4L/\Delta J2R$	8,1 (6,6-9,9)	5,2	0,07 (0,06-0,08)	12,4	49,0 (40,9-58,6)	1,0
$\Delta F4L/\Delta J2R^{HisF4L}$	41,2 (35,9-47,1)	1,0	0,68 (0,50-0,91)	1,3	46,8 (38,3-57,1)	1,1
$\Delta F4L/\Delta J2R^{HisY30UF-F4L}$	3,5 (3,0-4,2)	12	0,03 (0,03-0,03)	29	44,9 (39,0-51,8)	1,1

¹Los valores entre paréntesis representan intervalos de confianza al 95 %.

²Comparado con la CE₅₀ media de virus de tipo silvestre. Los valores en negrita indican diferencias estadísticamente significativas (P<0,05) con respecto a los valores de tipo silvestre.

5 **Tabla 3.** Conservación diferencial de genes de RR de *Chordopoxirinae*.

Género	R1	R2	TK	Especies Ejemplares ³
<i>Orthopoxvirus</i>	+ ¹	+	+	VACV HSPV TATV VARV SPXV
<i>Suipoxvirus</i>	+	+	+	TANV
<i>Yatapoxvirus</i>	-	+	+	YLDV
<i>Leporipoxvirus</i>	-	+	+	MYXV SFV
<i>Capripoxvirus</i>	-	+	+	GTPV SPPV LSDV
<i>Cervidpoxvirus</i>	-	+	+	DPV
<i>Avipoxvirus</i>	-	+ ²	+	FPV CNPV
<i>Molluscipoxvirus</i>	-	-	-	MCV

Género	R1	R2	TK	Especies Ejemplares ³
<i>Parapoxvirus</i>	-	-	-	ORFV
No clasificado	-	-	-	CRV

¹HSPV contiene un gen de R1 fragmentado.

²FPV contiene un gen de R2 fragmentado.

“+” Indica la presencia y “-” indica la ausencia de genes de ribonucleótido reductasa (RR) o timidina quinasa (TK) indicados en genomas víricos.

³Se proporcionan especies ejemplares de los géneros indicados.

Abreviaturas: VACV, virus vaccinia; HSPV, virus de viruela equina; TATV, taterapoxvirus; VARV, virus variola; SPXV, virus de la viruela porcina; virus tanapox; virus de enfermedad de tipo yaba; MYXV, virus de mixoma; SFV, virus de fibroma de Shope; GTPV, virus de viruela de cabra; SPPV, virus de viruela de oveja; LSDV, virus de dermatosis nodular contagiosa; DPV, virus de viruela de ciervos; FPV, virus de viruela aviar; CNPV, virus de viruela de canario; MCV, molusco contagioso; ORFV, virus de orf; CRV, virus de viruela de cocodrilos.

Tabla 4. Lista de tipos de cánceres que sobreexpresan proteínas RR.

Tipo de Cáncer	Subunidad Sobreexpresada	Línea Celular (o Aislado Clínico)	Referencia
Cáncer de Mama	RR2	MCF7, T47D, MDA-231	(44)
Carcinoma Hepatocelular	RR1, RR2	Aislado Clínico	(36)
Cáncer Pancreático	RR2	PANC-1, CAPAN-2	(9, 10)
Melanoma	RR2	Aislado Clínico	(22)
Esofágico y gástrico	RR2	Aislado Clínico	(22)

Tabla 5. Lista de secuencias.

SEQ NO:	ID	Gen	Secuencia
1		Subunidad pequeña de ribonucleótido reductasa (virus Vaccinia WR) número de referencia de Genbank AA089322	MEPTLAPNPNRFVIFPIQYYDIWNMYKKAESFWTVEEV DISKDINDWNKLTPEDEKYFIKHVLAFFAASD GIVNENLAERFCTEVQITEARCFYGFQMAIENIHSEMYS LLIDTYVKDSNEKNYLFNAIETMPCVKKKAD WAQKWIHDSAGYGERLIAFAAVEGIFSGSFASIFWLKK RGLMPGLTFSNELISRDEGLHCDFACL MFKH LLHPPSEETVRSIITDAVSIEQEFLTAALPVKLIGMNCE MMKTYIEFVADRLISELGFKKIYNVTNPFDF MENISLEGKTNFFEKRVGEYQKMGVMSQEDNHFSLDVDF
2		Cebador directo para secuencias que flanquean el lado “F5L” del locus F4L	5'-ACTAGTTAGATAAATGGAAATATCTT-3'
3		Cebador inverso para secuencias que flanquean el lado “F5L” del locus F4L	5'-AAGCTTTCAGTTATCTATATGCCTGT-3'
4		Cebador directo para secuencias que flanquean el lado “F3L” del locus F4L así como los últimos 30 pb de la ORF de F4L	5'-CCGCGGAATCATTTTTCTTTAGATGT-3'
5		Cebador inverso para secuencias que flanquean el lado “F3L” del locus F4L así como los últimos 30 pb de la ORF de F4L	5'-AGATCTTATGATGTCATCTTCCAGTT-3'
6		Cebador directo para secuencias que flanquean el lado “I5L” del locus I4L	5'-ACTAGTGGAAGGGTATCTATACTTATAGAA TAATC-3'
7		Cebador inverso para secuencias que flanquean el lado “I5L” del locus I4L	5' -GTCGACTTTTGTGGTGAATAAAAAAATTA TTTAAC-3'
8		Cebador directo para secuencias que flanquean el lado “I3L” del locus I4L	5'-CCGCGGGGTTAAACAAAAACATTTTTATTCTC-3'

ES 2 626 657 T3

SEQ NO:	ID Gen	Secuencia
9	Cebador inverso para secuencias que flanquean el lado "13L" del locus 14L	5'-AGATCTGTTTAGTCTCTCCTTCCAAC-3'
10	Cebador directo para ORF de F4L marcada con His ₆	5'-AAGCTTATGCATCACCATCACCATCACATG GAACCCATCCTTGCACC-3'
11	Cebador inverso para ORF de F4L marcada con His ₆	5'-GCGGCCGCTTAAAAGTCAACATCTAAAG-3'
12	Cebador directo para generar ORF de F4L marcada con His ₆ que codifica la sustitución Y300F	5'- CGAAAAACGTGTGGGTGAATTCCAAAAAATGGGAGTTATG TC-3'
13	Cebador inverso para generar ORF de F4L marcada con His ₆ que codifica la sustitución Y300F	5'- GACATAACTCCCATTTTTTGAATTCACCCACACGTTTTTC G-3'
14	Cebador directo para amplificación por PCR de una ORF de 14L marcada con Flag a partir de un vector pCR2.1 que contiene un inserto de ORF de 14L marcada con Flag	5'-GTCGACATGGACTACAAGGACGACGATG ACAAG-3'
15	Cebador inverso para amplificación por PCR de una ORF de 14L marcada con Flag a partir de un vector pCR2.1 que contiene un inserto de ORF de 14L marcada con Flag	5'-GCGGCCGCTTAACCACTGCATGATGTACAGATTTTCGG-3'
16	Cebador directo para generar un inserto de ORF de 14L marcado con Flag para vector pCR2.1	5'- AAGCTTATGGACTACAAGGACGACGATGACAAGATGTTTG TCATTAACGAAATG-3'
17	Cebador inverso para generar un inserto de ORF de 14L marcado con Flag para vector pCR2.1	5'-GCGGCCGCTTAACCACTGCATGATGTACAGATTTTCGG-3'
18	Cebador directo para amplificación por PCR de una ORF de HR1 marcada con Flag a partir de un vector pCR2.1 que contiene un inserto de ORF de HR1 marcada con Flag	5'-GTCGACATGGACTACAAGGACGACGAT GACAAG-3'
19	Cebador inverso para amplificación por PCR de una ORF de HR1 marcada con Flag a partir de un vector pCR2.1 que contiene un inserto de ORF de HR1 marcada con Flag	5'-GCGGCCGCTCAGGATCCACACATCAGA CATT-3'
20	Cebador directo para generar un inserto de ORF de HR1 marcada con Flag para vector pCR2.1	5'-CCAGTGTGGTGGATGGACTACAAGGACG ACGATGACAAGATGCATGTGATCAAGCGAGATG-3'
21	Cebador inverso para generar un inserto de ORF de HR1 marcada con Flag para vector pCR2.1	5'-GCGGCCGCTCAGGATCCACACATCAGACATTC-3'
22	Cebador directo para ORF de Hp53R2 marcada con His ₆ a partir de ADNc de Hp53R2	5'-GGATCCATGCATCACCATCACCATCACATGG GGGACCCGGAAGGCCG-3'
23	Cebador inverso para ORF de Hp53R2 marcada con His ₆ a partir de ADNc de Hp53R2	5'-GCGGCCGCTTAAAAATCTGCATCCAAGG-3'

Ejemplo 2

Anticuerpo monoclonal de ratón anti F4 de VACV. Se generaron anticuerpos monoclonales de ratón usando proteína R2 de virus ectromelia de longitud completa con un marcador de His₆ C terminal como el antígeno.

5 Para producir anticuerpos monoclonales, pueden recogerse células productoras de anticuerpos (linfocitos) de un animal inmunizado y fusionarse con células de mieloma por procedimientos de fusión de células somáticas convencionales inmortalizando de este modo estas células y produciendo células de hibridoma. Dichas técnicas se conocen bien en este campo (por ejemplo, la técnica de hibridoma originalmente desarrollada por Kohler y Milstein
10 (Nature 256: 495-497 (1975)) así como otras técnicas tales como la técnica de hibridoma de linfocitos B humanos (Kozbor et al., Immunol. Today 4: 72 (1983)), la técnica de hibridoma de VEB para producir anticuerpos monoclonales humanos (Cole et al., Methods Enzymol, 121: 140-67 (1986)), y exploración de bibliotecas de anticuerpos combinatorias (Huse et al., Science 246: 1275 (1989)). Las células de hibridoma pueden explorarse inmunoquímicamente con respecto a producción de anticuerpos específicamente reactivos con el péptido y los anticuerpos monoclonales pueden aislarse. Ya que la proteína R2 de ectromelia es >98 % idéntica a la proteína F4
15 de VACV, el anticuerpo resultante también reconoce F4 de VACV. Este anticuerpo es adecuado para transferencia de Western, inmunoprecipitación e inmunofluorescencia.

Ejemplo 3

20 **Estudios *in vitro*.** La replicación *in vitro* (es decir en cultivo celular) de cepas mutantes de RR se está evaluando en diversas líneas celulares de cáncer humano que se usan como modelos para el estudio de una diversidad de tipos tumorales incluyendo, pero sin limitación, gliomas (por ejemplo líneas celulares U118 y U87), cánceres de mama (por ejemplo líneas celulares MCF7 y T47D) y carcinomas hepatocelulares (por ejemplo Hep3B). Se sabe que
25 muchas de estas líneas celulares sobreexpresan componentes de RR celulares (véase Tabla 4) y los niveles de expresión de componentes RR celulares se están evaluando por transferencia de Western y se comparan con líneas celulares no transformadas de un tipo tisular similar cuando sea posible.

Ejemplo 4

30 **Estudios de modelos tumorales humanos *in vivo*.** Para correlacionar observaciones realizadas a partir de estudios *in vitro*, se están estableciendo modelos tumorales humanos en ratones desnudos. Se han usado previamente líneas celulares PANC-1 (18, 26) y MDA-231 (32) para establecer tumores humanos en ratones desnudos y estos estudios evalúan la capacidad de diversas cepas mutantes para RR para infectar y destruir tejido
35 tumoral en estos animales. La selectividad de estas cepas mutantes para tejido tumoral con respecto a tejido normal de ratón también se está evaluando.

Ejemplo 5

40 **Derivación de supresiones/mutaciones de RR en otras cepas de vaccinia.** Las cepas de RR mutantes descritas en la presente divulgación hasta la fecha se han generado en la cepa WR de vaccinia. Esta cepa es neurovirulenta y altamente patógena en ratones y probablemente sería un fondo inadecuado para el desarrollo de cepas de RR mutantes para su uso en viroterapia oncolítica humana. Por lo tanto, las diversas supresiones/mutaciones de *I4L*, *F4L* y *J2R* se están desarrollando en el genoma de la cepa de vacunación china de vaccinia, Tian Tian [19];
45 referencia de Genbank: AF095689] que es probablemente un fondo más adecuado para tratamientos clínicos. La cepa Tian Tian tiene virulencia atenuada en comparación con la cepa WR y se usó rutinariamente para vacunar a individuos en China antes del cese de la vacunación de la viruela en 1980 (15). Por lo tanto, se predice que la cepa Tian Tian sea un fondo más adecuado con respecto a seguridad clínica para el desarrollo de las cepas anteriormente mencionadas para viroterapia oncolítica en seres humanos.

Ejemplo 6

Susceptibilidad de tipos de cáncer humanos a poxvirus oncolíticos mutantes para RR y uso en terapia vírica oncolítica. Las cepas que expresan F4 Y300F y/o $\Delta F4L$ se usan como un componente de terapia combinada, en el
55 que los pacientes se tratan en primero lugar con HU (o gemcitabina), seguido del tratamiento con una de estas cepas de VACV oncolíticas para dirigirse a tejido tumoral resistente a fármacos restante. En primer lugar, se preexplora el tejido tumoral de mama, por ejemplo, de una biopsia de paciente para determinar si el tejido tumoral responderá bien al tratamiento oncolítico usando las cepas de vaccinia que expresan F4 Y300F y/o $\Delta F4L$. Después se detecta la expresión de RR celular en la muestra de tejido tumoral de mama y se compara con los niveles de
60 expresión de RR celular en tejido de mama normal usando RT-PCR rápida y análisis cuantitativo automático. Como alternativa, la expresión de RR celular en muestras tisulares puede determinarse detectando niveles de proteínas RR usando, por ejemplo, transferencias de Western, y/o detectando transcritos de subunidades de RR usando por ejemplo RT-PCR. Si se descubre que la expresión de RR celular de la muestra de tejido tumoral está elevada en comparación con el tejido normal, el paciente es un buen candidato para la terapia combinada descrita
65 anteriormente que incluye viroterapia oncolítica usando las cepas de vaccinia que expresan F4 Y300F y/o $\Delta F4L$.

Un experto en la materia entenderá que esta terapia combinada es eficaz en una amplia serie de tipos de cáncer humanos, incluyendo, cánceres con niveles de expresión celular de RR aumentados.

Referencias

- 5 1. Andrei, G., D. B. Gammon, P. Fiten, E. De Clercq, G. Opdenakker, R. Snoeck, y D. H. Evans. 2006. Cidofovir resistance in vaccinia virus is linked to diminished virulence in mice. *J Virol* 80:9391-401.
2. Angelova, A. L., M. Aprahamian, S. P. Grekova, A. Hajri, B. Leuchs, N. A. Giese, C. Dinsart, A. Herrmann, G. Balboni, J. Rommelaere, y Z. Raykov. 2009. Improvement of gemcitabine-based therapy of pancreatic carcinoma by means of oncolytic parvovirus H-1 PV. *Clin Cancer Res* 15:511-9.
- 10 3. Chabes, A. L., C. M. Pflieger, M. W. Kirschner y L. Thelander. 2003. Mouse ribonucleotide reductase R2 protein: a new target for anaphase-promoting complex-Cdh1-mediated proteolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:3925-9.
4. Chakrabarti, S., J. R. Sisler y B. Moss. 1997. Compact, synthetic, vaccinia virus early/late promoter for protein expression. *Biotechniques* 23:1094-7.
- 15 5. Chen, Y., D. Donald, K. Savin, P. J. Presidente y D. Hartman. 2005. *Haemonchus contortus*: molecular cloning, sequencing, and expression analysis of the gene coding for the small subunit of ribonucleotide reductase. *Exp Parasitol* 111:250-4.
6. Child, S. J., G. J. Palumbo, R. M. Buller, y D. E. Hruby. 1990. Insertional inactivation of the large subunit of ribonucleotide reductase encoded by vaccinia virus is associated with reduced virulence in vivo. *Virology* 174:625-9.
7. Chimpoy, K., y C. K. Mathews. 2001. Mouse ribonucleotide reductase control: influence of substrate binding upon interactions with allosteric effectors. *J Biol Chem* 276:7093-100.
8. Cihlar, T., y M. S. Chen. 1996. Identification of enzymes catalyzing two-step phosphorylation of cidofovir and the effect of cytomegalovirus infection on their activities in host cells. *Mol Pharmacol* 50:1502-10.
- 25 9. Duxbury, M. S., H. Ito, E. Benoit, M. J. Zinner, S. W. Ashley y E. E. Whang. 2004. Retrovirally mediated RNA interference targeting the M2 subunit of ribonucleotide reductase: A novel therapeutic strategy in pancreatic cancer. *Surgery* 136:261-9.
10. Duxbury, M. S., H. Ito, M. J. Zinner, S. W. Ashley y E. E. Whang. 2004. RNA interference targeting the M2 subunit of ribonucleotide reductase enhances pancreatic adenocarcinoma chemosensitivity to gemcitabine. *Oncogene* 23:1539-48.
- 30 11. Dvoracek, B., y T. Shors. 2003. Construction of a novel set of transfer vectors to study vaccinia virus replication and foreign gene expression. *Plasmid* 49:9-17.
12. Engstrom, Y., S. Eriksson, I. Jildevik, S. Skog, L. Thelander y B. Tribukait. 1985. Cell cycle-dependent expression of mammalian ribonucleotide reductase. Differential regulation of the two subunits. *J Biol Chem* 260:9114-6.
13. Engstrom, Y., y B. Rozell. 1988. Immunocytochemical evidence for the cytoplasmic localization and differential expression during the cell cycle of the M1 and M2 subunits of mammalian ribonucleotide reductase. *EMBO J* 7:1615-20.
- 40 14. Engstrom, Y., B. Rozell, H. A. Hansson, S. Stemme y L. Thelander. 1984. Localization of ribonucleotide reductase in mammalian cells. *EMBO J* 3:863-7.
15. Fang, Q., L. Yang, W. Zhu, L. Liu, H. Wang, W. Yu, G. Xiao, P. Tien, L. Zhang y Z. Chen. 2005. Host range, growth property, and virulence of the smallpox vaccine: vaccinia virus Tian Tan strain. *Virology* 335:242-51.
16. Horig, H., D. S. Lee, W. Conkright, J. Divito, H. Hasson, M. LaMare, A. Rivera, D. Park, J. Tine, K. Guito, K. W. Tsang, J. Schlom y H. L. Kaufman. 2000. Phase I clinical trial of a recombinant canarypoxvirus (ALVAC) vaccine expressing human carcinoembryonic antigen and the B7.1 co-stimulatory molecule. *Cancer Immunol Immunother* 49:504-14.
- 45 17. Hu, Y., J. Lee, J. A. McCart, H. Xu, B. Moss, H. R. Alexander y D. L. Bartlett. 2001. Yaba-like disease virus: an alternative replicating poxvirus vector for cancer gene therapy. *J Virol* 75:10300-8.
18. Iwaki, K., K. Shibata, M. Ohta, Y. Endo, H. Uchida, M. Tominaga, R. Okunaga, S. Kai y S. Kitano. 2008. A small interfering RNA targeting proteinase-activated receptor-2 is effective in suppression of tumor growth in a Panc1 xenograft model. *Int J Cancer* 122:658-63.
19. Jin, Q., Chen, N. H., Chen, S. X., Huang, J., Feng, Z. H., Yuan, J. S., Jin, D.Y., Bai, H. D., Hou, Y.D. 1997. Characterization of the complete genomic sequence of the vaccinia virus Tian Tian strain. *Sci. China* 27:562-567.
- 55 20. Kaufman, H. L., H. J. Lenz, J. Marshall, D. Singh, C. Garrett, C. Cripps, M. Moore, M. von Mehren, R. Dalfen, W. J. Heim, R. M. Conry, W. J. Urba, A. B. Benson, 3rd, M. Yu, J. Caterini, S. Kim-Schulze, M. Debenedette, D. Salha, T. Vogel, I. Elias y N. L. Berinstein. 2008. Combination chemotherapy and ALVAC-CEA/B7.1 vaccine in patients with metastatic colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 14:4843-9.
21. Kern, E. R., M. N. Prichard, D. C. Quenelle, K. A. Keith, K. N. Tiwari, J. A. Maddry y J. A. Secrist, 3rd. 2009. Activities of certain 5-substituted 4'-thiopyrimidine nucleosides against orthopoxvirus infections. *Antimicrob Agents Chemother* 53:572-9.
- 60 22. Kolesar, J., W. Huang, J. Eickhoff, K. Hahn, D. Alberti, S. Attia, W. Schelman, K. Holen, A. Traynor, P. Ivy y G. Wilding. 2009. Evaluation of mRNA by Q-RT-PCR and protein expression by AQUA of the M2 subunit of ribonucleotide reductase (RRM2) in human tumors. *Cancer Chemother Pharmacol* 64:79-86.
- 65 23. Lee, M. S., J. M. Roos, L. C. McGuigan, K. A. Smith, N. Cormier, L. K. Cohen, B. E. Roberts y L. G. Payne.

1992. Molecular attenuation of vaccinia virus: mutant generation and animal characterization. *J Virol* 66:2617-30.
24. Lin, Y. C., J. Li, C. R. Irwin, H. Jenkins, L. Delante y D. H. Evans. 2008. Vaccinia virus DNA ligase recruits cellular topoisomerase II to sites of viral replication and assembly. *J Virol* 82:5922-32.
25. Manual, B. C. A. C. D. 2006. Hydroxyurea Information Sheet, (http://www.bccancer.bc.ca/NR/rdon-lyres/D83AB234-30D8-4489-B4DE-41FAA5B81743/19225/Hydroxyureamonograph_1Dec06.pdf).
- 5 26. McLeod, E. J., A. D. Beischer, J. S. Hill y A. H. Kaye. 1997. Multicellular tumor spheroids grown from pancreatic carcinoma cell lines: use as an orthotopic xenograft in athymic nude mice. *Pancreas* 14:237-48.
27. Pontarin, G., A. Fijolek, P. Pizzo, P. Ferraro, C. Rampazzo, T. Pozzan, L. Thelander, P. A. Reichard y V. Bianchi. 2008. Ribonucleotide reduction is a cytosolic process in mammalian cells independently of DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:17801-6.
- 10 28. Rosell, R., E. Felip, M. Taron, J. Majo, P. Mendez, M. Sanchez-Ronco, C. Queralt, J. J. Sanchez y J. Maestre. 2004. Gene expression as a predictive marker of outcome in stage IIB-III A-III B non-small cell lung cancer after induction gemcitabine-based chemotherapy followed by resectional surgery. *Clin Cancer Res* 10:4215s-4219s.
29. Roseman, N. A., y M. B. Slabaugh. 1990. The vaccinia virus HindIII F fragment: nucleotide sequence of the left 6.2 kb. *Virology* 178:410-8.
- 15 30. Rova, U., A. Adrait, S. Potsch, A. Graslund y L. Thelander. 1999. Evidence by mutagenesis that Tyr(370) of the mouse ribonucleotide reductase R2 protein is the connecting link in the intersubunit radical transfer pathway. *J Biol Chem* 274:23746-51.
31. Saban, N., y M. Bujak. 2009. Hydroxyurea and hydroxamic acid derivatives as antitumor drugs. *Cancer Chemother Pharmacol* 64:213-21.
- 20 32. Seymour, L. W., M. Bazan-Peregrino, R. Carlisle, R. Hernandez-Alcoceba, R. Iggo, K. Homicsko, G. Hallden, V. Mautner, J. Shen y K. Fisher. 2008. Comparison of Molecular Strategies for Breast Cancer Virotherapy using Oncolytic Adenovirus. *Hum Gene Ther*.
33. Slabaugh, M. B., y C. K. Mathews. 1986. Hydroxyurea-resistant vaccinia virus: overproduction of ribonucleotide reductase. *J Virol* 60:506-14.
- 25 34. Souglakos, J., I. Boukovinas, M. Taron, P. Mendez, D. Mavroudis, M. Tripaki, D. Hatzidaki, A. Koutsopoulos, E. Stathopoulos, V. Georgoulas y R. Rosell. 2008. Ribonucleotide reductase subunits M1 and M2 mRNA expression levels and clinical outcome of lung adenocarcinoma patients treated with docetaxel/gemcitabine. *Br J Cancer* 98:1710-5.
- 30 35. Stanford, M. M., y G. McFadden. 2007. Myxoma virus and oncolytic virotherapy: a new biologic weapon in the war against cancer. *Expert Opin Biol Ther* 7:1415-25.
36. Sunaga, M., T. Tomonaga, M. Yoshikawa, M. Ebara, H. Shimada, H. Saisho y F. Nomura. 2007. Gene expression of 5-fluorouracil metabolic enzymes in hepatocellular carcinoma and non-tumor tissue. *J Chemother* 19:709-15.
- 35 37. Tulman, E. R., G. Delhon, C. L. Afonso, Z. Lu, L. Zsak, N. T. Sandybaev, U. Z. Kerembekova, V. L. Zaitsev, G. F. Kutish y D. L. Rock. 2006. Genome of horsepoxvirus. *J Virol* 80:9244-58.
38. Wang, X., A. Zhenchuk, K. G. Wiman y F. Albertioni. 2009. Regulation of p53R2 and its role as potential target for cancer therapy. *Cancer Lett* 276:1-7.
39. Wasilenko, S. T., T. L. Stewart, A. F. Meyers y M. Barry. 2003. Vaccinia virus encodes a previously uncharacterized mitochondrial-associated inhibitor of apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:14345-50.
- 40 40. Watanabe, I., H. Kasuya, N. Nomura, T. Shikano, T. Shiota, N. Kanazumi, S. Takeda, S. Nomoto, H. Sugimoto y A. Nakao. 2008. Effects of tumor selective replication-competent herpes viruses in combination with gemcitabine on pancreatic cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 61:875-82.
41. Woo, Y., K. J. Kelly, M. M. Stanford, C. Galanis, Y. S. Chun, Y. Fong y G. McFadden. 2008. Myxoma virus is oncolytic for human pancreatic adenocarcinoma cells. *Ann Surg Oncol* 15:2329-35.
- 45 42. Wright, J. A., T. G. Alam, G. A. McClarty, A. Y. Tagger y L. Thelander. 1987. Altered expression of ribonucleotide reductase and role of M2 gene amplification in hydroxyurea-resistant hamster, mouse, rat, and human cell lines. *Somat Cell Mol Genet* 13:155-65.
43. Xue, L., B. Zhou, X. Liu, T. Wang, J. Shih, C. Qi, Y. Heung y Y. Yen. 2006. Structurally dependent redox property of ribonucleotide reductase subunit p53R2. *Cancer Res* 66:1900-5.
- 50 44. Yun, H. J., Y. H. Cho, Y. Moon, Y. W. Park, H. K. Yoon, Y. J. Kim, S. H. Cho, Y. I. Lee, B. S. Kang, W. J. Kim, K. Park y W. Seo. 2008. Transcriptional targeting of gene expression in breast cancer by the promoters of protein regulator of cytokinesis 1 and ribonuclease reductase 2. *Exp Mol Med* 40:345-53.
45. Xiong X, Smith JL, Kim C, Huang ES, Chen MS (1996) Kinetic analysis of the interaction of cidofovir diphosphate with human cytomegalovirus DNA polymerase. *Biochem Pharmacol* 51: 1563-1567.
- 55 46. Magee WC, Hostetler KY, Evans DH (2005) Mechanism of inhibition of vaccinia virus DNA polymerase by cidofovir diphosphate. *Antimicrob Agents Chemother* 49: 3153-3162.,
47. Magee WC, Aldern KA, Hostetler KY, Evans DH (2008) Cidofovir and (S)-9-[3-hydroxy-(2-phosphonomethoxy)propyl]adenine are highly effective inhibitors of vaccinia virus DNA polymerase when incorporated into the template strand. *Antimicrob Agents Chemother* 52: 586-597.
- 60 48. Prichard MN, Keith KA, Johnson MP, Harden EA, McBrayer A, et al. (2007) Selective phosphorylation of antiviral drugs by vaccinia virus thymidine kinase. *Antimicrob Agents Chemother* 51: 1795-1803.
49. Taddie JA, Traktman P (1993) Genetic characterization of the vaccinia virus DNA polymerase: cytosine arabinoside resistance requires a variable lesion conferring phosphonoacetate resistance in conjunction with an invariant mutation localized to the 3'-5' exonuclease domain. *J Virol* 67: 4323-4336.
- 65

50. Cresawn SG, Prins C, Latner DR, Condit RC (2007) Mapping and phenotypic analysis of spontaneous isatin-beta-thiosemicarbazone resistant mutants of vaccinia virus. *Virology* 363: 319-332.

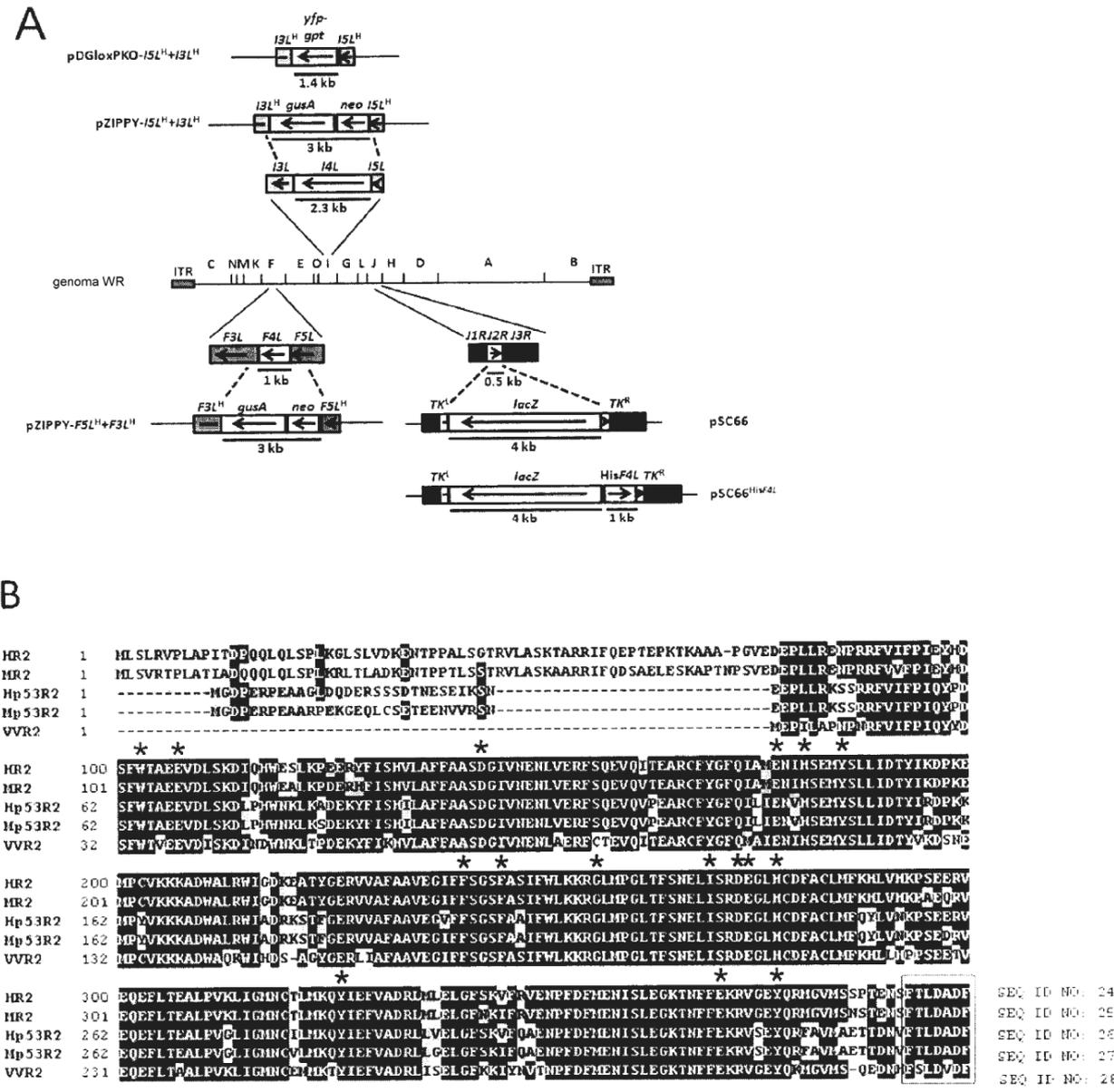
REIVINDICACIONES

1. Un poxvirus que comprende un gen de ribonucleótido reductasa (R2) pequeña funcionalmente inactivado que comprende una mutación dominante negativa, una mutación puntual o una mutación de supresión, en el que la proteína codificada por el gen de R2 funcionalmente inactivo es capaz de interactuar con subunidades de ribonucleótido reductasa (RR) celular, y en el que la proteína carece de al menos 2 aminoácidos del dominio de unión grande a ribonucleótido reductasa (R1), o en el que la proteína codificada comprende una mutación de Y300.
2. El poxvirus de la reivindicación 1, en el que la R2 funcionalmente inactivada tiene una supresión de al menos 2, al menos 5 o al menos 7 residuos aminoacídicos de la SEQ ID NO: 1 o una secuencia con al menos un 90 % de identidad con la secuencia de SEQ ID NO: 1.
3. El poxvirus de la reivindicación 1 ó 2, en el que la proteína comprende una supresión del dominio de unión a R1 correspondiente a los aminoácidos 313-319 de SEQ ID NO: 1.
4. El poxvirus de cualquier reivindicación precedente, en el que la proteína comprende una mutación Y300 y cualquier mutación de uno o más de los siguientes residuos que provocan la pérdida o reducción de la actividad catalítica de RR: W34, E38, D70, E101, H104, Y108, F167, F171, G181, I193, D196, E197, H200, Y254 y E294.
5. El poxvirus de cualquier reivindicación precedente, que es un Orthopoxvirus.
6. El poxvirus de cualquier reivindicación precedente, que es un virus vaccinia.
7. El poxvirus de cualquier reivindicación precedente, en el que el virus comprende además un gen de R1 funcionalmente inactivado, gen de la timidina quinasa y/o gen de factor de crecimiento del virus vaccinia y/o carece de uno o más genes relacionados con metabolismo de nucleótidos.
8. Una composición que comprende el poxvirus aislado de cualquier reivindicación precedente, y un diluyente o portador farmacéuticamente aceptable.
9. Un poxvirus de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-7 o una composición de acuerdo con la reivindicación 8 para uso en la inducción de muerte en una célula de trastorno neoplásico de un sujeto y/o el tratamiento de un trastorno neoplásico en un sujeto, en el que el virus es oncolítico.
10. El poxvirus o la composición para uso de acuerdo con la reivindicación 9, en el que el trastorno neoplásico se caracteriza por células con niveles aumentados de ribonucleótido reductasa en comparación con una célula normal del mismo tipo tisular.
11. El poxvirus o la composición para uso de acuerdo con la reivindicación 9 ó 10, en el que el trastorno neoplásico se selecciona de cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer hepático tal como carcinoma hepatocelular, cáncer pancreático, cáncer de piel tal como melanoma, cáncer de pulmón, cáncer esofágico, leucemia, cáncer ovárico, carcinoma epitelioide, cáncer de cabeza y cuello, gliomas y cáncer gástrico.
12. El poxvirus o la composición para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9-11, en el que el sujeto ha sido tratado previamente con quimioterapia.
13. El poxvirus o la composición para uso de acuerdo con la reivindicación 10, en el que el nivel de ribonucleótido reductasa se evalúa determinando el nivel de actividad de la ribonucleótido reductasa, el nivel de proteínas de la ribonucleótido reductasa, el nivel de ARN de la ribonucleótido reductasa o los niveles de dNTP, en el que un aumento del nivel de actividad, proteína o ARN de ribonucleótido reductasa o un aumento de los niveles de dNTP es indicativo de que la célula cancerosa o el cáncer tiene niveles aumentados de ribonucleótido reductasa.
14. El poxvirus aislado o la composición para uso de acuerdo con la reivindicación 13, en el que se evalúa una célula o una muestra del sujeto que comprende células con respecto a los niveles de ribonucleótido reductasa o los niveles de dNTP antes de la administración del poxvirus aislado o de la composición.
15. Un vector para generar un poxvirus recombinante de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 con un gen de R2 funcionalmente inactivado que codifica una proteína que carece de al menos 2 aminoácidos del dominio de unión grande a ribonucleótido reductasa (R1), o una proteína que comprende una mutación Y300, comprendiendo el vector:
 - una cadena principal de vector;
 - un ácido nucleico en 5' que comprende una secuencia flanqueante 5' de un gen de R2 genómico;
 - un casete de intercambio cadena abajo del ácido nucleico 5', el casete de intercambio unido operativamente a un promotor y que codifica una proteína que carece de al menos 2 aminoácidos del dominio de unión grande a

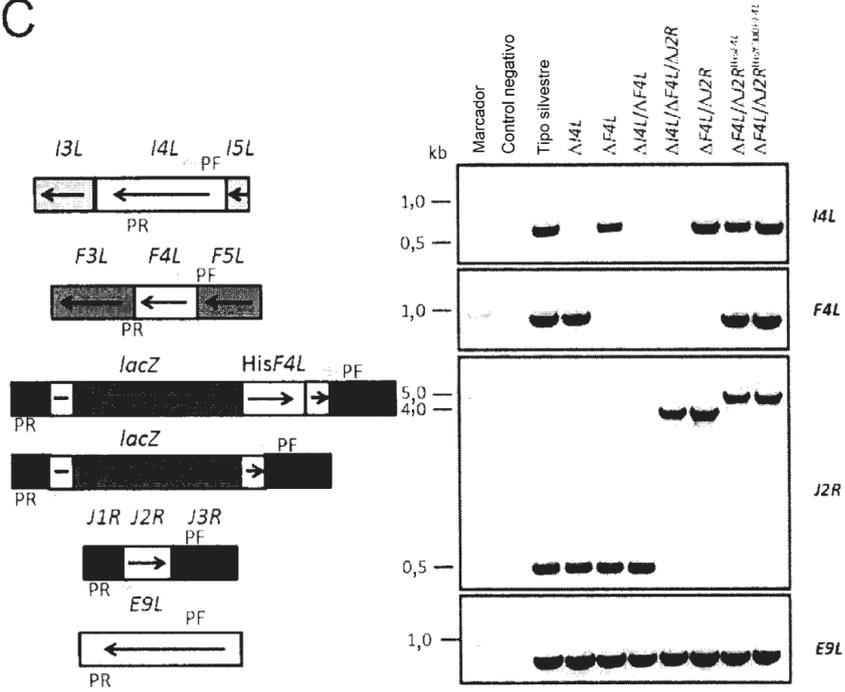
ribonucleótido reductasa (R1), o una proteína que comprende una mutación Y300; y un ácido nucleico en 3' que comprende una secuencia flanqueante 3' del gen de R2 genómico,

en el que el ácido nucleico en 5' está cadena arriba del casete de intercambio y el ácido nucleico en 3' está cadena 5 abajo del casete de intercambio.

Figura 1



C



D

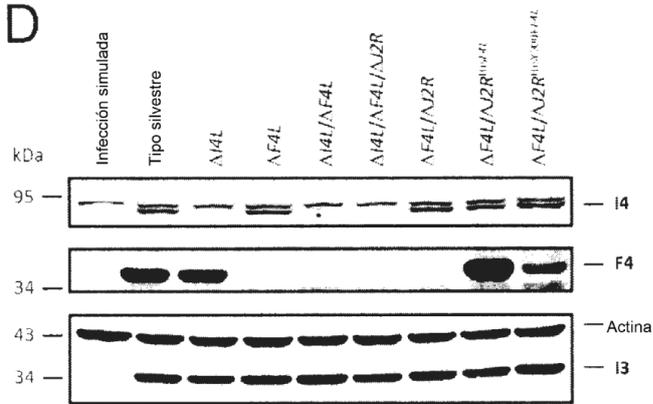


Figura 2

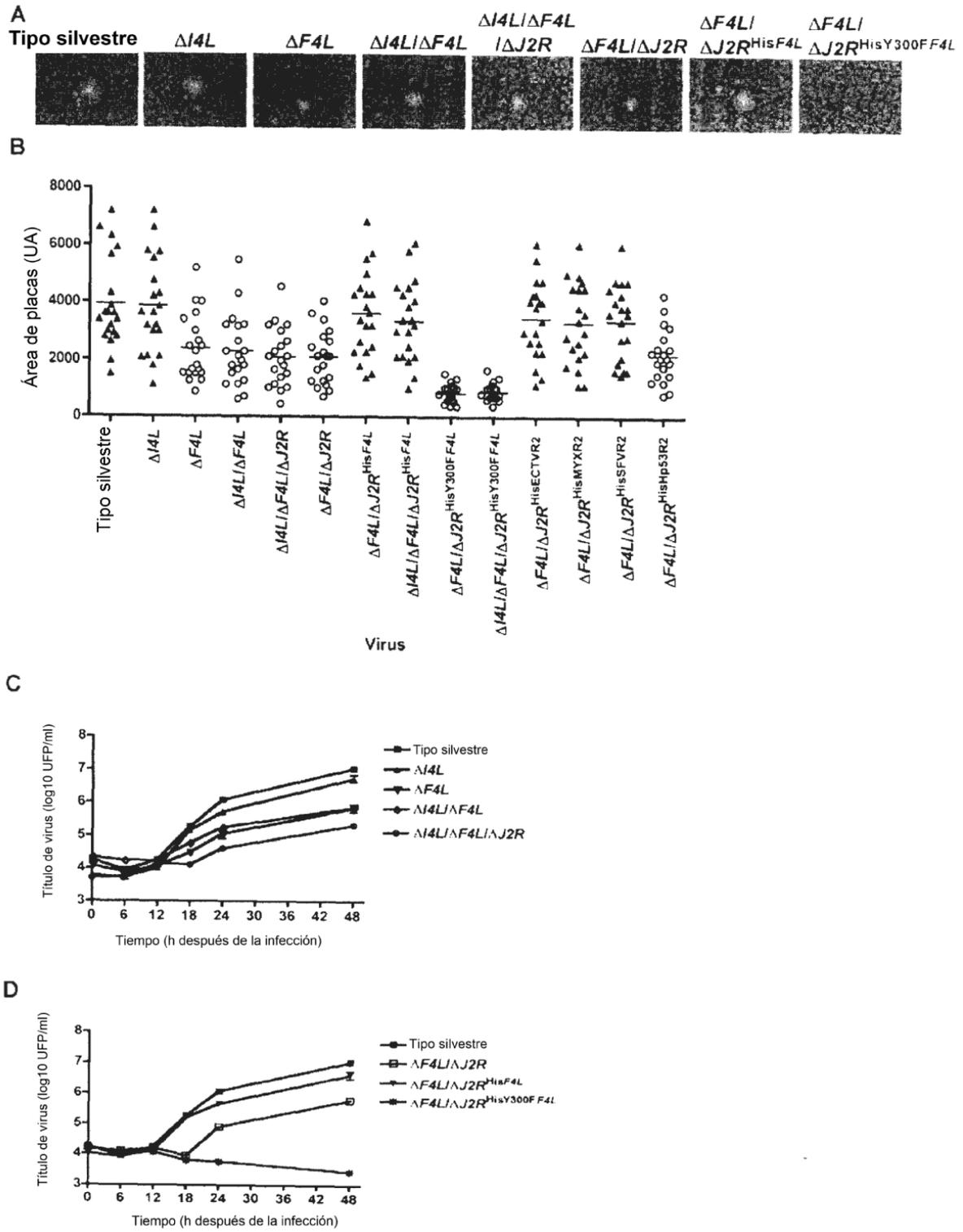
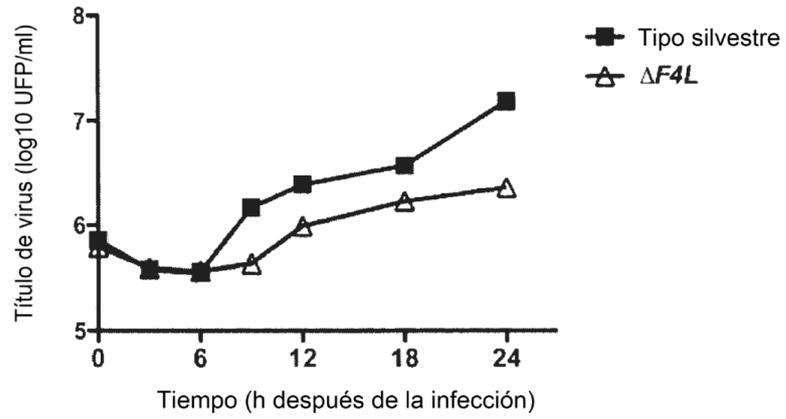


Figura 3

A



B

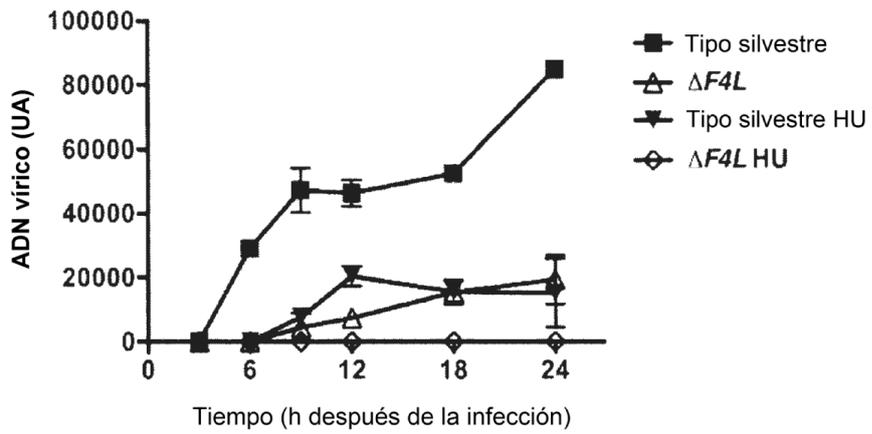


Figura 4

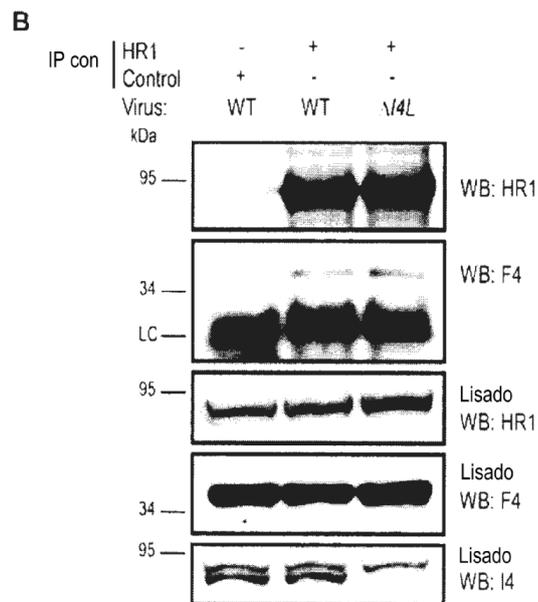
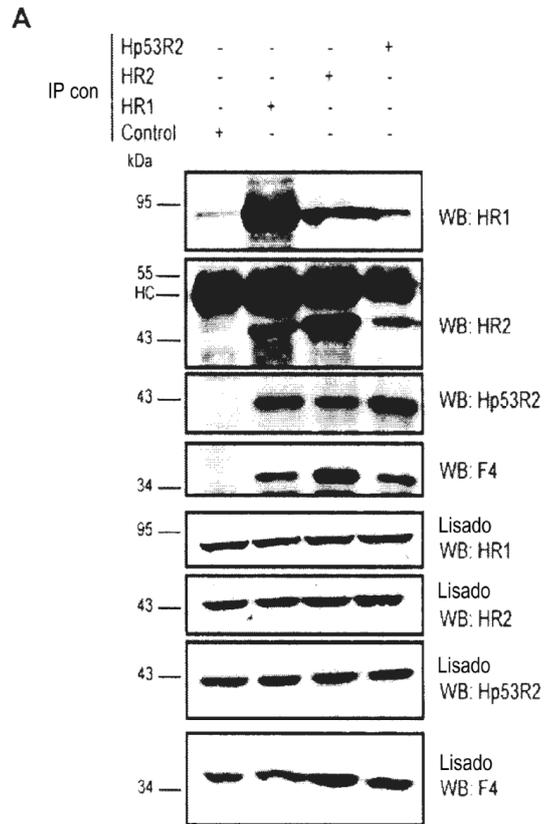
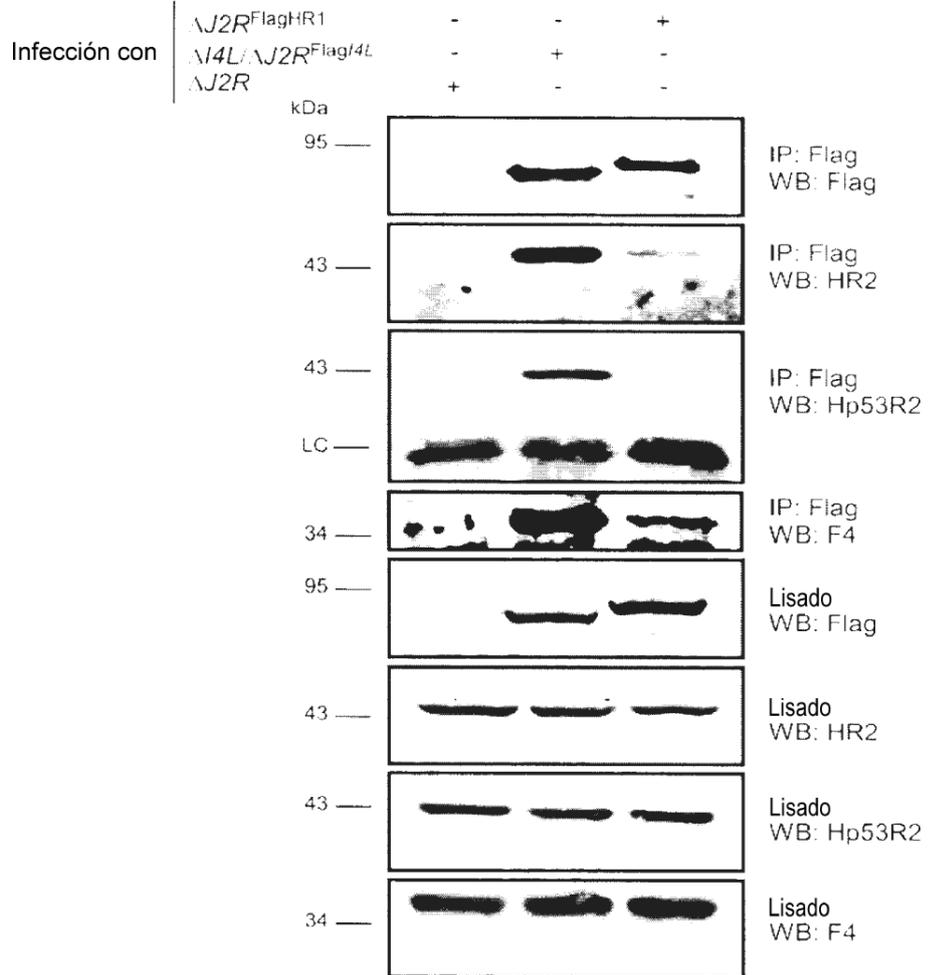


Figura 5

A



B

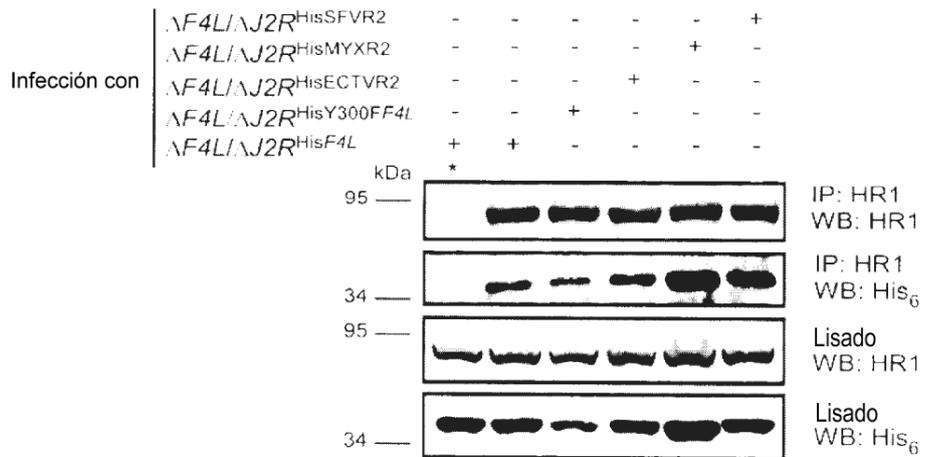


Figura 6

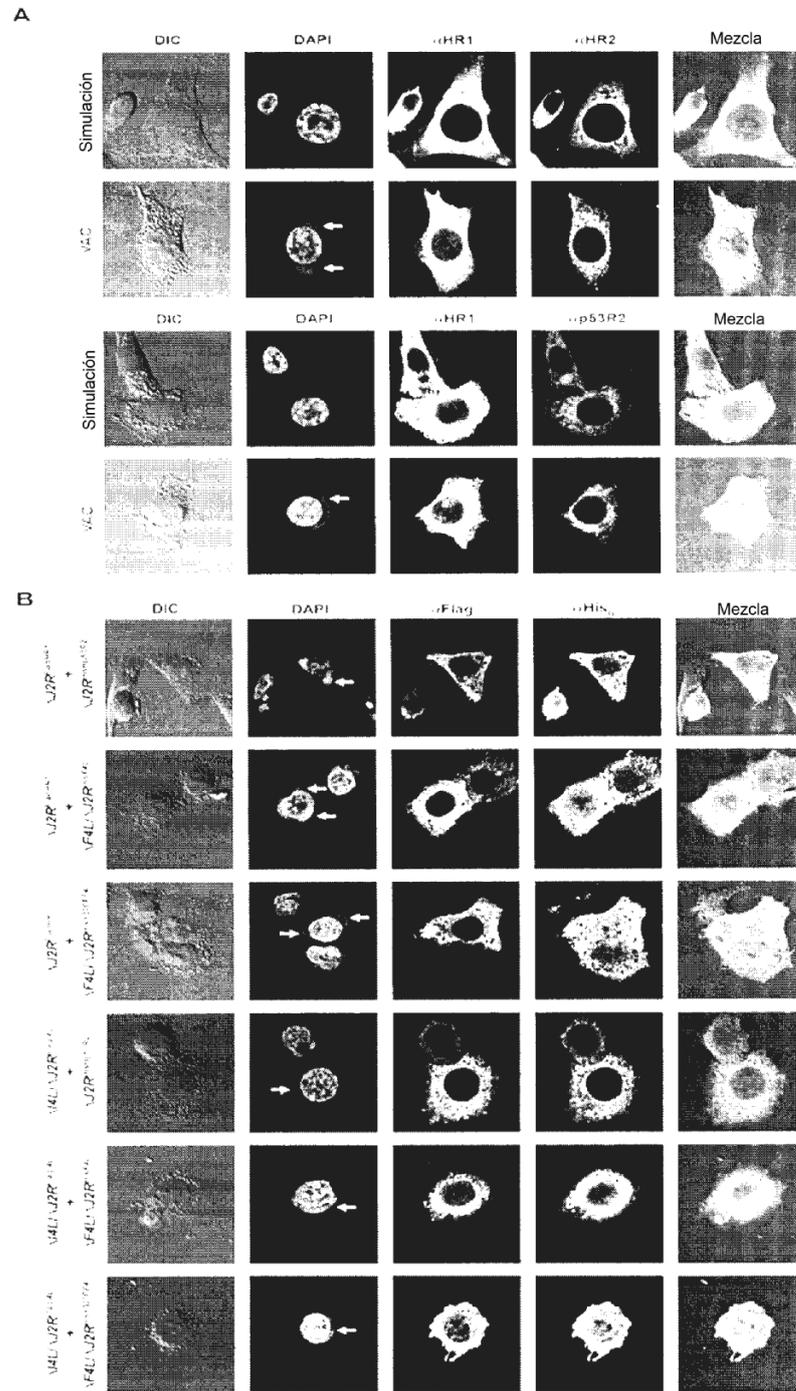
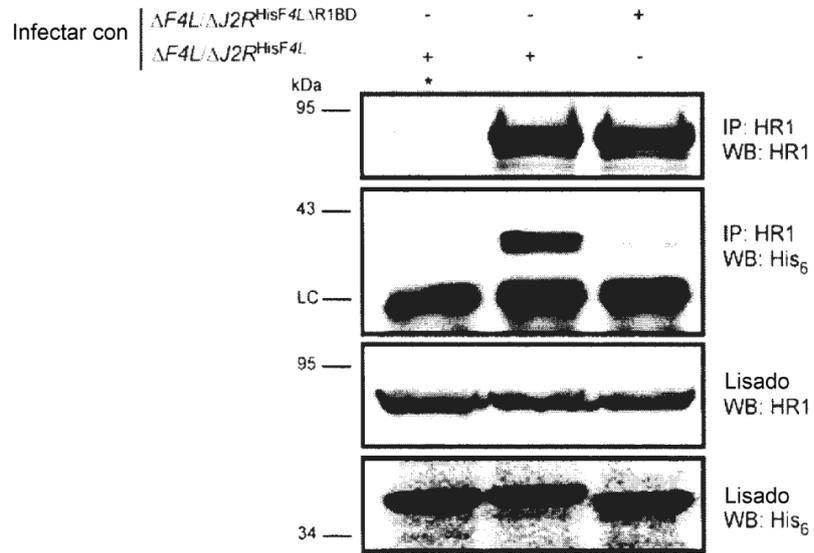


Figura 7

A



B

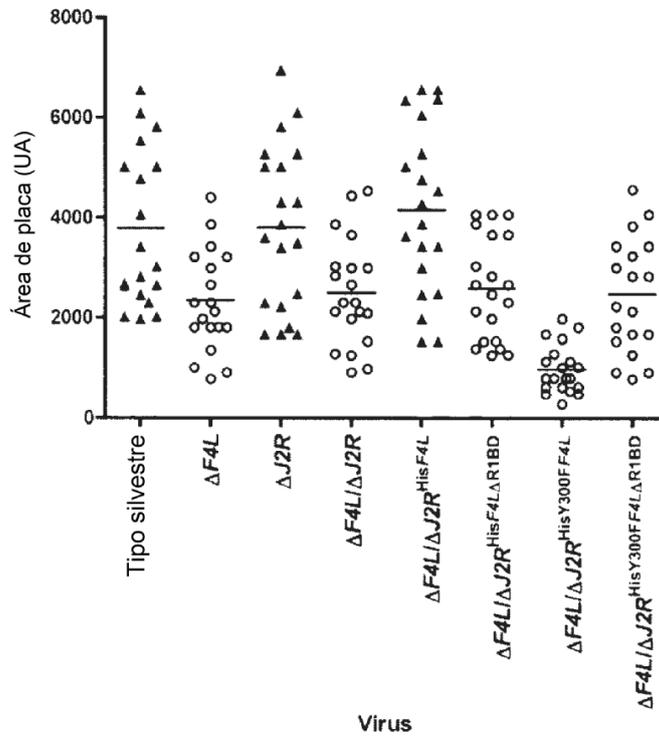
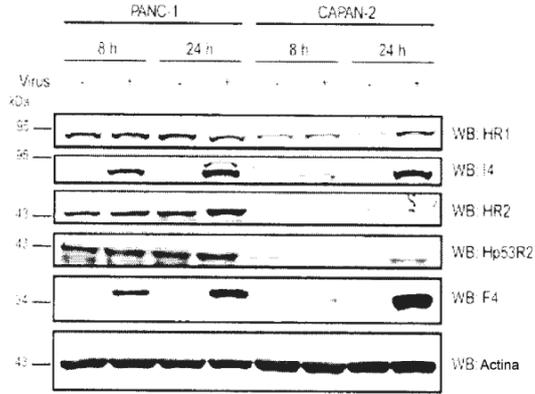
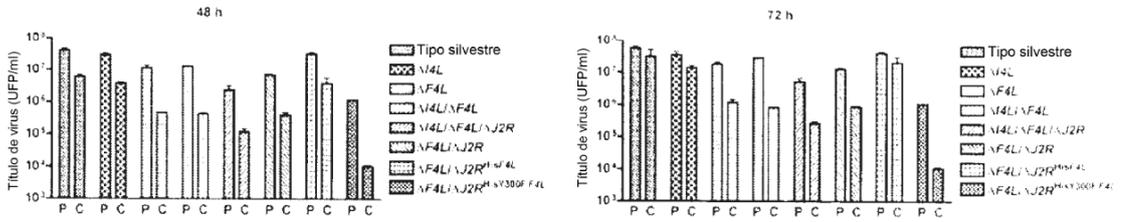


Figura 8

A



B



C

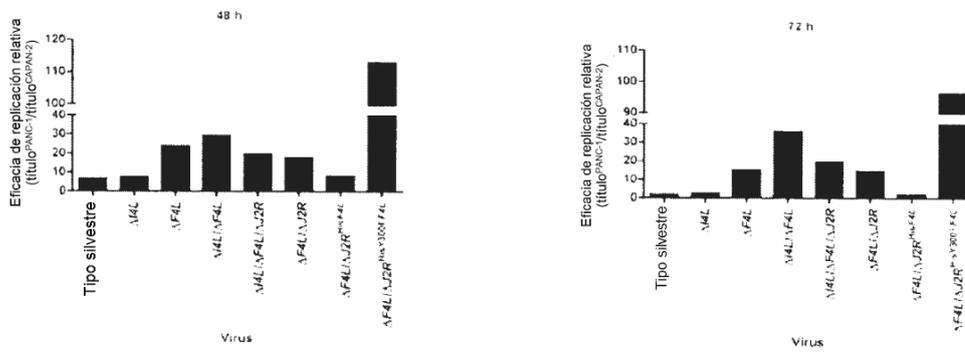
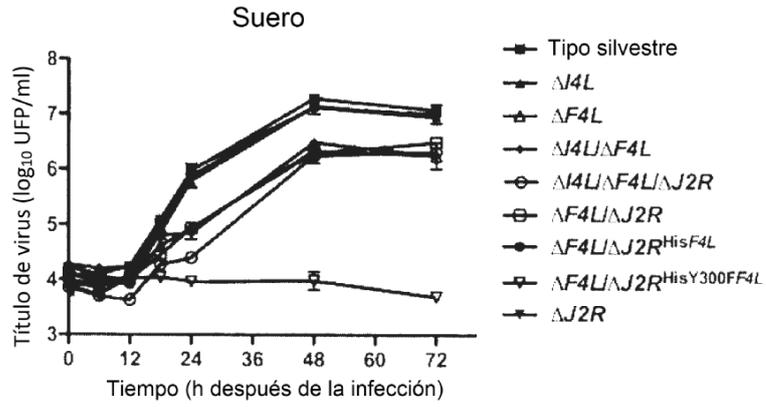
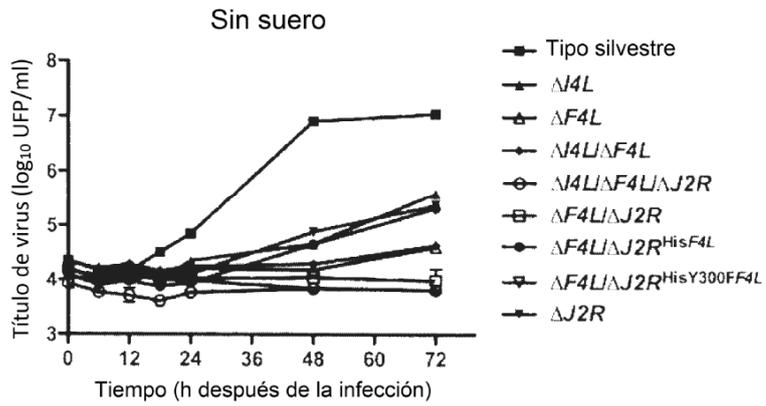


Figura 9

A



B



C

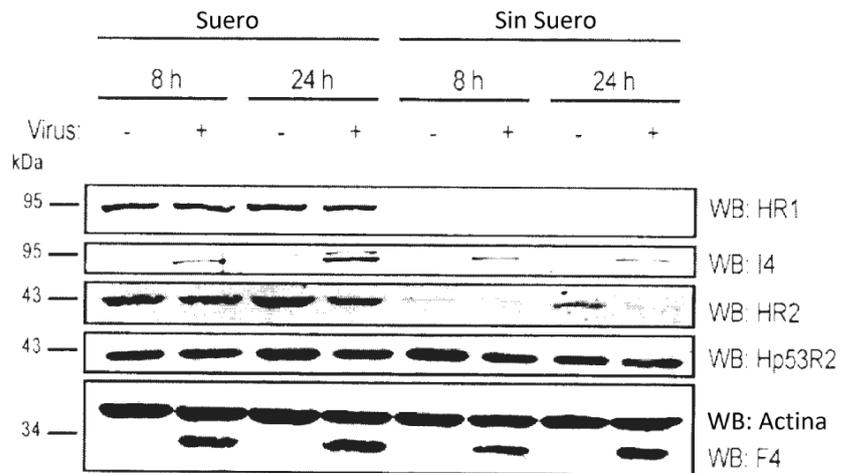
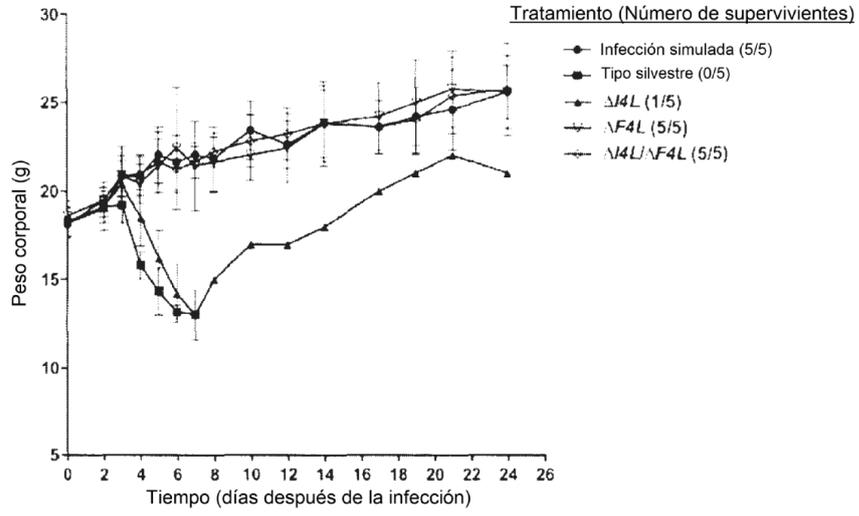


Figura 10

A



B

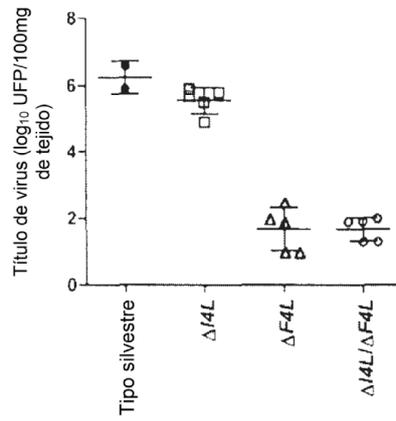
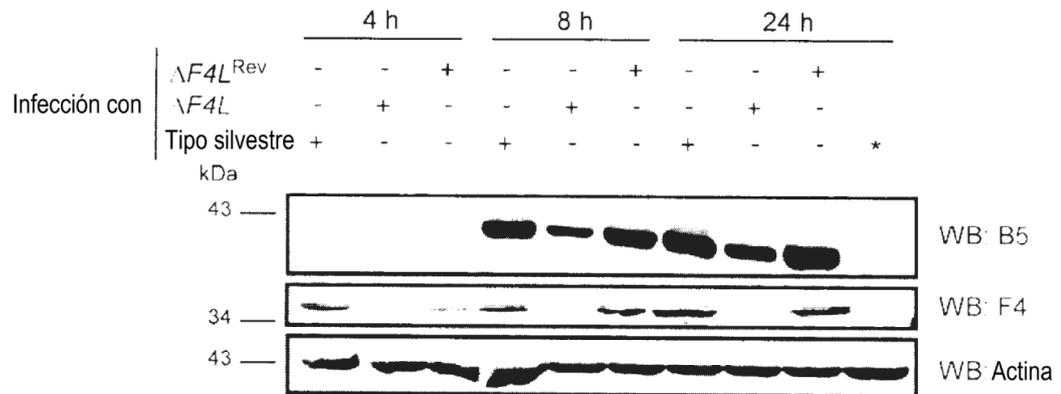


Figura 11

A



B

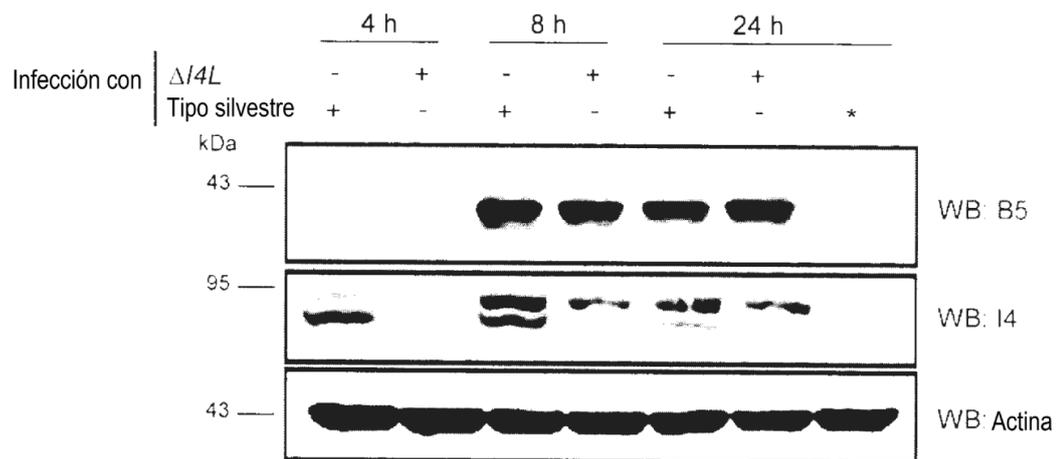


Figura 12

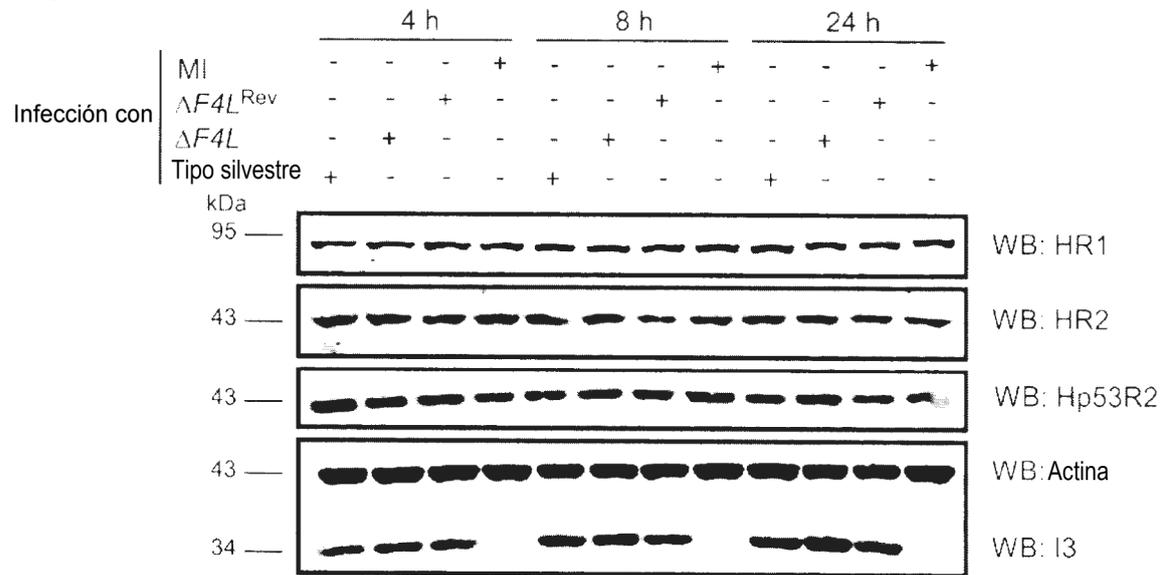


Figura 13

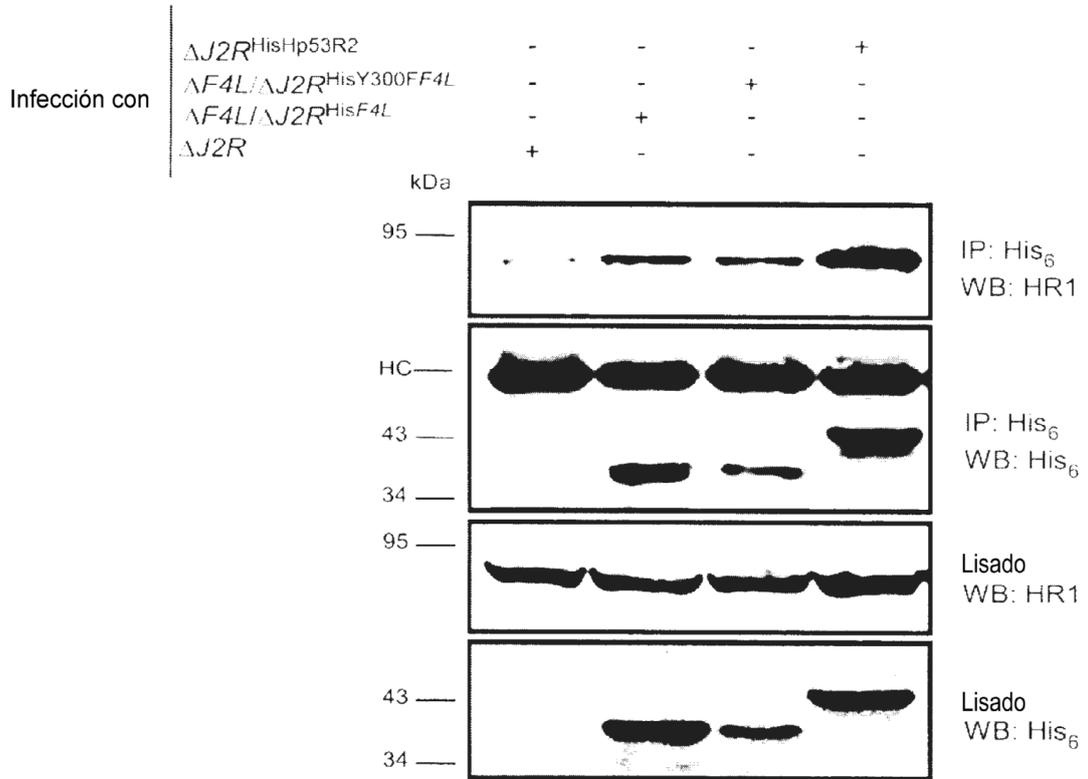
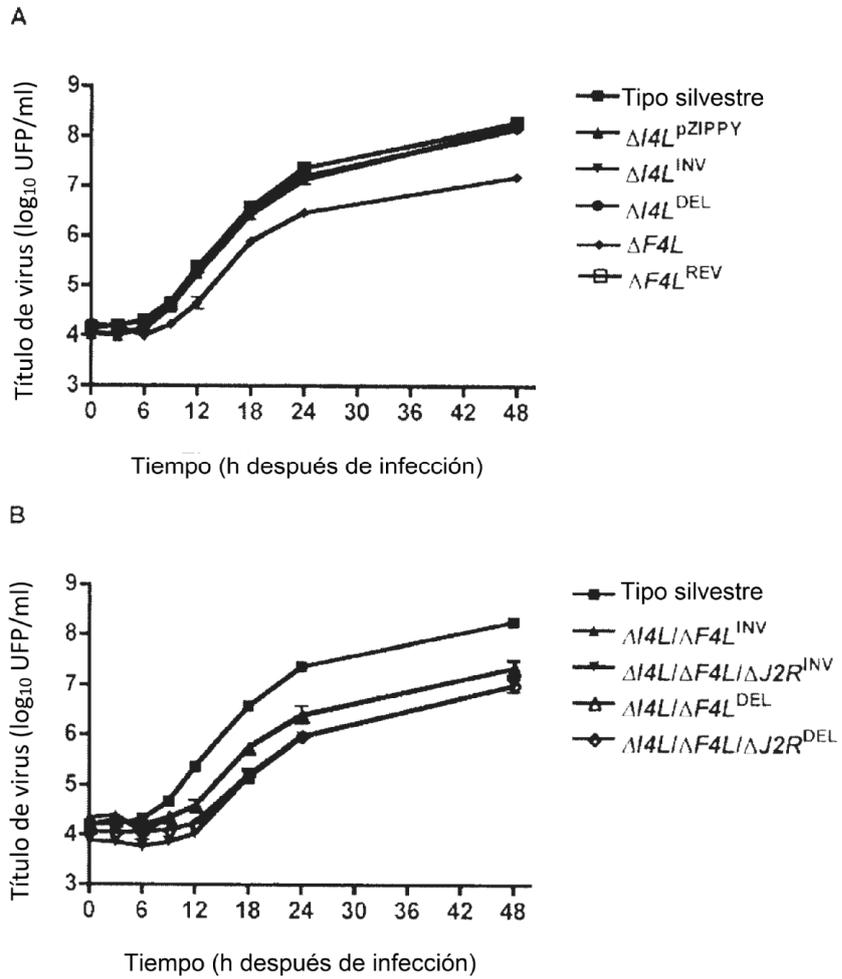


Figura 14



REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Esta lista de referencias citadas por el solicitante es únicamente para la comodidad del lector. No forma parte del documento de la patente europea. A pesar del cuidado tenido en la recopilación de las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la EPO niega toda responsabilidad en este sentido.

Documentos de patentes citados en la descripción

- WO 2009065546 A [0005]

Literatura diferente de patentes citada en la descripción

- **KARLIN ; ALTSCHUL.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1990, vol. 87, 2264-2268 [0058]
- **KARLIN ; ALTSCHUL.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1993, vol. 90, 5873-5877 [0058]
- **ALTSCHUL et al.** *J. Mol. Biol.*, 1990, vol. 215, 403 [0058]
- **ALTSCHUL et al.** *Nucleic Acids Res.*, 1997, vol. 25, 3389-3402 [0058]
- Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons, 2002 [0061]
- **SAMBROOK et al.** *Molecular Cloning: a Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001 [0061]
- **KOHLER; MILSTEIN.** *Nature*, 1975, vol. 256, 495-497 [0133]
- **KOZBOR et al.** *Immunol. Today*, 1983, vol. 4, 72 [0133]
- **COLE et al.** *Methods Enzymol*, 1986, vol. 121, 140-67 [0133]
- **HUSE et al.** *Science*, 1989, vol. 246, 1275 [0133]
- **ANDREI, G. ; D. B. GAMMON ; P. FITEN ; E. DE CLERCQ ; G. OPDENAKKER ; R. SNOECK ; D. H. EVANS.** Cidofovir resistance in vaccinia virus is linked to diminished virulence in mice. *J Virol*, 2006, vol. 80, 9391-401 [0139]
- **ANGELOVA, A. L. ; M. APRAHAMIAN ; S. P. GREKOVA ; A. HAJRI ; B. LEUCHS ; N. A. GIESE ; C. DINSART ; A. HERRMANN ; G. BALBONI ; J. ROMMELAERE.** Improvement of gemcitabine-based therapy of pancreatic carcinoma by means of oncolytic parvovirus H-1 PV. *Clin Cancer Res*, 2009, vol. 15, 511-9 [0139]
- **CHABES, A. L. ; C. M. PFLEGER ; M. W. KIRSCHNER ; L. THELANDER.** Mouse ribonucleotide reductase R2 protein: a new target for anaphase-promoting complex-Cdh1-mediated proteolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, vol. 100, 3925-9 [0139]
- **CHAKRABARTI, S. ; J. R. SISLER ; B. MOSS.** Compact, synthetic, vaccinia virus early/late promoter for protein expression. *Biotechniques*, 1997, vol. 23, 1094-7 [0139]
- **CHEN, Y. ; D. DONALD ; K. SAVIN ; P. J. PRESIDENTE ; D. HARTMAN.** Haemonchus contortus: molecular cloning, sequencing, and expression analysis of the gene coding for the small subunit of ribonucleotide reductase. *Exp Parasitol*, 2005, vol. 111, 250-4 [0139]
- **CHILD, S. J. ; G. J. PALUMBO ; R. M. BULLER ; D. E. HRUBY.** Insertional inactivation of the large subunit of ribonucleotide reductase encoded by vaccinia virus is associated with reduced virulence in vivo. *Virology*, 1990, vol. 174, 625-9 [0139]
- **CHIMPLOY, K. ; C. K. MATHEWS.** Mouse ribonucleotide reductase control: influence of substrate binding upon interactions with allosteric effectors. *J Biol Chem*, 2001, vol. 276, 7093-100 [0139]
- **CIHLAR, T. ; M. S. CHEN.** Identification of enzymes catalyzing two-step phosphorylation of cidofovir and the effect of cytomegalovirus infection on their activities in host cells. *Mol Pharmacol*, 1996, vol. 50, 1502-10 [0139]
- **DUXBURY, M. S. ; H. ITO ; E. BENOIT ; M. J. ZINNER ; S. W. ASHLEY ; E. E. WHANG.** Retrovirally mediated RNA interference targeting the M2 subunit of ribonucleotide reductase: A novel therapeutic strategy in pancreatic cancer. *Surgery*, 2004, vol. 136, 261-9 [0139]
- **DUXBURY, M. S. ; H. ITO ; M. J. ZINNER ; S. W. ASHLEY ; E. E. WHANG.** RNA interference targeting the M2 subunit of ribonucleotide reductase enhances pancreatic adenocarcinoma chemosensitivity to gemcitabine. *Oncogene*, 2004, vol. 23, 1539-48 [0139]
- **DVORACEK, B. ; T. SHORS.** Construction of a novel set of transfer vectors to study vaccinia virus replication and foreign gene expression. *Plasmid*, 2003, vol. 49, 9-17 [0139]
- **ENGSTROM, Y. ; S. ERIKSSON ; I. JILDEVIK ; S. SKOG ; L. THELANDER ; B. TRIBUKAIT.** Cell cycle-dependent expression of mammalian ribonucleotide reductase. Differential regulation of the two subunits. *J Biol Chem*, 1985, vol. 260, 9114-6 [0139]
- **ENGSTROM, Y. ; B. ROZELL.** Immunocytochemical evidence for the cytoplasmic localization and differential expression during the cell cycle of the M1 and M2 subunits of mammalian ribonucleotide reductase. *EMBO J*, 1988, vol. 7, 1615-20 [0139]
- **ENGSTROM, Y. ; B. ROZELL ; H. A. HANSSON ; S. STEMME ; L. THELANDER.** Localization of ribonucleotide reductase in mammalian cells. *EMBO J*, 1984, vol. 3, 863-7 [0139]
- **FANG, Q. ; L. YANG ; W. ZHU ; L. LIU ; H. WANG ; W. YU ; G. XIAO ; P. TIEN ; L. ZHANG ; Z. CHEN.** Host range, growth property, and virulence of the smallpox vaccine: vaccinia virus Tian Tan strain. *Virology*, 2005, vol. 335, 242-51 [0139]
- **HORIG, H. ; D. S. LEE ; W. CONKRIGHT ; J. DIVITO ; H. HASSON ; M. LAMARE ; A. RIVERA ; D. PARK ; J. TINE ; K. GUITO.** Phase I clinical trial of a recombinant canarypoxvirus (ALVAC) vaccine expressing human

- carcinoembryonic antigen and the B7.1 co-stimulatory molecule. *Cancer Immunol Immunother*, 2000, vol. 49, 504-14 [0139]
- HU, Y. ; J. LEE ; J. A. MCCART ; H. XU ; B. MOSS ; H. R. ALEXANDER ; D. L. BARTLETT. Yaba-like disease virus: an alternative replicating poxvirus vector for cancer gene therapy. *J Virol*, 2001, vol. 75, 10300-8 [0139]
 - IWAKI, K. ; K. SHIBATA ; M. OHTA ; Y. ENDO ; H. UCHIDA ; M. TOMINAGA ; R. OKUNAGA ; S. KAI ; S. KITANO. A small interfering RNA targeting proteinase- activated receptor-2 is effective in suppression of tumor growth in a Panc1 xenograft model. *Int J Cancer*, 2008, vol. 122, 658-63 [0139]
 - JIN, Q. ; CHEN, N. H. ; CHEN, S. X. ; HUANG, J. ; FENG, Z. H. ; YUAN, J. S. ; JIN, D.Y. ; BAI, H. D. ; HOU, Y.D. Characterization of the complete genomic sequence of the vaccinia virus Tian Tian strain. *Sci. China*, 1997, vol. 27, 562-567 [0139]
 - KAUFMAN, H. L. ; H. J. LENZ ; J. MARSHALL ; D. SINGH ; C. GARETT ; C. CRIPPS ; M. MOORE ; M. VON MEHREN ; R. DALFEN ; W. J. HEIM. Combination chemotherapy and ALVAC-CEA/B7.1 vaccine in patients with metastatic colorectal cancer. *Clin Cancer Res*, 2008, vol. 14, 4843-9 [0139]
 - KERN, E. R. ; M. N. PRICHARD ; D. C. QUENELLE ; K. A. KEITH ; K. N. TIWARI ; J. A. MADDY ; J. A. SECRIST, 3RD. Activities of certain 5-substituted 4'-thiopyrimidine nucleosides against orthopoxvirus infections. *Antimicrob Agents Chemother*, 2009, vol. 53, 572-9 [0139]
 - KOLESAR, J. ; W. HUANG ; J. EICKHOFF ; K. HAHN ; D. ALBERTI ; S. ATTIA ; W. SCHELMAN ; K. HOLEN ; A. TRAYNOR ; P. IVY. Evaluation of mRNA by Q-RT-PCR and protein expression by AQUA of the M2 subunit of ribonucleotide reductase (RRM2) in human tumors. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2009, vol. 64, 79-86 [0139]
 - LEE, M. S. ; J. M. ROOS ; L. C. MCGUIGAN ; K. A. SMITH ; N. CORMIER ; L. K. COHEN ; B. E. ROBERTS ; L. G. PAYNE. Molecular attenuation of vaccinia virus: mutant generation and animal characterization. *J Virol*, 1992, vol. 66, 2617-30 [0139]
 - LIN, Y. C. ; J. LI ; C. R. IRWIN ; H. JENKINS ; L. DELANGE ; D. H. EVANS. Vaccinia virus DNA ligase recruits cellular topoisomerase II to sites of viral replication and assembly. *J Virol*, 2008, vol. 82, 5922-32 [0139]
 - MANUAL, B. C. A. C. D. *Hydroxyurea Information Sheet*, 2006, http://www.bccancer.bc.ca/NR/rdonlyres/D83AB234-30D8-4489-B4DE-41FAA5B81743/19225/Hydroxyureamonograph_1Dec06.pdf [0139]
 - MCLEOD, E. J. ; A. D. BEISCHER ; J. S. HILL ; A. H. KAYE. Multicellular tumor spheroids grown from pancreatic carcinoma cell lines: use as an orthotopic xenograft in athymic nude mice. *Pancreas*, 1997, vol. 14, 237-48 [0139]
 - PONTARIN, G. ; A. FIJOLEK ; P. PIZZO ; P. FERRARO ; C. RAMPAZZO ; T. POZZAN ; L. THELANDER ; P. A. REICHARD ; V. BIANCHI. Ribonucleotide reduction is a cytosolic process in mammalian cells independently of DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, vol. 105, 17801-6 [0139]
 - ROSELL, R. ; E. FELIP ; M. TARON ; J. MAJO ; P. MENDEZ ; M. SANCHEZ-RONCO ; C. QUERALT ; J. J. SANCHEZ ; J. MAESTRE. Gene expression as a predictive marker of outcome in stage IIB-IIIA-IIIB non-small cell lung cancer after induction gemcitabine- based chemotherapy followed by resectional surgery. *Clin Cancer Res*, 2004, vol. 10, 4215s-4219s [0139]
 - ROSEMAN, N. A. ; M. B. SLABAUGH. The vaccinia virus HindIII F fragment: nucleotide sequence of the left 6.2 kb. *Virology*, 1990, vol. 178, 410-8 [0139]
 - ROVA, U. ; A. ADRAIT ; S. POTSCH ; A. GRASLUND ; L. THELANDER. Evidence by mutagenesis that Tyr(370) of the mouse ribonucleotide reductase R2 protein is the connecting link in the intersubunit radical transfer pathway. *J Biol Chem*, 1999, vol. 274, 23746-51 [0139]
 - SABAN, N. ; M. BUJAK. Hydroxyurea and hydroxamic acid derivatives as antitumor drugs. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2009, vol. 64, 213-21 [0139]
 - SEYMOUR, L. W. ; M. BAZAN-PEREGRINO ; R. CARLISLE ; R. HERNANDEZ-ALCOCEBA ; R. IGGO ; K. HOMICKO ; G. HALLDEN ; V. MAUTNER ; J. SHEN ; K. FISHER. Comparison of Molecular Strategies for Breast Cancer Virotherapy using Oncolytic Adenovirus. *Hum Gene Ther*, 2008 [0139]
 - SLABAUGH, M. B. ; C. K. MATHEWS. Hydroxyurea- resistant vaccinia virus: overproduction of ribonucleotide reductase. *J Virol*, 1986, vol. 60, 506-14 [0139]
 - SOUGLAKOS, J. ; I. BOUKOVINAS ; M. TARON ; P. MENDEZ ; D. MAVROUDIS ; M. TRIPAKI ; D. HATZIDAKI ; A. KOUTSOPOULOS ; E. STATHOPOULOS ; V. GEORGIOULIAS. Ribonucleotide reductase subunits M1 and M2 mRNA expression levels and clinical outcome of lung adenocarcinoma patients treated with docetaxel/gemcitabine. *Br J Cancer*, 2008, vol. 98, 1710-5 [0139]
 - STANFORD, M. M. ; G. MCFADDEN. Myxoma virus and oncolytic virotherapy: a new biologic weapon in the war against cancer. *Expert Opin Biol Ther*, 2007, vol. 7, 1415-25 [0139]
 - SUNAGA, M. ; T. TOMONAGA ; M. YOSHIKAWA ; M. EBARA ; H. SHIMADA ; H. SAISHO ; F. NOMURA. Gene expression of 5-fluorouracil metabolic enzymes in hepatocellular carcinoma and non-tumor tissue. *J Chemother*, 2007, vol. 19, 709-15 [0139]
 - TULMAN, E. R. ; G. DELHON ; C. L. AFONSO ; Z. LU ; L. ZSAK ; N. T. SANDYBAEV ; U. Z. KEREMBEKOVA ; V. L. ZAITSEV ; G. F. KUTISH ; D. L. ROCK. Genome of horsepoxvirus. *J Virol*, 2006, vol. 80, 9244-58 [0139]
 - WANG, X. ; A. ZHENCHUK ; K. G. WIMAN ; F. ALBERTIONI. Regulation of p53R2 and its role as potential target for cancer therapy. *Cancer Lett*, 2009, vol. 276, 1-7 [0139]
 - WASILENKO, S. T. ; T. L. STEWART ; A. F. MEYERS ; M. BARRY. Vaccinia virus encodes a previously uncharacterized mitochondrial-associated inhibitor of apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, vol. 100, 14345-50 [0139]

- **WATANABE, I. ; H. KASUYA ; N. NOMURA ; T. SHIKANO ; T. SHIROTA ; N. KANAZUMI ; S. TAKEDA ; S. NOMOTO ; H. SUGIMOTO ; A. NAKAO.** Effects of tumor selective replication-competent herpes viruses in combination with gemcitabine on pancreatic cancer. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2008, vol. 61, 875-82 [0139]
- **WOO, Y.; K. J. KELLY ; M. M. STANFORD ; C. GALANIS ; Y. S. CHUN ; Y. FONG ; G. MCFADDEN.** Myxoma virus is oncolytic for human pancreatic adenocarcinoma cells. *Ann Surg Oncol*, 2008, vol. 15, 2329-35 [0139]
- **WRIGHT, J. A. ; T. G. ALAM ; G. A. MCCLARTY ; A. Y. TAGGER ; L. THELANDER.** Altered expression of ribonucleotide reductase and role of M2 gene amplification in hydroxyurea-resistant hamster, mouse, rat, and human cell lines. *Somat Cell Mol Genet*, 1987, vol. 13, 155-65 [0139]
- **XUE, L.; B. ZHOU ; X. LIU ; T. WANG ; J. SHIH ; C. QI ; Y. HEUNG ; Y. YEN.** Structurally dependent redox property of ribonucleotide reductase subunit p53R2. *Cancer Res*, 2006, vol. 66, 1900-5 [0139]
- **YUN, H. J. ; Y. H. CHO ; Y. MOON ; Y. W. PARK ; H. K. YOON ; Y. J. KIM ; S. H. CHO ; Y. I. LEE ; B. S. KANG ; W. J. KIM.** Transcriptional targeting of gene expression in breast cancer by the promoters of protein regulator of cytokinesis 1 and ribonuclease reductase 2. *Exp Mol Med*, 2008, vol. 40, 345-53 [0139]
- **XIONG X ; SMITH JL ; KIM C ; HUANG ES ; CHEN MS.** Kinetic analysis of the interaction of cidofovir diphosphate with human cytomegalovirus DNA polymerase. *Biochem Pharmacol*, 1996, vol. 51, 1563-1567 [0139]
- **MAGEE WC ; HOSTETLER KY ; EVANS DH.** Mechanism of inhibition of vaccinia virus DNA polymerase by cidofovir diphosphate. *Antimicrob Agents Chemother*, 2005, vol. 49, 3153-3162 [0139]
- **MAGEE WC ; ALDERN KA ; HOSTETLER KY ; EVANS DH.** Cidofovir and (S)-9-[3-hydroxy-(2-phosphonomethoxy)propyl]adenine are highly effective inhibitors of vaccinia virus DNA polymerase when incorporated into the template strand. *Antimicrob Agents Chemother*, 2008, vol. 52, 586-597 [0139]
- **PRICHARD MN ; KEITH KA ; JOHNSON MP ; HARDEN EA ; MCBRAYER A et al.** Selective phosphorylation of antiviral drugs by vaccinia virus thymidine kinase. *Antimicrob Agents Chemother*, 2007, vol. 51, 1795-1803 [0139]
- **TADDIE JA ; TRAKTMAN P.** Genetic characterization of the vaccinia virus DNA polymerase: cytosine arabinoside resistance requires a variable lesion conferring phosphonoacetate resistance in conjunction with an invariant mutation localized to the 3'-5' exonuclease domain. *J Virol*, 1993, vol. 67, 4323-4336 [0139]
- **CRESAWN SG ; PRINS C ; LATNER DR ; CONDIT RC.** Mapping and phenotypic analysis of spontaneous isatin-beta-thiosemicarbazone resistant mutants of vaccinia virus. *Virology*, 2007, vol. 363, 319-332 [0139]