

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 700 749**

51 Int. Cl.:

A61K 35/768 (2015.01)

A61K 35/15 (2015.01)

C12N 7/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.01.2014 PCT/EP2014/051063**

87 Fecha y número de publicación internacional: **31.07.2014 WO14114605**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.01.2014 E 14701698 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.10.2018 EP 2948157**

54 Título: **Uso de un virus del sarampión infeccioso genéticamente modificado con propiedades proapoptóticas potenciadas (virus MV-deltaC) en la terapia del cáncer**

30 Prioridad:

24.01.2013 EP 13305086

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

19.02.2019

73 Titular/es:

**INSTITUT PASTEUR (25.0%)
25-28 Rue du Docteur Roux
75724 Paris Cedex 15, FR;
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (C.N.R.S.) (25.0%);
INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA
RECHERCHE MÉDICALE (25.0%) y
UNIVERSITÉ DE NANTES (25.0%)**

72 Inventor/es:

**TANGY, FRÉDÉRIC;
GREGOIRE, MARC;
FONTENEAU, JEAN-FRANÇOIS;
GUILLERME, JEAN-BAPTISTE y
COMBREDÉ, CHANTAL**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 700 749 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

Uso de un virus del sarampión infeccioso genéticamente modificado con propiedades proapoptóticas potenciadas (virus MV-deltaC) en la terapia del cáncer

5 Campo de la invención

10 La invención se refiere a un virus del sarampión infeccioso genéticamente modificado obtenido de una cepa del virus del sarampión atenuada viva, en el que el gen que codifica la proteína C accesoria vírica se ha suprimido (MV-deltaC). Se refiere en particular al uso de dicho MV-deltaC infeccioso genéticamente modificado en el tratamiento de tumores malignos o afecciones relacionadas con cáncer, y para la preparación de composiciones para tal tratamiento.

15 Antecedentes de la invención

El mesotelioma maligno es un cáncer raro y muy agresivo, resistente a los tratamientos curativos habituales. El desarrollo del mesotelioma pleural maligno está vinculado principalmente con una exposición prolongada a las fibras y polvos de amianto (Kazan-Allen *et al.*, Lung cancer, 2005, 49S1:S3-S8; Robinson *et al.*, Lancet, 2005, 366:397-408). El melanoma es un tumor maligno que se desarrolla en los melanocitos y se puede diseminar a todo el cuerpo cuando no se trata. Aunque representa uno de los tipos menos frecuentes de cáncer de piel, es responsable de la mayoría de las muertes relacionadas con el cáncer de piel (Chin, L. *et al.*, Genes Dev. 2006 20: 2149-2182). Los adenocarcinomas de pulmón son el tipo más común de cáncer de pulmón, tanto en fumadores como en no fumadores, y son una de las causas más comunes de muerte por cáncer (Travis, W. D. *et al.*, J Thorac Oncol., 2011, 6(2), 244-285).

25 Actualmente, ninguna estrategia propone una oportunidad curativa significativa para varios cánceres agresivos tales como los mesoteliomas malignos, los melanomas y los adenocarcinomas de pulmón.

30 Sus pronósticos son muy malos y son relativamente resistentes a todas las modalidades de tratamiento convencionales, tales como la quimioterapia, la radioterapia y/o la cirugía. Por lo tanto, existe una necesidad apremiante de desarrollar nuevos enfoques clínicos.

35 La viroterapia del cáncer es extensamente considerada como una nueva alternativa para el tratamiento de los cánceres que son resistentes a las terapias antineoplásicas convencionales (Boisgerault N *et al.*, Immunotherapy, 2010, 2 de marzo (2), 185-199). La viroterapia oncolítica ha demostrado mecanismos antitumorales multimodales tanto en tratamientos preclínicos como en algunos de tratamientos clínicos antineoplásicos de fase I (Lech, PJ y Russell, SJ; Expert Review of Vaccines, 2010, 9(11):1275-1302; Galanis *et al.*, Cancer Research, 2010, 70(3):875-882), y también en investigaciones *in vitro* (Gauvrit, A *et al.*, Cancer Research, 2008, 68 (12), 4882-4892). En comparación con la inmunoterapia de transferencia celular, las vacunas de virus tienen la ventaja de conferir inmunidad antineoplásica personalizada simultáneamente con la citorreducción, sin el requisito de una fabricación personalizada. De forma adicional, las vacunas de virus pueden diseñarse técnicamente para deleccionar componentes víricos inmunosupresores y para insertar transgenes que potencian la citotoxicidad e inmunidad antitumorales (A. Gauvrit *et al.*, Cancer Research, 2008, 68 (12), 4882-4892).

45 El virus del sarampión (MV) es un virus con envoltura de ARN monocatenario no segmentado, de sentido negativo, del género *Morbilivirus* dentro de la familia de *Paramyxoviridae*. El genoma no segmentado de MV tiene una polaridad antimensaje, lo que da como resultado un ARN genómico que no se traduce ni *in vivo* ni *in vitro*, ni es infeccioso cuando se purifica. Este virus se ha aislado en el año 1954 (Enders, J. F. y Peebles, T.C., 1954, Proc Soc Exp Biol Med, 86(2): 277-286), y desde entonces las vacunas atenuadas vivas se han obtenido de este virus para proporcionar cepas vacunales, y en particular de la cepa Schwarz/Moraten.

50 La transcripción y la replicación de los virus de ARN de cadena (-) no segmentada y su ensamblaje como partículas de virus se han estudiado e informado especialmente en Fields virology (3ª edición, vol. 1, 1996, Lippincott-Raven publishers-Fields BN *et al.*). La transcripción y la replicación de, MV no implican el núcleo de las células infectadas, sino que tienen lugar en el citoplasma de dichas células infectadas. El genoma del MV comprende genes que codifican seis proteínas estructurales principales a partir de los seis genes (designados N, P, M, F, H y L) y las dos proteínas no estructurales del gen P adicionales, las proteínas C y V. El orden de los genes es el siguiente: 3', N, P (que incluye C y V), M, F, H, y la proteína polimerasa grande L en el extremo 5' (Figura 1A). El genoma comprende además regiones no codificantes en la región intergénica M/F; esta región no codificante contiene aproximadamente 1000 nucleótidos de ARN no traducido. Los genes citados codifican respectivamente el péptido líder (gen I), las proteínas de la nucleocápside del virus, es decir, la nucleoproteína (N), la fosfoproteína (P) y la proteína grande (L), las cuales se ensamblan alrededor del ARN genómico para proporcionar la nucleocápside. Los otros genes codifican las proteínas de la envoltura vírica, incluidas las proteínas hemaglutinina (H), la de fusión (F) y la de matriz (M). La proteína C del MV está codificada por el gen policistrónico P, es una proteína pequeña (186 aminoácidos) y básica, localizada tanto en el citoplasma como en el núcleo (Bellini, W.J. *et al.*, J. Virol., 1985, 53:908-919). El papel de esta proteína vírica, descrita como un factor de virulencia del MV, aún no se entiende bien. Para determinar el papel de la

proteína C del MV, se ha utilizado una cepa de MV recombinante de tipo silvestre que carece de expresión de la proteína C, basada en la cepa IC-B muy patógena y generada mediante el uso de un sistema de genética inversa. Se sugirió que la proteína C del MV podría estar implicada en el ensamblaje de las partículas víricas, en la expresión de proteínas del virus y en el retraso de la apoptosis de las células infectadas para establecer una infección a largo plazo del MV (Takeuchi, K. *et al.*, J. Virol., junio de 2005, 7838-7844). Aunque se ha informado de que la proteína C del MV inhibe la respuesta antivírica por interferón (Shaffer, J. A. *et al.*, Virology, 2003, 315:389-397), otro estudio llegó a la conclusión contraria (Takeuchi, K. *et al.*, J. Virol., junio de 2005, 7838-7844), confirmando de este modo que la función de la proteína C del MV aún no se ha establecido bien. Se ha divulgado que los virus de sarampión recombinantes con una mutación en el gen C tienen fenotipos de crecimiento alterados *in vivo* (Valsamakis *et al.*, J. Virol., 1998, 72(10), 7754-7761) y que los virus del sarampión defectuosos en C inducen fuertes respuestas inmunitarias adaptativas mientras se propagan de manera menos eficaz (Devaux *et al.*, J. Virol., 2008, 82(11), 5359-5367).

Entre los virus humanos que merecen analizarse como agentes oncolíticos, la vacuna para el MV atenuada viva presenta una serie de ventajas. Administrada a cientos de millones de niños durante 30 años, es la vacuna pediátrica humana más segura y más extensamente utilizada. Las cepas atenuadas del MV infectan una gran cantidad de tipos celulares y, preferentemente, células cancerosas transformadas. Esto se debe al uso por el MV de CD46 como receptor, frecuentemente sobreexpresado en células cancerosas para resistir la destrucción dependiente del complemento por parte de los linfocitos citolíticos naturales (Naniche, D. *et al.*, J Virol, 1993, 67(10): 6025-6032; Dhiman, N. *et al.*, Rev Med Virol, 2004, 14(4): 217-229), mientras que el MV de tipo silvestre usa SLAM (CD150) (Tatsuo, H. *et al.* Nature, 2000, 406(6798):893-897; Anderson, B. D. *et al.*, Cancer Res., 2004, 64: 4919-4926; Schneider, U. *et al.*, J Virol., 2002, 76: 7460-7467). Curiosamente, El MV presenta propiedades antitumorales naturales porque se dirige específicamente a las células cancerosas sin infectar a las sanas. Por lo tanto, el MV demuestra un perfil de seguridad incuestionable para su aplicación en futuros protocolos terapéuticos.

Las propiedades oncolíticas del MV de tipo silvestre son bien conocidas por los expertos en la técnica (Mayo Foundation for Medical Education and Research, documento US07854928). Recientemente, se iniciaron ensayos clínicos para investigar la capacidad de la cepa Edmonston del MV para tratar el cáncer de ovario, el glioblastoma, el cáncer de pulmón no microcítico y el mieloma múltiple (véase <http://clinicaltrials.gov>, palabras clave sobre sarampión y el cáncer). También se ha descrito el uso de vacunas contra el VM, ya sean recombinantes o quiméricas, como vectores de vacunación (documentos WO2004/000876, WO2004/076619, WO2006/136697 y WO2008/078198, WO2012/022495; Li *et al.*, Cancer Gene Ther., 2010, 17(8), 550-558). Se ha descrito el efecto terapéutico del uso combinado del MV y de agentes quimioterapéuticos (Ungerechts *et al.*, Gene Ther. 2010, 17(12), 1506-1516).

Esta tecnología también se ha propuesto para el tratamiento inmunooncolítico del mesotelioma (Gauvrit, A. *et al.*, Cancer Research, 2008, 68 (12), 4882-4892). Por consiguiente, la solicitud de patente internacional WO2009/047331 describió las propiedades oncolíticas e inmunoadyuvantes de la cepa Schwarz atenuada viva de la vacuna del MV en un panel de células tumorales de mesotelioma epiteloide. Usando una cepa Schwarz de la vacuna del MV rescatada, producida a partir de un clon de ADNc infeccioso, se demostró que las células de mesotelioma infectadas con MV inducían la maduración espontánea de células dendríticas derivadas de monocitos (Mo-DC, forma siglada de *monocyte-derived dendritic cells*) y una respuesta específica para el antígeno tumoral.

Las ventajas potenciales de la oncoviroterapia sobre los tratamientos convencionales incluyen la propiedad de inducir una respuesta inmunitaria que incluye no solo una mayor especificidad en la diana contra los antígenos del cáncer (antígenos asociados al tumor) y, por lo tanto, un mejor margen de seguridad, sino también un efecto prolongado debido a la memoria inmunitaria, y por lo tanto la prevención de recaídas y metástasis. De hecho, se ha demostrado que se desarrollan una respuesta inmunitaria específica y memoria después de la administración de MV en el sitio de las células cancerosas, en presencia de células presentadoras de antígenos (Massé, D. *et al.*, Int. J. Cancer, 2004, 111(4), 575-580); Liu *et al.*, Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy, 2010, 18(6):1155-1162). Se demostró que la actividad antitumoral de la cepa de Schwarz del MV actúa a través de múltiples mecanismos, incluyendo la oncolisis, la inducción de apoptosis inmunogénica tumoral (expresión de señal de peligro asociada con la muerte celular) y la formación de sincicio mediada por virus (Gauvrit, A. *et al.*, Cancer Res, 2008, 68(12), 4882-4892). Además, también se ha sugerido que los antígenos asociados a tumores liberados y la inflamación resultante de la replicación vírica rompen la inmunotolerancia a los tumores e inducen inmunidad contra el cáncer.

A pesar de una infección eficaz, algunos tumores malignos o células cancerosas infectados con VM resisten la inducción de la muerte celular. Por lo tanto, existe la necesidad de desarrollar virus que ayuden a superar este tipo de resistencia y, por lo tanto, mejoren y extiendan la inducción de muerte celular específica de tumores malignos o células cancerosas.

Los precursores de células dendríticas (DC, forma siglada del inglés de *dendritic cell*) se dividen en células dendríticas derivadas de monocitos (las Mo-DC) y células dendríticas plasmocitoides (las pDC, forma siglada del inglés de *plasmacytoid dendritic cell*), las cuales presentan distintas propiedades funcionales. Las pDC son un subconjunto de CD implicado en la respuesta inmunitaria antivírica debido a su expresión de receptores tipo Toll (TLR) especializados en el reconocimiento de ácidos nucleicos víricos (TLR7, TLR9) (Gilliet, M. *et al.*, Nat Rev

Immunol., 2008, 8:594-606). Responden a una amplia gama de virus (entre otros, el virus de la gripe A, el virus del herpes simple, VIH) en términos de activación y maduración al producir grandes cantidades de interferón tipo I (IFN- α , β , ω). Además, pueden presentar antígenos víricos a los linfocitos T CD8+ y CD4+ cuando están infectados por un virus (Fonteneau, J. F. *et al.*, Blood, 2003, 101:3520-3526) y para la presentación cruzada de antígenos víricos de células infectadas por virus a linfocitos T CD8+ (Di Pucchio, T. *et al.*, Nat Immunol., 2008, 9:551-557; Lui, G. *et al.*, PLoS One, 2009, 4:e7111). Además, se ha demostrado que las pDC podrían desempeñar un papel beneficioso en la respuesta inmunitaria contra tumores (Drobits, B. *et al.*, J Clin Invest., 2012, 122:575-585; Liu, C. *et al.*, J Clin Invest., 2008, 118:1165-1175). Como ejemplo, en un modelo de ratón de melanoma, después del tratamiento tópico con el ligando de TLR7, imiquimod, se observó activación de pDC y una respuesta inmunitaria antitumoral dentro de los tumores (Drobits, B. *et al.*, J Clin Invest., 2012, 122:575-585). Como el MV tiene un ARN monocatenario (ARNmc), los inventores han formulado la hipótesis de que las pDC podrían detectar la infección por MV de las células tumorales, debido a su expresión intravacuolar de TLR7, que reconoce el ARN monocatenario. Se ha divulgado un método para preparar pDC vacunales para tratar un tumor en un individuo diagnosticado de tal afección tumoral, que comprende la etapa de infección *in vitro* de células tumorales que previamente se han recogido del individuo con MV no modificado (Guillermine *et al.*, Clin. Cancer Res., 2013, 19(5), 1147-1158).

Descripción de la invención

Los inventores han descubierto sorprendentemente que un virus del sarampión infeccioso genéticamente modificado obtenido de una cepa del MV atenuada viva, en el que el gen que codifica la proteína C accesoria vírica se ha suprimido (MV-deltaC), suscita una respuesta potenciada contra un tumor maligno o células cancerosas y, en particular, tiene propiedades proapoptóticas potenciadas en comparación con el MV no modificado. Por lo tanto, la presente invención emplea MV-deltaC y demuestra que puede infectar y destruir de forma eficaz un tumor maligno o células cancerosas, tales como mesotelioma maligno, melanoma y células de adenocarcinoma de pulmón. La divulgación describe que las células dendríticas plasmocitoides en contacto con lisado de mesotelioma maligno, melanoma y células de adenocarcinoma de pulmón infectados con MV pueden activar linfocitos T CD8 anti mesotelioma, anti melanoma y anti adenocarcinoma de pulmón. Los inventores han propuesto, así, que las propiedades observadas del MV-deltaC podrían ser de interés cuando se usan como un compuesto activo contra un tumor maligno o células cancerosas cuando MV-deltaC activa las pDC.

La divulgación describe un virus del sarampión infeccioso obtenido de una cepa del virus del sarampión atenuada viva para su uso en el tratamiento de un tumor maligno agresivo o de un cáncer agresivo mediante la activación de células dendríticas plasmocitoides (las pDC), cuando se administra a un individuo diagnosticado de tal tumor o una afección relacionada con cáncer.

La presente invención también se refiere a un virus del sarampión infeccioso genéticamente modificado obtenido de una cepa del virus del sarampión atenuada viva, en el que el gen que codifica la proteína C accesoria vírica se ha suprimido (MV-deltaC) para su uso en el tratamiento de un tumor maligno agresivo o de un cáncer agresivo mediante la activación de células dendríticas plasmocitoides (las pDC), cuando se administran a un individuo diagnosticado de tal tumor o una afección relacionada con cáncer.

El término "*virus del sarampión*" se abrevia MV y la expresión "*virus del sarampión obtenido de una cepa del virus del sarampión atenuada viva, en el que el gen que codifica la proteína C accesoria vírica se ha suprimido*" se abrevia como MV-deltaC.

La expresión "*que codifica*" usada en la presente solicitud define la capacidad de las moléculas de ácido nucleico para transcribirse y, cuando sea apropiado, traducirse para la expresión del producto en células o líneas celulares seleccionadas.

El individuo puede ser preferentemente un mamífero, más preferentemente un ser humano.

Como se define en el presente documento, La expresión "*genéticamente modificado*" abarca el hecho de que la síntesis de la proteína C del virus del sarampión se elimina en el MV-deltaC infeccioso genéticamente modificado producido, en particular rescatado.

Como se define en el presente documento, la expresión "*el gen que codifica la proteína C accesoria vírica se ha suprimido*" significa que la expresión del gen que codifica la proteína C está silenciada.

La inhibición de la síntesis de la proteína C se logra en particular silenciando la expresión de la fase de lectura abierta (ORF) de la proteína C contenida en el gen P y que codifica la proteína C. La ORF de la proteína C se solapa con parte de la ORF de P en la fase +1. El silenciamiento de la ORF de la proteína C se logra en particular mediante una mutación adecuada de la secuencia de dicha ORF, mediante la mutación del segundo codón de iniciación "ATG" en la región N-terminal del gen P. Además de esta primera mutación, se puede introducir una segunda mutación añadiendo un codón de terminación como resultado de la sustitución de un nucleótido cadena abajo en la fase de lectura abierta de C (Figura 1B) (Patterson, J. B. *et al.*, Virology, 2000, 267(1):80-89).

De acuerdo con la convención utilizada para *Paramyxoviridae*, el término "gen" se puede usar para designar el ácido nucleico genómico de ARN que codifica el ARNm. En el contexto de la presente invención, también puede referirse a la ORF contenida en dicho ARNm.

- 5 Dicha mutación para silenciar la expresión de la proteína C debe preservar la expresión del gen P por su capacidad para expresar la proteína P.

El ácido nucleico de ARN mutado del MV puede además cumplir con la llamada "regla de seis". La "regla de seis" se expresa en el hecho de que el número total de nucleótidos presentes en un ácido nucleico que codifica el genoma de ARN de cadena (+) del MV de longitud completa es un múltiplo de seis. Las construcciones de ácido nucleico que comprenden el mismo genoma o que comprenden el genoma de MV-deltaC mutado, o que consisten en dicho genoma de MV-deltaC mutado, y posiblemente las secuencias adicionales, en particular codificantes, son múltiplos de seis. La "regla de seis" ha sido reconocida en el estado de la técnica como un requisito con respecto al número total de nucleótidos en el genoma del MV, que permite una replicación eficaz u optimizada del ARN genómico del MV como consecuencia de la interacción con cada subunidad de proteína del MV que encapsida 6 ribonucleótidos en el genoma para formar la nucleocápside.

En la técnica anterior se han propuesto procedimientos que divulgan la expresión de la proteína C que se ha suprimido en distintas cepas del MV, como la cepa IC-B muy patógena (Takeuchi, K. *et al.*, J. Virol., junio de 2005, 7838-7844) o la cepa vacunal Edmonston B (Radecke, F. *et al.*, Virology, 1996, 217:418-421; Patterson, J. B. *et al.*, Virology, 2000, 267(1):80-89), utilizando un sistema de genética inversa, y pueden aplicarse en el contexto de la presente invención.

Como se define en el presente documento, la expresión "*virus del sarampión infeccioso obtenido de una cepa del virus del sarampión atenuada viva*" designa un virus del sarampión que se origina a partir de una cepa avirulenta o menos virulenta que una cepa parental determinada en el mismo huésped, especialmente en el ser humano, mientras se conservan las propiedades infecciosas y la inmunogenicidad, y posiblemente la capacidad adyuvante, cuando se administra en un huésped, especialmente en el ser humano, es decir, preservando la respuesta de linfocitos T y B inmunodominantes frente al MV y posiblemente la capacidad adyuvante, tal como la inducción de proteínas coestimuladoras de linfocitos T o de la citocina IL-12. Las cepas patógenas primarias alteran fuertemente la hematopoyesis (Arneborn, P. *et al.*, Clin Exp Immunol, 1983, 51:165-172; Kim, E.A. *et al.*, Radiographics, 2002, 22 Spec No:S137-149; Okada, H. *et al.*, Arch Virol, 2000, 145:905-920), dando como resultado, así, en la inmunosupresión transitoria responsable de la mayoría de las muertes debido a la infección por sarampión en los países en desarrollo. En contraste con las cepas primarias, las cepas atenuadas vivas no inducen inmunosupresión (Okada, H. *et al.*, Arch Virol, 2001, 146:859-874).

En consecuencia, una cepa del MV atenuada viva se refiere a una cepa que se ha pasado en serie en células seleccionadas y, preferentemente, se ha adaptado a otras células, tales como las células primarias con una respuesta de IFN α/β , es decir, células CEF, para producir cepas de semilla adecuadas para la preparación de cepas vacunales, que albergan un genoma estable que no permitiría la reversión a la patogenia ni la integración en los cromosomas del hospedador, en particular en cromosomas de un hospedador humano. Un MV atenuado vivo puede ser uno que se haya seleccionado en células primarias, tales como las células CEF.

Como "cepa atenuada viva" particular, una cepa aprobada para vacuna utilizada para seres humanos es una cepa atenuada viva adecuada para la invención cuando cumple con los criterios definidos por la FDA (forma siglada del inglés *US Food and Drug Administration*, Administración de Alimentos y Medicamentos de EE. UU.), es decir, cumple los criterios de seguridad, eficacia, calidad y reproducibilidad, después de rigurosas revisiones de laboratorio y de datos clínicos (www.fda.gov/cber/vaccine/vacappr.htm).

En la presente invención, una cepa particular atenuada viva de MT que proporciona virus MV es la cepa Schwarz o la cepa Moraten, en particular de la vacuna Rouvax® (Aventis). Se ha demostrado que la cepa Schwarz tiene una identidad de secuencia perfecta con la cepa Moraten (Parks, C. L. *et al.*, 2001, J Virol, 75(2): 910-920; Schwarz, A. J., 1962, Am J Dis Child, 103, 386-389). Las cepas Schwarz/Moraten se usan extensamente en la actualidad dado que inducen respuestas inmunitarias humorales y celulares a largo plazo y presentan una importante estabilidad genética, dado que nunca se ha observado reversión a una forma patógena (Hilleman, M., 2002, Vaccine, 20:651-665).

Más preferentemente, el MV infeccioso modificado genéticamente para su uso de acuerdo con la invención se produce utilizando un ADNc de la cepa Schwarz de MV clonado en el plásmido pTM-MV Schw, depositado por el Instituto Pasteur en la CNCM (París, Francia) con el número I-2889 el 12 de junio de 2002, cuya secuencia describe Combredet (Combredet, C. *et al.*, 2003, J Virol, 77(21): 11546-11554), y también se divulga en el documento WO2004/000876 y en el Ejemplo 1 de la presente descripción. El plásmido pTM-MV Schw se ha obtenido a partir de un plásmido Bluescript, comprende el polinucleótido que codifica la cadena de ARN (+) de longitud completa del MV de la cepa Schwarz colocada bajo el control del promotor de la ARN polimerasa T7, y tiene 18967 nucleótidos. Los ADNc de otras cepas del MV pueden obtenerse de manera similar a partir del ácido nucleico purificado a partir de partículas víricas de MV atenuado en vivo. Para preparar un ADNc adecuado que codifique el genoma MV-deltaC, el

plásmido pTM-MV Schw se modificó mediante la sustitución del segundo codón de iniciación "ATG" en el gen P para proporcionar el plásmido pTM-MV Schw-deltaC-ATU1 (eGFP) (SEQ ID NO: 1). En particular, el codón "ATG" se ha reemplazado con el codón "ACG" por la mutación del nucleótido T al nucleótido C.

5 Como se describe en el presente documento, el plásmido pTM-MV Schw-deltaC-ATU1 (eGFP) de la SEQ ID NO: 1 se muta adicionalmente por sustitución en la posición 2803 del nucleótido G por un nucleótido A para proporcionar un codón de terminación. Esta variante de pTM-MV Schw-deltaC-ATU1 (eGFP) tiene la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2.

10 Como se describe en el presente documento, el MV-deltaC infeccioso genéticamente modificado se obtiene mediante rescate. El rescate de MV no modificado de la cepa de Schwarz del MV se ha descrito extensamente en el documento WO2004/000876 y se puede aplicar el mismo procedimiento a la preparación del MV-deltaC infeccioso genéticamente modificado.

15 Como se describe en el presente documento, el MV-deltaC infeccioso genéticamente modificado expresa GM-CSF (factor estimulante de las colonias de granulocitos y macrófagos) (Guse, K. *et al.*, 2011, *Oncolytic vaccinia virus for the treatment of cancer*, Vol. 11, n.º 5, página 595-608), y por consiguiente es MV-deltaC-GM-CSF.

20 Como se define en el presente documento, la expresión "para su uso en el tratamiento" significa que un MV-deltaC infeccioso genéticamente modificado se puede usar en un procedimiento de administración a un individuo para erradicar completamente un tumor maligno o una afección relacionada con cáncer diagnosticada en un individuo, especialmente en un ser humano, o para reducir el tamaño del tumor, o para aliviar los síntomas de tal tumor maligno o afección relacionada con cáncer. La viroterapia que implica al MV-deltaC como se define en las reivindicaciones puede ir acompañada de otras terapias, en particular quimioterapia. Por lo tanto, la viroterapia que implica MV-deltaC se puede usar en una combinación o un régimen terapéutico suplementario.

25 Como se define en el presente documento, la expresión "tumor maligno agresivo o cáncer agresivo" se refiere a un tumor maligno o un cáncer que es resistente a las modalidades de tratamiento convencionales conocidas actualmente, tales como la quimioterapia, la radioterapia y/o la cirugía, y como consecuencia se desarrolla a pesar de tal tratamiento convencional.

30 Como se define en el presente documento, la expresión "activando células dendríticas plasmocitoides (las pDC)" se refiere a las células tumorales infectadas con MV-deltaC que emplean las pDC en la respuesta inmunitaria antitumoral activando su capacidad para producir altas cantidades de IFN- α y/o para presentar de forma cruzada el TAA de las células tumorales infectadas a linfocitos T CD8+ específicos del tumor.

35 Como se define en el presente documento, la expresión "células dendríticas plasmocitoides (las pDC)" abarca a las células presentadoras de antígeno que producen grandes cantidades de los interferones alfa/beta (IFN- α/β) en respuesta a estímulos víricos y bacterianos y, en el contexto de la presente invención, se reconoce que tienen la capacidad de fagocitar células infectadas.

En una realización particular, dicho MV-deltaC es para su uso en el tratamiento del mesotelioma maligno, en particular del mesotelioma pleural maligno.

45 En otra realización particular, la presente invención se refiere a un virus del sarampión infeccioso genéticamente modificado obtenido de una cepa del virus del sarampión atenuada viva, en el que el gen que codifica la proteína C accesoria vírica se ha suprimido (MV-deltaC) para su uso en el tratamiento del melanoma o del adenocarcinoma de pulmón, cuando se administra a un individuo diagnosticado de tal afección.

50 Una realización particular de la invención proporciona una MV-deltaC infeccioso genéticamente modificado para su uso en el tratamiento de tumores malignos o células cancerosas que son resistentes al MV no modificado, cuando se administra a un individuo diagnosticado de un tumor maligno o una afección relacionada con cáncer.

55 La expresión "*MV no modificado*" se refiere a una cepa de MV infecciosa viva atenuada que no se ha modificado genéticamente, tal como un virus de la cepa Schwarz o Moraten.

60 Como se define en el presente documento, la expresión "*tumor maligno o células cancerosas que son resistentes a MV no modificado*" se refiere a un tumor maligno o células cancerosas que se sabe que resisten a la inducción de muerte celular, a pesar de una infección eficaz con MV no modificado, o que se sabe que experimentan una respuesta más débil a la inducción de muerte celular con MV no modificado que con MV-deltaC.

65 Los inventores han demostrado que la administración de MV-deltaC a diversos tumores malignos o células cancerosas proporciona o suscita una respuesta que está mejorada con respecto a la respuesta obtenida cuando se administra MV no modificado y, en particular, suscita una actividad apoptótica mejorada a niveles de concentración más bajos, con un tiempo de respuesta más corto y mejores propiedades inmunogénicas (Kroemer, G. *et al.*, *Annu. Rev. Immunol.*, 2012, 31:51-72).

Como se describe en el presente documento, dicho MV-deltaC infeccioso genéticamente modificado presenta una actividad apoptótica en el tumor maligno o células cancerosas infectados con MV-deltaC.

5 Como se define en el presente documento, la expresión "*actividad apoptótica*" se refiere a la capacidad de inducir o suscitar la apoptosis en células, lo que puede demostrarse mediante apoptosis *in vitro* en tumores malignos o células cancerosas, en particular células de mesotelioma maligno, melanoma y de adenocarcinoma de pulmón de los ejemplos.

10 Las actividades presentadas por un virus MV-deltaC adecuado para su uso de acuerdo con la invención pueden caracterizarse por la producción de moléculas de la respuesta inmunitaria o en el estrés celular, o en la muerte celular. Estas moléculas abarcan el HMGB-1 (grupo de alta movilidad Box-1), la calreticulina y la proteína de choque térmico (Hsp70), que se describieron como señales de peligro implicadas en la activación de la respuesta inmunitaria (Zitvogel, L *et al.* Cell, 2012, 140:798-804).

15 Se sabe que la caspasa-3 está implicada en sucesos tardíos del programa de apoptosis (Duprez, L. *et al.*, Microbes Infect, 2009, 11(13): 1050-1062).

20 Como se describe en el presente documento, dicho MV-deltaC infeccioso genéticamente modificado induce la activación de la caspasa 3 en el tumor maligno o células cancerosas infectados con MV-deltaC.

La presencia de la proteína Hsp70 en la capa externa de la membrana plasmática de las células infectadas está implicada en la respuesta inmunitaria, en particular en el reconocimiento por las células presentadoras de antígeno y los efectores inmunitarios celulares innatos (Oglesbee *et al.*, Viral Immunol, 2002, 15(3):399-416).

25 Como se describe en el presente documento, dicho MV-deltaC infeccioso genéticamente modificado induce la exposición de la proteína Hsp70 en la capa externa de la membrana plasmática en un tumor maligno o células cancerosas infectados con MV-deltaC.

30 La calreticulina es una proteína esencial del retículo endoplásmico, que se puede relocalizar en la capa externa de la membrana plasmática durante el estrés celular (Heal *et al.*, Biochem J, 1998, 329(2), 389-394). En particular, esta exposición en la superficie celular permite la fagocitosis de células apoptóticas por células presentadoras de antígeno (Ogden *et al.*, J Exp Med, 2001, 194(6):781-795). Recientemente, algunas investigaciones plantearon la hipótesis de que la exposición de calreticulina en la superficie celular estipula la inmunogenicidad de su muerte (Obeid *et al.*, Nat Med, 2007, 13(1): 54-61).

35 Como se describe en el presente documento, dicho MV-deltaC infeccioso genéticamente modificado induce la translocación de la calreticulina en la superficie celular del tumor maligno o células cancerosas infectados con MV-deltaC.

40 La proteína HMGB-1 (grupo de alta movilidad Box-1) liberada en el entorno durante la muerte celular inmunogénica actúa sobre la maduración de las células dendríticas al unirse a distintos receptores, tal como TLR4 (Apetoh *et al.*, Nat Med, 2007, 13(9): 1050-1059) y TLR9 (Tian *et al.*, Nat Immunol, 2007, 8(5): 487-496).

45 Como se describe en el presente documento, dicho MV-deltaC infeccioso genéticamente modificado induce la liberación de HMGB-1 en el medio extracelular del tumor maligno o células cancerosas infectados con MV-deltaC.

50 Los inventores han comparado la inducción de muerte celular en líneas celulares de cáncer humano (células de adenocarcinoma de pulmón humano A549 y células de cáncer de cuello uterino Hela) y en células no cancerosas (células de riñón embrionario humano HEK 293 y células de riñón de mono verde africano Vero). Demostraron que MV-deltaC inducía una muerte celular mucho más alta y más temprana que el MV no modificado, tanto en las células de cáncer humano A549 como Hela, incluso a una baja MOI (Figura 23A). Los inventores también han observado que la inducción de muerte celular en células Vero fue similar tanto para el MV no modificado como para MV-deltaC, mientras que no se observó muerte celular en las células HEK 293 después de 68 horas de infección (Figura 23B). Por lo tanto, los inventores demostraron que MV-deltaC era específico para las células cancerosas humanas: de hecho, MV-deltaC mostró una actividad apoptótica mayor que el MV no modificado cuando se puso en contacto con células cancerosas humanas, pero mostró una actividad apoptótica similar al MV no modificado cuando se puso en contacto con líneas celulares de laboratorio, es decir, con células Vero.

60 La divulgación describe un método para preparar células dendríticas plasmocitoides (las pDC) vacunales destinadas al tratamiento de un tumor maligno o un cáncer en un individuo diagnosticado de tal tumor maligno o una afección relacionada con cáncer, que comprende las siguientes etapas:

65 - la infección *in vitro* de un tumor maligno o de células cancerosas que previamente se han recogido del individuo, con un virus del sarampión infeccioso obtenido de una cepa del virus del sarampión atenuada viva para producir un lisado celular;

- poner en contacto las pDC con el lisado celular para producir las pDC vacunales;
- recuperar pDC cargadas.

5 La presente invención también se refiere a un método para preparar células dendríticas plasmocitoides (las pDC) vacunales destinadas a tratar un tumor maligno o un cáncer en un individuo diagnosticado de tal tumor maligno o una afección relacionada con cáncer, que comprende las siguientes etapas:

- 10 - la infección *in vitro* de un tumor maligno o de células cancerosas que previamente se han recogido del individuo, con un virus del sarampión infeccioso genéticamente modificado obtenido de una cepa del virus del sarampión atenuada viva, en el que el gen que codifica la proteína C accesoria vírica se ha suprimido (MV-deltaC) para producir un lisado celular;
- 15 - poner en contacto las pDC con el lisado celular para producir las pDC vacunales;
- recuperar las pDC cargadas.

20 En la presente invención, dicho tumor maligno o cáncer del método definido anteriormente es un tumor maligno agresivo o un cáncer agresivo, en particular mesotelioma maligno, melanoma y adenocarcinoma de pulmón.

25 En la presente invención, dicha cepa del virus del sarampión atenuada viva del método definido anteriormente es la cepa Schwarz o la cepa Moraten.

30 Cuando MV-deltaC se administra a un individuo, puede administrarse a través de la cavidad intrapleural o por las vías intranasal, intramuscular, intravenosa o subcutánea. Cuando MV-deltaC se administra a través de la cavidad intrapleural, se administra preferentemente proximidad estrecha o directamente en el tumor maligno o en las células cancerosas a tratar.

35 La cantidad terapéuticamente eficaz de MV-deltaC a administrar está preferiblemente en el intervalo de 10^3 a 10^9 dosis infecciosa del 50 % del cultivo tisular (DICT50). La determinación de la DICT50 es bien conocida por un experto en la materia y está notablemente descrita por Kärber (Kärber, Arch. Exp. Path. Pharmac, 1931, 162:840-483).

40 La etapa de tomar el tumor maligno o las células cancerosas del individuo para permitir la preparación *ex vivo* de las pDC vacunales preferentemente no está incluida en el método de preparación de las pDC vacunales. Esta etapa se puede realizar de acuerdo con cualquier técnica conocida por un experto en la materia, para tomar o tomar muestras de células, tales como biopsias y derrames (es decir, derrames pleurales). Después de tomarse, el tumor maligno o las células cancerosas se pueden mantener en cultivo de acuerdo con técnicas clásicas, o se pueden congelar (es decir, a -80 °C) para su conservación, por ejemplo. Cuando el tumor maligno o las células cancerosas no proceden del individuo a tratar con las pDC vacunales, pueden proceder, notablemente, de líneas celulares alogénicas de mesotelioma maligno, melanoma y adenocarcinoma de pulmón.

45 En el método de preparación *in vitro* definido anteriormente, la infección del tumor maligno o de las células cancerosas con MV-deltaC se puede realizar poniendo en contacto las células y el virus directamente, por ejemplo, a una multiplicidad de infección (MOI) de 1, con una incubación de 2 horas a 37 °C. Después de la infección, la muerte de las células infectadas se progresa espontáneamente debido a la acción del virus. Habitualmente, se forma en primer lugar un sincicio, seguido de la lisis de las células, proporcionando de este modo un lisado celular adecuado para la preparación de la vacuna. Este fenómeno se puede evidenciar mediante la observación microscópica directa de las células infectadas.

50 Como se define en el presente documento, la expresión "lisado celular" abarca el lisado celular completo (o total) obtenido como se divulga en el presente documento, o fracciones del lisado celular, tal como fracciones membranosas (es decir, cuerpos de inclusión citoplásmicos o apocuerpos).

55 Las pDC pueden obtenerse mediante numerosos modos muy conocidos para un experto en la materia. En una realización particular de la invención, en el método de preparación definido anteriormente, las pDC proceden preferentemente del individuo a tratar. Actualmente es preferente que las pDC se obtengan de leucocitaféresis. La obtención de las pDC es particularmente muy conocida por un experto en la materia. Preferentemente, las pDC se pueden obtener siguiendo la metodología general descrita por Coulais (Coulais, D *et al.*, Cytotherapy, 2012, 14(7): 887-896). Cuando las pDC proceden del individuo a tratar, las pDC se pueden obtener de leucocitaféresis de dicho individuo.

60 Como será obvio para un experto en la materia, el contacto de las pDC y del lisado celular debe mantenerse durante un tiempo suficiente para permitir una carga eficaz de antígenos presentes en el lisado celular por parte de las pDC. Una vez cargadas (o pulsadas), se obtienen las pDC vacunales. La carga puede progresar siguiendo la metodología general descrita por Gauvrit (Gauvrit, A *et al.*, Cancer Res, 2008, 68(12), 4882-4892). Un período de contacto

ejemplar entre las pDC y el lisado celular suficiente para permitir una carga eficaz de las pDC es de aproximadamente 24 horas. El estado activado para las pDC generalmente se alcanza después de que se hayan cargado las pDC. El estado activado (o estado maduro) de las pDC puede evidenciarse mediante numerosos marcadores bien conocidos por el experto en la materia, tales como marcadores de membrana o de citocinas. Dichos marcadores de células dendríticas activadas se han enumerados notablemente por Barchet (Barchet, W *et al.*, *Seminars in Immunology*, 2005, 17(4):253-261) y Marafioti (Marafioti, T *et al.*, *Blood*, 2008, 111(7):3778-3792).

Por lo tanto, como se describe en el presente documento, las pDC vacunales, que pueden obtenerse de acuerdo con el método de preparación de la invención, son particularmente ventajosas dado que son potentes estimuladoras de los linfocitos T CD8 antineoplásicos. Igualmente, ventajoso, el método de preparación de acuerdo con la invención permite la preparación de las pDC vacunales en un estado activado.

La divulgación describe células dendríticas vacunales que pueden obtenerse mediante el método de preparación definido anteriormente. Como se describe en el presente documento, dichas pDC vacunales pueden usarse en el tratamiento de un tumor maligno agresivo o de un cáncer agresivo, cuando se administra a un individuo diagnosticado de tal tumor maligno o una afección relacionada con cáncer.

Más particularmente, como se describe en el presente documento, se pueden usar en el tratamiento del mesotelioma maligno, el melanoma y el adenocarcinoma de pulmón, cuando se administran a un individuo diagnosticado de tal afección. Como se describe en el presente documento, la aplicación del MV-deltaC es, de forma similar, relevante para el uso de las pDC como se describe en el presente documento.

Los inventores se abordaron, *in vitro*, el efecto de la infección de células tumorales por MV Schwarz sobre el estado de activación de las pDC humanas y su capacidad para presentar de forma cruzada un antígeno tumoral a un clon de linfocitos T CD8+ específico. Los inventores demostraron que, pesar de la expresión de CD46, las pDC no fueron sensibles a la infección por VM. Sin embargo, las pDC tuvieron la capacidad de responder al MV *in vitro* produciendo IFN- α , con una mayor sensibilidad cuando se añadió IL-3 al cultivo. Los inventores también demostraron que las células tumorales infectadas con MV desencadenaron la activación de pDC, notablemente, la producción de IFN- α , mientras que las células tumorales irradiadas con UV no lo hicieron. La activación de pDC probablemente fue provocada por el ARN monocatenario del MV, lo que desencadenó TLR7 en el compartimento endocítico de las pDC después de la fagocitosis de células tumorales infectadas con MV. Curiosamente, los inventores mostraron como ilustración, por primera vez, que las pDC humanas cocultivadas con células tumorales infectadas con MV fueron capaces de presentar de forma cruzada el antígeno tumoral NYESO-1 a un clon de linfocitos T CD8+ específico. Estos resultados sugieren que, además de un efecto de lisis tumoral directo, la viroterapia antitumoral basada en MV puede desencadenar una respuesta inmunitaria antitumoral por activación de las pDC. Se esperan resultados similares utilizando MV-deltaC dado que la infección de células tumorales por el virus mutado es similar. Incluso se espera una respuesta mayor, dado que MV-deltaC conduce a una expresión más elevada de señales de peligro (calreticulina y Hsp70) después de la infección de las células tumorales, y las células infectadas también expresaron el ARN monocatenario de MV-deltaC.

La presente invención también está dirigida a una composición farmacéutica que comprende, como principio activo, un MV-deltaC infeccioso genéticamente modificado, en asociación con un vehículo farmacéuticamente aceptable, para su uso en el tratamiento de un tumor maligno agresivo o de un cáncer agresivo mediante la activación de las pDC, cuando se administra a un individuo diagnosticado de tal tumor maligno o una afección relacionada con cáncer.

Como se define en el presente documento, los vehículos farmacéuticamente aceptables abarcan cualquier sustancia que permita la formulación de MV-deltaC dentro de una composición. Un vehículo es cualquier sustancia o combinación de sustancias fisiológicamente aceptables, es decir, apropiadas para su uso en una composición en contacto con un hospedador, especialmente un ser humano y, por lo tanto, no tóxica. Ejemplos de tales vehículos son las soluciones salinas tamponadas con fosfato, el agua destilada, las emulsiones tales como las emulsiones de aceite/agua, diversos tipos de soluciones estériles de agentes humectantes y similares.

La presente invención también se refiere a una composición farmacéutica o a un conjunto de principios activos que comprenden un MV-deltaC infeccioso genéticamente modificado, y que comprende además un agente quimioterapéutico y un vehículo farmacéuticamente aceptable para su uso en el tratamiento de un tumor maligno agresivo o de un cáncer agresivo, cuando se administra a un individuo diagnosticado de tal tumor maligno o una afección relacionada con cáncer.

Como se define en el presente documento, un agente quimioterapéutico es una molécula que se puede usar en el tratamiento de un tumor maligno o un cáncer. La naturaleza del agente quimioterapéutico dependerá del tipo de tumor maligno o cáncer. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos son muy conocidos por un experto en la materia.

De acuerdo con una realización particular de la invención, la composición farmacéutica o el conjunto de principios activos para su uso en el tratamiento de un tumor maligno agresivo o de un cáncer agresivo, cuando se administra a

un individuo diagnosticado de tal tumor o una afección relacionada con cáncer, comprende además las pDC vacunales que pueden obtenerse mediante el método de preparación definido anteriormente.

La presente invención también se dirige a un conjunto de principios activos que comprenden (i) un MV-deltaC infeccioso genéticamente modificado y (ii) las pDC vacunales que pueden obtenerse mediante el método definido anteriormente, para su uso para la administración simultánea o separada en el tratamiento de un tumor maligno agresivo o de un cáncer agresivo, cuando se administra a un individuo diagnosticado de tal tumor maligno o una afección relacionada con cáncer.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1. MV y MV-deltaC. (A) Diagrama esquemático del genoma de MV y del orden de los genes que muestra que el gen P codifica para las proteínas P, V y C (se muestran las ORF de P, V y C). B) Porción de la secuencia de nucleótidos de los plásmidos pTM-MVSchw (SEQ ID NO: 3) y pTM-MVSchw-deltaC-ATU1 (eGFP), en donde el nucleótido T en la posición 2788 del ADNc del genoma de MVSchw nativo se ha reemplazado por un nucleótido C (SEQ ID NO: 4); además de esta primera mutación, se puede introducir una segunda mutación añadiendo un codón de terminación cadena abajo en la fase de lectura abierta de C, es decir, el codón de terminación "TAG", que se obtiene reemplazando el nucleótido G en la posición 2803 del ADNc del genoma de MVSchw nativo por un nucleótido A (SEQ ID NO: 5) (las mutaciones de nucleótidos introducidas están subrayadas).

Figura 2. Expresión de las proteínas P, V y C por parte de MV, MV-deltaC y MV-P_{G954}. Los lisados de células Vero infectadas con los distintos virus se fraccionaron en un gel de SDS-PAGE y las proteínas P, V, C se detectaron mediante transferencia de Western utilizando anticuerpos monoclonales específicos.

Figura 3. Cinética de replicación de MV, MV-P_{G954}, MV-deltaV y MV-deltaC. Se infectaron células Vero (A), HeLa (B), Jurkat (C) y U937 (D) con los distintos virus a una MOI de 1. Los títulos víricos asociados a las células se determinaron como valores de DICT₅₀.

Figura 4. Efectos citopáticos de MV y MV-deltaC sobre células Vero y HeLa. Panel superior: Efectos citopáticos inducidos en células Vero 24 horas después de la infección con MV o MV-deltaC (MOI de 0,1). Panel inferior: Inmunofluorescencia de células HeLa 24 horas después de la infección con MV o MV-deltaC. Las células se fijaron y tiñeron con un monoclonal anti hemaglutinina (H) de MV.

Figura 5. Cinética de la expresión de proteínas víricas en células Vero infectadas con MV o MV-deltaC. Las células se infectaron a una MOI de 1 y después se lisaron en distintos puntos de tiempo. Los lisados celulares se analizaron mediante transferencia de Western y las proteínas víricas N y V se identificaron utilizando anticuerpos monoclonales específicos (clon 120 anti N, Naniche, D. *et al.*, J Gen Virol., 1992, 73(10):2617-2624; anti V, Takeuchi, K. *et al.*, FEBS Letters, 2003, 545 (2), 177-182).

Figura 6. Respuesta humoral anti MV inducida en ratones CD46/IFNAR inmunizados con MV-P_{G954}, MV-deltaV o MV-deltaC. Los títulos de anticuerpos se determinaron mediante ELISA en sueros recolectados 2 meses después de una única inoculación. (A) Ensayos de dilución límite de sueros agrupados procedentes de distintos grupos de ratones. (B) Títulos individuales por ratón. (C) Títulos medios por grupo. Los títulos de anticuerpos se definieron como la dilución límite de los sueros analizados que proporcionan el doble de valor de absorbancia calculado frente al de los sueros de ratones no inmunizados.

Figura 7. Infección e inducción de muerte celular por MV-deltaC. A) Las células tumorales se infectaron con MV o MV-deltaC (MOI=1, 2 h) y se analizaron por citometría de flujo después de la doble tinción con FITC-Anexina V y yoduro de propidio a las 72 horas después de la infección. Los datos representan los porcentajes de células con Anexina-V.

B) Las células tumorales infectadas con virus (MV o MV-deltaC) y no infectadas se analizaron mediante citometría de flujo después de la tinción con un anticuerpo anti caspasa 3 activa (BD Biosciences) 72 horas después de la infección. Los porcentajes indican la proporción de células "Caspasa 3 activada positivas" después de la infección por MV-deltaC.

Figura 8. Exposición de la proteína Hsp70 en la superficie celular. La expresión de la proteína Hsp70 de membrana se determinó 48 horas después de la infección de las células de mesotelioma epitelioides Meso13 y Meso56, o 72 horas después de la infección de las células de adenocarcinoma de pulmón A549 y de melanoma M17, por tinción extracelular y citometría de flujo. Los datos representan los porcentajes de células Hsp70.

Figura 9. Translocación en la membrana de la calreticulina después de la infección por MV-deltaC. Las células tumorales no infectadas e infectadas (MV o MV-deltaC, MOI=1) se tiñeron con un anticuerpo anti calreticulina y un anticuerpo secundario anti ratón conjugado con Cy5, 48 horas después de la infección de células de mesotelioma epitelioides Meso13 y Meso56 o 72 horas después de la infección de células de adenocarcinoma de

pulmón A549 y células de M17 melanoma. Después, las células se analizaron por citometría de flujo. Los datos representan los porcentajes de células con calreticulina.

5 Figura 10. Liberación de HMGB-1 en el entorno extracelular. Se recolectaron sobrenadantes de células tumorales no infectadas o infectadas (MV o MV-deltaC, MOI=1) a las 24, 48 o 72 horas después de la infección y se almacenaron a -20 °C. Después, se determinó la cantidad de HMGB-1 en estos sobrenadantes mediante ELISA.

10 Figura 11. Expresión del receptor de MV, sensibilidad a la infección por MV y supervivencia de las células tumorales y de las pDC. (A) Expresión de CD46 y CD150/SLAM en la superficie de líneas de células tumorales (M18, Meso13 y A549) y las pDC (tinción por Acm: histograma gris; control de isotipo: histograma blanco; los valores en los histogramas son la IFM-R, intensidad de fluorescencia media relativa, definida como la IFM de tinción de Acm dividida por la IFM del control de isotipo). (B) Infección de líneas celulares tumorales (M18, Meso13 y A549) y las pDC por MV-eGFP (MOI=1). (C) Infección de las pDC por MV-eGFP (MOI=1), en presencia o ausencia de IL-3. (D) Infección de las pDC por MV-eGFP con una MOI creciente, en presencia o ausencia de IL-3. (E) Supervivencia de líneas celulares tumorales después de la infección por VM o la irradiación con UV. Tres días después de la infección o la radiación con UV, las células se incubaron con TO-PRO®3 que tiñe células muertas. La fluorescencia se analizó mediante citometría de flujo. Los resultados en las Figuras 1A, 1C y 1E son representativos de tres experimentos independientes. Los resultados en las Figuras 1B y 1E reflejan la media de tres experimentos independientes. Las barras de error indican la desviación típica.

25 Figura 12. Infección de las pDC por MV-eGFP o MV-eGFP irradiado con UV. Se cultivaron las pDC en presencia de IL-3 o de células Meso13 solas (NI) o con MV-eGFP (MV) o MV-eGFP irradiado con UV (MV*) (312 nm - 100 kJ/m²) a MOI=50 durante 72 horas (panel superior) o durante 2 horas y después cultivadas durante 70 horas (panel inferior). La fluorescencia se analizó mediante citometría de flujo.

30 Figura 13. Las células tumorales infectadas con MV inducen la maduración de pDC. Las pDC se cultivaron durante 18 horas con IL-3, MV (MOI=1), MV e IL-3, R848, células tumorales irradiadas con UV o infectadas por MV. (A) Expresión de CD83, CD86 y CD40 por las pDC se midió por citometría de flujo con una ventana de adquisición en las células CD123+/BDCA-4⁺. (B) Los histogramas son obtuvieron de tres experimentos independientes. Se utilizó la prueba de comparación no paramétrica de Mann Whitney para determinar el valor de P, que se obtuvo por comparación del resultado de la muestra con el resultado de las pDC de IL-3 (*p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001).

35 Figura 14. La activación de las pDC en respuesta a las células tumorales infectadas por MV es independiente de la replicación del MV en las pDC y de la infección mediante CD46. (A) los pDC se cultivaron con IL-3 sola, R848, IL-3/MV-eGFP (MV), IL-3/MV-eGFP con anti CD46 10 mg/ml o IL-3/MV-eGFP irradiado con UV (MV*) a MOI=1 durante 18 horas. La expresión de CD83, CD80 y CD86 por las pDC se determinó por citometría de flujo. (B) las pDC se cultivaron con IL-3, M18 irradiadas con UV, M18 infectadas con MV (M18MV) en presencia o ausencia de anti CD46 (Hycult biotech) 10 mg/ml, o M18 infectadas con MV irradiado por UV antes de la exposición a las pDC (M18MV*). La expresión de CD83, CD80 y CD86 por las pDC (ventana de adquisición en las células BDCA-4+/HLA-DR+) se determinó por citometría de flujo. (C) Producción de IFN-α por las pDC medida por ELISA. (D) Inhibición de la infección de M18 por MV-eGFP por anticuerpo monoclonal anti CD46 10 mg/ml después de 72 horas de cultivo.

45 Figura 15. Fagocitosis de células tumorales infectadas por MV o irradiadas con UV por las pDC. (A) Las células tumorales infectadas con MV e irradiadas con UV se tiñeron con PKH-67 y se cocultivaron con las pDC durante 18 horas a 4 °C o 37 °C (1 DC:1 célula tumoral). Las células se tiñeron con Acm específico para HLA-DR. La fluorescencia se analizó mediante citometría de flujo. Este experimento es representativo de cuatro experimentos. (B) Representación por un diagrama de dispersión de los cuatro experimentos de fagocitosis. Las barras de error indican la desviación típica. (C) Las células tumorales infectadas con MV se tiñeron con PKH-67 (verde) y se cocultivaron con las pDC durante 18 horas. Las células se tiñeron con Acm específico para HLA-DR (rojo). La fluorescencia se analizó mediante microscopía confocal.

55 Figura 16. La producción de IFN-α por las pDC en respuesta al MV es dependiente de TLR7. (A) las pDC se cultivaron durante 18 horas con IL-3, MV (MOI=1), MV e IL-3, R848, células tumorales M18 o A549 irradiadas con UV o infectadas por MV. La producción de IFN-α se midió mediante ELISA en los sobrenadantes de cultivo. (B) las pDC se cultivaron durante 18 horas con o sin IL-3 y con cantidades crecientes de MV. La producción de IFN-α se midió mediante ELISA en los sobrenadantes de cultivo. (C) las pDC se cultivaron durante 18 horas con IL-3 y MV (MOI=10), CpG-A o M18 infectadas por MV, en ausencia o presencia de distintas concentraciones de IRS661 (inhibidor de TLR7). La producción de IFN-α se midió mediante ELISA en los sobrenadantes de cultivo. Los resultados son obtuvieron de tres experimentos independientes.

65 Figura 17. Presentación cruzada de NYESO-1 por HLA-A*0201+pDC después del cocultivo con células tumorales M18-NYESO-1+/HLA-A*0201 infectadas con MV. (A) Expresión de NYESO-1 por las líneas celulares tumorales M18 y A549 determinada por PCR en tiempo real (n=3). (B) las pDC se cultivaron durante 18 horas

con IL-3, R848 o células tumorales M18 irradiadas con UV o infectadas por MV. Algunas pDC cultivadas con R848 se pulsaron con péptido NYESO-1(157-165) durante 1 hora y se lavaron. Después, las pDC se cocultivaron durante 6 horas con el clon de linfocitos T CD8+ M117.167 específico para HLA-A*0201/NYESO-1(157-165) (definido como LT) en presencia de brefeldina A. La producción de IFN- γ por el clon de linfocitos T M1 17.167 se analizó mediante citometría de flujo después de la tinción con Acm específico de IFN- γ y CD8. (C) las pDC se cultivaron durante 18 horas con R848, o células tumorales M18 (NYESO-1+/HLA-A*0201-) o A549 (NYESO-1-/HLA-A*0201-) irradiadas con UV o infectadas con MV. Algunas pDC cultivadas con R848 se pulsaron con péptido NYESO-1(157-165) durante 1 hora y se lavaron. Después, las pDC se cocultivaron durante 6 horas con el clon de linfocitos T CD8+ M1 17.167 específico para HLA-A*0201/NYESO-1(157-165) en presencia de brefeldina A. La producción de IFN- γ por el clon de linfocitos T M 117.167 se analizó mediante citometría de flujo después de la tinción con Acm específico de IFN- γ y CD8. (D) Representación por diagrama de dispersión de experimentos de presentación cruzada. "n" representa el número de experimentos realizados. "n" es distinto de una condición a otra, dado que los inventores no pudieron realizar todos los controles en cada experimento debido a la cantidad limitada de pDC disponibles.

Figura 18. Esquema de las condiciones de cultivo utilizadas en los experimentos de presentación cruzada.

Figura 19. (A) y (B) Infección y muerte celular de células de melanoma por MV no modificado o MV-deltaC. Análisis de la muestra por citometría de flujo en cuanto al nivel de infección y la muerte celular inducida a las 24 h, 48 h y 72 h después de la infección con MV no modificado o MV-deltaC a una MOI de 1. La cepa vacunal MV-deltaC infectó de forma eficaz las células tumorales que eran resistentes a la infección con la cepa de vacunal MV no modificada. Las células tumorales de melanoma se infectaron con MV-eGFP no modificado o MV-deltaC eGFP a distintas MOI durante 2 horas.

Figura 20. Muerte celular de células de melanoma por MV no modificado o MV-deltaC. Las células tumorales de melanoma se infectaron con MV-eGFP no modificado o MV-deltaC eGFP a distintas MOI durante 2 horas. La tasa de muerte celular inducida (% de células Topro + en las células no infectadas - % de células Topro + en células las infectadas) de cada línea celular se determinó mediante citometría de flujo a las 24 h, 48 h y 72 h posinfección.

Figura 21. Expresión de "señales de peligro" después de la infección de células de melanoma por MV no modificado o MV-deltaC. (A) Ejemplo de análisis por citometría de flujo de la expresión de HSP70 y con calreticulina (CRT) 24 h, 48 h y 72 h después de la infección por MV no modificado o MV-deltaC. (B) La expresión en membrana de la proteína HSP70 y de CRT en células tumorales no infectadas y en células infectadas con MV no modificado y MV-deltaC (MOI = 0,5) se determinó a las 72 h después de la infección mediante marcaje extracelular y citometría de flujo.

Figura 22. Crecimiento tumoral de melanoma *in vivo* después de la inyección intratumoral con MV-deltaC. Los tumores injertados se inyectaron con PBS para visualizar el crecimiento normal del tumor como control. En estos ratones de control, el volumen del tumor aumentó de 45 mm³ a 150 mm³ en 13 días. En el grupo tratado con el MV-deltaC, se observó una mayor reducción del volumen del tumor 10 días después de la inyección, el cual alcanzó los 25 mm³, y los tumores se eliminaron a los 14 días después de la inyección.

Figura 23. Supervivencia de células cancerosas y no cancerosas después de la infección con MV-deltaC o MV no modificado. Las células cancerosas A549 y Hela humanas (A) y las células no cancerosas HEK 293 y Vero (B) se infectaron con MV-deltaC (barras negras en el gráfico) o con MV no modificado (barras blancas en el gráfico) a distintas MOI (triplicado). Después de 24, 46 y 68 horas de cultivo, se determinó el número de células vivas utilizando el reactivo CellTiter-GLO, un ensayo basado en luciferasa que evalúa mediante cuantificación de ATP el número de células metabólicamente activas en los pocillos de cultivo.

Figura 24. Cinética de replicación del MV no modificado y de MV-deltaC en células cancerosas y no cancerosas. Se infectaron células cancerosas A549 y Hela humanas y células no cancerosas HEK 293 y Vero con MV-deltaC o con MV no modificado a una MOI de 1. Los títulos víricos se determinaron por la DICT50.

Ejemplos

Ejemplo 1

Estudios comparativos entre MV no modificado y MV-deltaC

Infección *in vitro* con VM no modificado. Se obtuvieron cepas Schwarz del MV atenuadas vivas de F. Tangy (Instituto Pasteur, Francia). MV Schwarz se rescató del ADNc de pTM-MV Schw (depositado por el Instituto Pasteur en la CNM (París, Francia) con el número 1-2889 el 12 de junio de 2002) mediante el uso del sistema de rescate basado en células auxiliares descrito por Radecke (Radecke *et al.*, EMBO J., 1995, 14:5773-5784) y modificado por Parks (Parks *et al.*, J. Virol., 1999, 73:3560-3566). En resumen, se transfectaron células auxiliares 293-3-46 con 5 μ g de pTM-MV Schw y 0,02 μ g de pEMC-Lschw que expresan el gen L de MV Schwarz (Combredet *et al.*, J. Virol., 2003,

77:11546-11554). Después de una incubación de una noche a 37 °C, se aplicó un choque térmico durante 2 horas a 43 °C, y las células transfectadas se transfirieron a una monocapa de células Vero. Los sincicios que aparecieron en 15 días de cocultivo se transfirieron a pocillos de 35 mm y después se expandieron en matraces de 75 cm² y 150 cm² de cultivo de células Vero en DMEM con SFT al 5 %. Cuando los sincicios alcanzaron una confluencia del 80-90 %, las células se despegaron por raspado en un pequeño volumen de OptiMEM y se congelaron y descongelaron una vez. Después de una centrifugación a baja velocidad para sedimentar los restos celulares, el sobrenadante que contenía el virus se almacenó a -80 °C. El título de la reserva de MV recombinante se determinó por un ensayo de dilución límite final en células Vero. La DICT50 se calculó mediante el uso del método de Kärber (Kärber, Arch. Exp. Path. Pharmac., 1931, 162:480-483).

Infección *in vitro* con MV-deltaC. MV-deltaC también se rescató por genética inversa en células auxiliares HEK293-T7-MV y se amplificó en células Vero, en un proceso similar al descrito en el documento WO2004/000876 para MV no modificado. El clon de ADNc adecuado que codifica el genoma de MV-deltaC se preparó, por consiguiente, a partir de partículas víricas de MV purificadas como se divulga en dicha solicitud, o del plásmido pTM-MV Schw que se modificó por mutación del segundo codón de iniciación "ATG" presente en la ORF (+1) en la región N-terminal del gen P para proporcionar el plásmido pTM-MV Schw-deltaC-ATU1 (eGFP). En particular, el codón "ATG" se reemplazó por un codón "ACG" por mutación de T a C (SEQ ID NO: 1) (Figura 1B). De forma similar, también se rescató una variante de MV-deltaC mediante genética inversa utilizando un plásmido variante pTM-MV Schw-deltaC-ATU1 (eGFP) que tiene la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2, en donde se realizó una sustitución adicional en la posición 2803 para reemplazar el nucleótido G por un nucleótido A.

Caracterización de MV-deltaC. Para confirmar que el gen que codifica la proteína C se había suprimido y que las proteínas P y V aún se expresaban, se realizó una transferencia de Western de lisados de células Vero infectadas, utilizando anticuerpos monoclonales específicos (anti P; anti V y anti C), Takeuchi, K. *et al.*, FEBS Letters, 2003, 545 (2), 177-182) (Figura 2).

Por lo tanto, la expresión de las proteínas P, V y C por MVdelta-C se comparó con la obtenida por MV, MV-deltaV (MV, en el que se suprimió la proteína V) y MV-P_{G954} (MV, en el que el gen P se reemplazó por el gen P de una cepa de tipo silvestre (es decir, G954)). La Figura 2 muestra que MV-deltaC ya no expresaba la proteína C, mientras que las proteínas V y P se expresaban correctamente. La estabilidad de la mutación presente en MV-deltaC se controló mediante secuenciación del genoma después de 10 pases del virus en células Vero: no se observó reversión.

Cinética de crecimiento de MV-deltaC. La cinética de crecimiento de MV-deltaC se analizó en distintas líneas celulares competentes o no para la respuesta de IFN tipo I (Figura 3). Las células vero (células epiteliales de mono verde africano) tienen una delección en el gen IFN- β (Mosca, J.D., Pitha, P.M. Mol Cell Biol., 1986, 6(6), 2279-2283), por lo tanto, la respuesta de IFN tipo I no puede iniciarse en estas células después de una infección vírica. Por el contrario, las Hela (células epiteliales de carcinoma humano), las Jurkat (linfocitos T humanos) y las U937 (monocitos humanos) son competentes para iniciar la respuesta de IFN de tipo I. En comparación con otros virus MV analizados en células Vero, MV-deltaC creció rápidamente durante las primeras 24 horas, luego su crecimiento disminuyó repentinamente. La detención del crecimiento se confirmó en otros tipos de células analizadas que son competentes para la respuesta de IFN tipo I (HeLa, Jurkat y U-937). Por lo tanto, a diferencia de otros estudios (Takeuchi, K. *et al.*, J. Virol., junio de 2005, 7838-7844; Patterson, J. B. *et al.*, Virology, 2000, 267(1):80-89), el déficit de crecimiento de MV-deltaC no parece estar relacionado con la presencia o ausencia de IFN.

Efectos citopáticos de MV-deltaC. Varias explicaciones podrían explicar la repentina detención del crecimiento de MV-deltaC. De hecho, Las células Vero infectadas por MV se caracterizan por la formación de sincicios gigantes (células multinucleadas) que son el resultado de la fusión de células infectadas que expresan las glucoproteínas MV con células vecinas no infectadas que expresan el receptor CD46. Los inventores observaron que MV-deltaC indujo la formación de sincicios mucho más rápido que el MV no modificado, en células Vero (Figura 4) y todos los otros tipos de células analizadas. A partir de las 24 horas de infección con una MOI de 1, prácticamente todas las células Vero se fusionaron en un sincicio gigante, el cual se rompió algunas horas más tarde. Esto explica la caída del crecimiento observada 24 horas posinfección: no quedaban células sin tratamiento previo vivas en el cultivo para sustentar una infección productiva. La apoptosis prematura de las células infectadas es probablemente responsable de la detención del crecimiento vírico observada. Se demostró previamente que un MV-deltaC obtenido de una cepa patógena de MV (Ichinose) ejerce un efecto citopático mayor que el virus parental (Takeuchi, K. *et al.*, J. Virol., junio de 2005, 7838-7844).

La fusión celular exacerbada inducida por MV-deltaC podría deberse a una producción mayor o anterior de proteínas víricas, en particular de glucoproteínas H y F en la superficie de las células infectadas, que propiciarían la fusión celular rápida y masiva. La cinética de la expresión de hemaglutinina (H) vírica en células HeLa infectadas con MV-deltaC o MV no modificado (MOI = 1) se analizó mediante inmunofluorescencia. Las células se tiñeron con un anticuerpo monoclonal anti MV-H acoplado a FITC (Figura 4). El resultado muestra que 24 horas después de la infección, MV-deltaC provoca una infección más masiva e induce una expresión de H mucho más extensa que el MV no modificado.

Cinética de la expresión de proteínas víricas en células Vero infectadas con MV y MV-deltaC. Para confirmar la producción aumentada de proteínas víricas en ausencia de expresión de proteína C, se analizó a lo largo del tiempo el contenido de proteínas víricas N y V en lisados de células Vero infectadas con MV-deltaC o MV no modificado a una MOI de 1 (Figura 5). A partir de las 6 horas de infección, la nucleoproteína N fue detectable en las células infectadas con MV-delta C, mientras que solo fue detectable después de 21 horas de infección con el MV no modificado. Se hizo la misma observación para la proteína V. Este resultado demuestra que MV-deltaC expresa las proteínas víricas mucho antes y en cantidades mayores que el MV no modificado.

Inmunogenicidad de MV-deltaC. Para evaluar el impacto del silenciamiento de la expresión de la proteína C sobre la inmunogenicidad del vector vacunal de MV, se inmunizaron ratones CD46+/- IFNAR-/- susceptibles a la infección por MV (Combredet, C. *et al.*, 2003, J Virol, 77(21): 11546-11554; Mrkic B. *et al.*, J Virol., 2000, 74(3):1364-1372). Estos ratones están diseñados genéticamente para expresar el receptor CD46 humano de las cepas vacunales de MV y están incapacitados para la expresión del receptor de IFN tipo I (IFNAR). Se utilizan comúnmente para evaluar la inmunogenicidad de los vectores de MV (Brandler, S. *et al.*, PLoS Neglected Tropical Diseases, 2007, 1(3):e96; Combredet, C. *et al.*, 2003, J Virol, 77(21): 11546-11554). Aunque el IFN α/β es ineficaz en estos ratones, este modelo se utilizó para evaluar inicialmente el impacto del silenciamiento de la expresión de la proteína C *in vivo*. MV-deltaC se comparó con el MV no modificado, con MV-deltaV y con MV-P_{G954}. Se inoculó una única dosis de 10⁵ DICT50 de cada virus por vía intraperitoneal en cuatro grupos de seis ratones. Se recogieron sueros 2 meses después de la inoculación y los anticuerpos anti-MV se cuantificaron mediante ELISA (Trinity Biotech) (Figura 6).

En estos ratones incompetentes para el IFN tipo I, los niveles de anticuerpos inducidos por los vectores de sarampión modificados fueron comparables a los inducidos por los vectores no modificados. Este resultado no es sorprendente para los vectores MV-deltaV y MV-P_{G954}, que tienen cinéticas de crecimiento *in vitro* similares al MV no modificado. Sorprendentemente, el vector MV-deltaC, que tiene un crecimiento reducido *in vitro*, indujo títulos de anticuerpos apenas menores que los inducidos por el MV no modificado. Este resultado indica que la dosis inoculada fue demasiado alta para observar una diferencia o que la replicación vírica mínima fue suficiente para inducir la saturación de la respuesta humoral. Anteriormente se demostró en monos que la propagación del MV-deltaC obtenido de una cepa patógena del MV (Ichinose) se redujo enormemente en comparación con el tipo silvestre (Takeuchi, K. *et al.*, J. Virol., junio de 2005, 7838-7844). Estos datos preliminares indican que en ausencia de respuesta de IFN tipo I, el silenciamiento de la proteína C no afecta el establecimiento de la respuesta humoral antivírica.

Ejemplo 2

Inducción de muerte celular por MV sin modificar o MV-deltaC

Cultivo celular. Se establecieron y caracterizaron líneas celulares de mesotelioma epitelioide (Meso11, Meso13 y Meso56) y las líneas celulares de adenocarcinoma de pulmón (A549 y ADK117) (Gueugnon F *et al.*, Am J Pathol, 2011, 178: 1033-1042) a partir de derrame pleural recogido por toracocentesis de pacientes con cáncer, con consentimiento informado. Las líneas celulares de melanoma (M17 y M18) fueron sintetizadas por B. Dreno y N. Labarrière (Centro de Investigación del Cáncer, Nantes, Francia). La línea celular de adenocarcinoma de pulmón (A549) se adquirió en la ATCC. Las líneas celulares de mesotelioma epitelioide (Meso11, Meso13 y Meso56) y la línea celular de adenocarcinoma de pulmón (ADK117) fueron aisladas y caracterizadas por F. Tangy (Instituto Pasteur, Francia). Todas las líneas celulares se mantuvieron en medio RPMI-1640 (Gibco-Invitrogen, Cergy-Pontoise, Francia) complementado con suero de ternera fetal inactivado por calor (PAA Laboratories, Les Mureaux, Francia) al 10 % (v/v), Les Mureaux, Francia), L-glutamina 2 mM, penicilina 100 U/ml y de estreptomycin 100 μ g/ml (todos de Gibco). Las células se cultivaron a 37 °C en una atmósfera humidificada, con CO₂ al 5 % y se comprobaron de forma rutinaria en cuanto a la contaminación por *Mycoplasma* mediante PCR.

Análisis de muerte celular. La muerte celular se determinó 3 días después de la infección utilizando el kit de detección de apoptosis (BD Biosciences). En resumen, las células se sometieron a doble tinción con FITC-Anexina V y yoduro de propidio durante 15 minutos y se analizaron por citometría de flujo al cabo de 1 hora. Después se determinaron las muertes celulares específicas por MV y deltaC. Las células se incubaron con los anticuerpos específicos descritos en los siguientes ejemplos, para tinción extracelular. Después, las células se lavaron 3 veces con PBS antes del análisis por citometría de flujo (FACSCalibur, BD Biosciences).

Para comparar las capacidades de infección y de inducción de muerte celular con MV y MV-deltaC, se infectó un panel grande de tres líneas celulares de mesotelioma epitelioide (Meso11, Meso13 y Meso56), dos líneas celulares de melanoma (M17 y M18) y dos líneas celulares de adenocarcinoma de pulmón (A549 y ADK117) con MV no modificado o MV-deltaC, a una multiplicidad de infección (MOI) de 1,0 durante 2 horas, incubación a 37 °C. Las líneas celulares de control no se infectaron con MV o MV-deltaC (Figura 7). Las células tumorales se analizaron por citometría de flujo después de la doble tinción con FITC-Anexina V y yoduro de propidio tres días después de la infección.

Las células de mesotelioma epitelioide Meso11 y Meso13, las células de melanoma M18 o las células de adenocarcinoma de pulmón A549 se infectaron de forma eficaz por MV no modificado, mientras que las células de

mesotelioma epitelioide Meso56 y las células de adenocarcinoma de pulmón ADK117 se infectaron de forma débil por MV no modificado, y las células de melanoma M17 no estaban infectadas. Incluso si se observaba un porcentaje moderado o importante de células con Anexina V en las células infectadas de forma eficaz con MV no modificado (células de mesotelioma epitelioide Meso11 y Meso13, células de melanoma M18 y células de adenocarcinoma de pulmón A549), se encontró que MV-deltaC era capaz de inducir de forma incluso más eficaz la muerte de estas células tumorales. Aunque las células tumorales infectadas débilmente por MV no modificado (células de mesotelioma epitelioide Meso56 y células de adenocarcinoma de pulmón ADK117) o incluso las no infectadas (células de melanoma M17) mostraron un porcentaje muy bajo de células con Anexina V, los inventores han descubierto sorprendentemente que la infección con MV-deltaC indujo una inducción de muerte celular mucho mayor para estas dos líneas celulares (Figura 7A).

Por lo tanto, de acuerdo con estos resultados *in vitro*, MV-deltaC indujo una mayor apoptosis en células tumorales infectadas que el MV no modificado.

Ejemplo 3

Activación de la caspasa 3 después de la infección por MV o MV-deltaC

Se analizó la activación de la caspasa 3 tanto en células tumorales infectadas con MV no modificado como con MV-deltaC (Figura 7B). Se infectó un panel de dos líneas celulares de mesotelioma epitelioide (Meso13 y Meso56), una línea celular de melanoma (M17) y una línea celular de adenocarcinoma de pulmón (A549) con MV no modificado o MV-deltaC, a una MOI de 1,0 durante 2 horas, incubación a 37 °C. Las líneas celulares de control no se infectaron con MV o MV-deltaC. Las células tumorales infectadas con virus (MV o MV-deltaC) y no infectadas se analizaron mediante citometría de flujo después de la tinción con un anticuerpo anti caspasa 3 activa (BD Biosciences) tres días después de la infección.

La infección con MV-deltaC indujo la activación de la caspasa 3 para las dos líneas celulares probadas distintas: el 38,2 % para las células de mesotelioma epitelioide Meso13, el 30,2 % para las células de melanoma M17, el 21,8 % para las células de adenocarcinoma de pulmón A549 y el 8,4 % para células de mesotelioma epitelioide Meso56. Por el contrario, esta activación de la caspasa 3 no fue observada o se lo hizo parcialmente después de la infección con MV no modificado. Estos resultados sugirieron que los virus MV no modificado y MV-deltaC podrían inducir la muerte de las células tumorales de acuerdo con dos rutas distintas.

Ejemplo 4

Exposición de la proteína Hsp70 en la superficie celular después de la infección por MV o MV-deltaC

La infección de células tumorales con virus oncolíticos puede provocar un estrés celular (Fabian *et al.*, J Virol, 2007, 81(6): 2817-2830). La infección, pero también la muerte celular inducida por estos virus, también conduce a la producción y liberación en el entorno de moléculas con propiedades inmunogénicas (Wang *et al.*, Viral Immunol, 2006, 19(1): 3-9). Estas señales de peligro endógenas emitidas por células infectadas pueden, de hecho, ser reconocidas por las células de defensa y desencadenar respuestas adaptativas. Las células dendríticas plasmocitoides y derivadas de monocitos reconocen estas señales de peligro gracias a la expresión de distintos receptores. Por lo tanto, el sistema inmunitario puede trabajar en sinergia con la actividad oncolítica directa de los virus, activando una respuesta linfática específica de antígenos tumorales.

La infección de células tumorales con la cepa vacunal del virus oncolítico MV permite la maduración de DC y la activación de linfocitos T autólogos (documento WO2009/047331). Para caracterizar el mecanismo mediante el cual las células infectadas indujeron la activación del sistema inmunitario, los inventores han estudiado la expresión, la modificación y/o la liberación de distintos factores celulares conocidos por su implicación en la inmunogenicidad de la muerte celular. Por ejemplo, Las proteínas de la familia HSP70 o la calreticulina pueden estar implicadas en la activación de la respuesta inmunitaria antitumoral.

Se analizó la expresión de la proteína Hsp70 en la superficie de células tumorales infectadas con MV no modificado y MV-deltaC (Figura 8). Se infectó un panel de dos líneas celulares de mesotelioma epitelioide (Meso13 y Meso56), una línea celular de melanoma (M17) y una línea celular de adenocarcinoma de pulmón (A549) con MV no modificado o MV-deltaC, a una MOI de 1,0 durante 2 horas, incubación a 37 °C. Las líneas celulares de control no se infectaron con MV o MV-deltaC. La expresión de la proteína Hsp70 de membrana se determinó dos días después de la infección de las células de mesotelioma epitelioide Meso13 y Meso56, o tres días después de la infección de las células de adenocarcinoma de pulmón A549 y de melanoma M17, por tinción extracelular y citometría de flujo. Se observó una translocación muy pequeña de la proteína Hsp70 en la superficie celular, tanto para las células infectadas de forma eficaz por MV no modificado (células de mesotelioma epitelioide Meso13 y células de adenocarcinoma de pulmón A549) como para las células resistentes a MV (células de mesotelioma epitelioide Meso56 y células de melanoma M17). Por el contrario, Sorprendentemente, para todas las líneas celulares MV-deltaC induce una fuerte exposición de la proteína Hsp70 en la capa externa de la membrana plasmática. Estos resultados sugirieron que la muerte celular inducida por MV-deltaC mostró características inmunogénicas.

Ejemplo 5

Translocación en la membrana de la calreticulina después de la infección por MV o MV-deltaC

5 Se estudió el impacto de la infección de células tumorales con MV no modificado y MV-deltaC sobre la translocación de calreticulina en la superficie celular. Para ello, se analizó mediante tinción extracelular la presencia de calreticulina en la superficie de células tumorales infectadas (Figura 9). Se infectó un panel de dos líneas celulares de mesotelioma epitelioides (Meso13 y Meso56), una línea celular de melanoma (M17) y una línea celular de adenocarcinoma de pulmón (A549) con MV no modificado o MV-deltaC, a una MOI de 1,0 durante 2 horas, incubación a 37 °C. Las líneas celulares de control no se infectaron con MV o MV-deltaC. Las células tumorales no infectadas e infectadas (MV o MV-deltaC) se tiñeron con un anticuerpo anti calreticulina y un anticuerpo secundario anti ratón conjugado con Cy5, dos días después de la infección de células de mesotelioma epitelioides Meso13 y Meso56 o tres días después de la infección de células de adenocarcinoma de pulmón A549 y células de M17 melanoma. Después, las células se analizaron por citometría de flujo.

15 Al igual que para la proteína Hsp70, la infección con MV-deltaC conduce, sorprendentemente, a una translocación de calreticulina en la superficie celular más fuerte que el MV no modificado, tanto para las células infectadas de forma eficaz por MV no modificado (células de mesotelioma epitelioides Meso13 y células de adenocarcinoma de pulmón A549) como para las células resistentes a MV (células de mesotelioma epitelioides Meso56 y células de melanoma M17). Estos resultados también sugieren que la muerte celular inducida por MV-deltaC mostraba características inmunogénicas.

Ejemplo 6

25 Liberación de HMGB-1 en el entorno extracelular después de la infección por MV o MV-deltaC

Se estudió la liberación de la proteína HMGB-1 en el medio extracelular después de la infección de células tumorales con MV no modificado o MV-deltaC (Figura 10). Dos líneas celulares de mesotelioma epitelioides (Meso13 y Meso56) se infectaron con MV no modificado o MV-deltaC, a una MOI de 1,0 durante 2 horas, incubación a 37 °C. Las líneas celulares de control no se infectaron con MV o MV-deltaC. Los sobrenadantes de las células tumorales no infectadas o infectadas (MV o MV-deltaC) se recogieron un día, dos días o tres días después de la infección y se almacenaron a -20 °C. Después, se determinó la cantidad de HMGB-1 en estos sobrenadantes por ELISA.

35 MV-deltaC indujo la liberación eficaz de HMGB-1 por parte de las células tumorales infectadas. La infección con MV-deltaC indujo una apoptosis más rápida de las células tumorales en cultivo; como consecuencia, MV-deltaC indujo una liberación más temprana de HMGB-1 en comparación con MV no modificado, como demuestran los resultados de las células de mesotelioma epitelioides Meso13.

Ejemplo 7

40 Células dendríticas plasmocitoides

Cultivo celular

45 Las líneas celulares se cultivaron como se describe en el Ejemplo 2.

Infección por MV e irradiación con UV

50 La cepa de MV Schwarz atenuada viva y la proteína verde fluorescente potenciada con MV recombinante (MV-eGFP) se produjeron como se describió anteriormente (Gauvrit, A. *et al.*, Cancer Res., 2008, 68: 4882-4892). La infección por MV de las células tumorales se realizó durante 2 horas a 37 °C con una multiplicidad de infección (MOI) de 1, a menos que se indique otra cosa. Después, el inóculo vírico se reemplazó durante 72 horas por medio de células recién preparado. Para los experimentos de infección y maduración de pDC, MV no se lavó y se mantuvo en el medio durante todo el cultivo. La medición de la tasa de infección se realizó mediante citometría de flujo utilizando MV-eGFP, a las 24, 48 y 72 horas posinfección. Todos los demás experimentos se llevaron a cabo utilizando MV. Las células tumorales se irradiaron con UV-B (312 nm - 100 kJ/m², Stratalinker, Stratagene). El medio se renovó cada 72 horas.

60 Aislamiento y cultivo de DC

65 Las pDC se obtuvieron a partir de CMSP de donantes sanos (Etablissement Français du Sang, Nantes, Francia) como se describió anteriormente (Coulais, D. *et al.*, Cytotherapy, 2012, 14:887-896). En resumen, en primer lugar se enriquecieron las pDC mediante centrifugación a contracorriente y después se purificaron mediante selección negativa con perlas magnéticas, según lo recomendado por el protocolo del fabricante (Stemcell Technologies, Grenoble, Francia). La pureza de las pDC intactas siempre fue superior al 96 %. Las pDC (3x10⁵ por ml) se mantuvieron en cultivo con 20 ng/ml de IL-3hr (Sigma, Saint Quentin Fallavier, Francia) o se activaron *in vitro* con un

agonista de TLR-7, R848 (InvivoGen, San Diego, EE. UU.) (5 µg/ml). Las pDC también se cocultivaron con MV solo, con MV e IL-3 (MOI=1) o con células tumorales infectadas con MV o irradiadas con UV (pDC/célula tumoral: 1/1) sin IL-3hr ni agente de maduración. Después de 18 horas, se recogieron los sobrenadantes de cultivo y las pDC para su uso. Para el ensayo de inhibición de TLR-7, se utilizaron secuencias de ADN inmunorreguladoras, las cuales inhibieron específicamente la señalización a través de TLR-7 [IRS 661], en concentraciones que variaban de entre 0,1 µM a 1 µM (Eurofins, Múnich, Alemania). Como control, se usó CpG-A a 5 µg/ml para inducir una secreción de IFN-α dependiente de TLR-9 por parte de pDC (InvivoGen, San Diego, EE. UU.).

Inmunofluorescencia y citometría de flujo

Los fenotipos de las pDC se determinaron mediante inmunofluorescencia seguida de citometría de flujo. Las pDC se tiñeron con anticuerpos monoclonales específicos para CD40, CD86, HLA-DR (BD Biosciences, San Jose, CA, EE. UU.), CD83 (BioLegend, San Diego, CA-EE. UU.) y BDCA-4 (Miltenyi Biotec). Las pDC se seleccionaron como células BDCA-4+/HLA-DR+, para diferenciarlas de las células tumorales. La muerte celular del tumor se midió mediante tinción con TO-PRO®3 (Invitrogen, St Aubin, Francia), según lo recomendado por el fabricante. TO-PRO®3 es un ácido nucleico de monómero de carbocianina con fluorescencia en rojo lejano que entra solo en las células muertas y tiñe el ADN. La fluorescencia se analizó en FACSCantoll (Becton Dickinson, Nueva Jersey, EE. UU.) utilizando el programa informático FlowJo.

Ensayo de fagocitosis

Las células tumorales infectadas con MV e irradiadas con UV se tiñeron con PKH-67 de acuerdo con el protocolo del fabricante (Sigma, Saint Quentin Fallavier, Francia) y se cocultivaron con las pDC, durante 18 horas a 4 °C o 37 °C (1 DC:1 célula tumoral). Los cocultivos se lavaron con PBS-EDTA para disociar el conjugado celular. Las pDC se tiñeron con un anticuerpo anti HLA-DR conjugado con HorizonV450 (BD Biosciences, San Jose, CA, EE. UU.) y se analizaron por citometría de flujo (FACSCantoll, BD). La fagocitosis de las pDC se observó mediante microscopía confocal (Nikon). Las células tumorales infectadas con MV e irradiadas con UV se tiñeron con PKH-67 y después se cocultivaron con las pDC en placas de 24 pocillos que contenían portaobjetos de vidrio de poli-lisina, durante 18 horas (pDC:célula tumoral, relación 1:1). Las pDC se tiñeron con anti HLA-DR no acoplado (BD Bioscience). La tinción del HLA-DR se reveló con un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón acoplado a AlexaFluor 568.

Detección de citoquinas

La producción de IFN-α (MabTech, Cincinnati, OH-EE. UU.) se midió mediante ELISA en sobrenadantes de cultivo de pDC de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Ensayo de presentación cruzada

Se infectaron líneas celulares de melanoma NYESO-1^{pos}/HLA-A*0201^{neg} (M18) y de adenocarcinoma pulmonar NYESO-1^{neg}/HLA-A*0201^{neg} (A549) con MV o se irradiaron con UV-B, se cultivaron durante 72 horas y después se cocultivaron con las pDC HLA-A*0201^{pos} (relación pDC:células tumorales 1:1). Después de 18 horas, las pDC se cocultivaron con el clon de linfocitos T CD8⁺ específico de HLA-A*0201/NYESO-1(156-165), M117.167, durante 6 horas en presencia de Brefeldina A (Sigma, Saint Quentin Fallavier, Francia). El clon M117.167 se obtuvo clonando en una dilución limitante de linfocitos infiltrantes de tumores de un paciente con melanoma. El clon se cultivó como se describió anteriormente (Fonteneau, J. F. *et al.*, J Immunol Methods, 2001, 258: 111-126). Como control, los inventores utilizaron las pDC que se pulsaron durante 1 hora con péptido NYESO-1(156-165) 0,1 o 1 µM y se lavaron. Las células se fijaron después con PBS que contenía paraformaldehído al 4 %, durante 10 minutos a temperatura ambiente, y se permeabilizaron y se tiñeron con anticuerpos específicos para IFN-γ y CD8 (BD Biosciences, San Jose, CA, EE. UU.), como se ha descrito anteriormente (Schlender, J. *et al.*, J Virol., 2005, 79: 5507-5515). La producción de IFN-γ se analizó mediante citometría de flujo con una ventana de adquisición en células T CD8⁺.

RT-PCR en tiempo real

Un microgramo de ARN total se transcribió de forma inversa utilizando la transcriptasa inversa del virus de la leucemia murina Moloney (InvitroGen, Saint Aubin, Francia). Las reacciones de PCR se realizaron utilizando los cebadores QuantiTect (Qiagen, Foster City, EE. UU.) y la mezcla maestra de PCR RT² Real-Time SYBR-Green/ROX (Tebu-bio, Le Perray-en-Yvelines, Francia), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Estadística

Se usó el programa informático GraphPad Prism (Inc., San Diego, CA-EE. UU.) utilizando una prueba de comparación no paramétrica de Mann Whitney. Los valores de p <0,05 se consideraron estadísticamente significativos.

Ejemplo 8

Sensibilidad de las células tumorales y las pDC a la infección por MV

5 Durante la infección, el MV entra en las células principalmente a través de la CD46 y, en un menor grado, de CD150/SLAM (Anderson, B. D. *et al.*, *Cancer Res.*, 2004, 64: 4919-4926; Schneider, U. *et al.*, *J Virol.*, 2002, 76: 7460-7467). En un primer experimento, los inventores estudiaron la expresión de estos dos receptores principales de MV, CD46 y CD150/SLAM, en las líneas celulares de pDC, melanoma (M18), mesotelioma (Meso13) y adenocarcinoma pulmonar (A549) (Figura 11A). Se observó expresión de CD46 en todos los tipos de células, con una mayor expresión en las líneas celulares Meso13 y A549. Con respecto a la expresión de CD150/SLAM, se encontró una expresión positiva en la línea celular de melanoma M18. Estos resultados sugieren que todos estos tipos de células pueden ser sensibles a la infección por VM, dado que todos expresan CD46.

15 Después, los inventores estudiaron la sensibilidad a la infección por MV de estos cuatro tipos de células utilizando un MV recombinante que codifica la proteína verde fluorescente (MV-GFP). Setenta y dos horas después de la exposición a MV con una MOI=1, las tres líneas de células tumorales se infectaron productivamente con MV, variando desde del 50 % de células A549 positivas para GFP al 90 % de células Meso13 (Figura 11B). Adicionalmente, se observó la formación de sincicios para las tres líneas de células tumorales y las pDC no eran permisivas a una MOI=1. Sin una señal de supervivencia tal como la IL-3, las pDC murieron durante las 72 horas de cultivo. Por lo tanto, se realizaron experimentos donde se añadió IL-3 a las pDC expuestas al MV (Figura 11C). En presencia de IL-3, las pDC sobrevivieron durante las 72 horas, pero no se infectaron por MV de forma productiva. Para confirmar este resultado, se aumentó la MOI hasta 50 en presencia de IL-3, pero aun así los inventores fracasaron en detectar pDC infectadas (Figura 11D). Sin embargo, se observó un pequeño cambio de fluorescencia a una MOI=50, lo que probablemente se debió a la captación de GFP soluble durante el cultivo de 72 horas, lo que contaminó la preparación de MV-GFP. De forma similar, cuando los inventores utilizaron MV-GFP irradiado con UV, el cual no podía replicarse, continuaba observándose este ligero cambio de fluorescencia (Figura 12). Por último, cuando el MV-GFP se incubó con las pDC durante 2 horas a una MOI=50 y se lavó, los inventores fracasaron en detectar el pequeño cambio de fluorescencia 70 horas más tarde (Figura 12).

20 Después, los inventores midieron la muerte de las células tumorales 72 horas después de la infección y encontraron que casi la mitad de las células tumorales infectadas con MV eran TO-PRO+ después de 72 horas (Figura 11E). Se observó un nivel similar de muerte celular al irradiar las células tumorales con UV-B. Por lo tanto, la infección por MV induce la muerte de células tumorales en aproximadamente la mitad de las células tumorales 72 horas después de la infección.

Ejemplo 9

Las células tumorales infectadas con MV inducen la maduración de las pDC

40 A continuación, los inventores investigaron los efectos de MV solo y de las células infectadas con MV en la maduración de pDC (Figura 13). En estos experimentos, evaluaron cómo afecta a la maduración de la pDC la infección de las células tumorales por MV en comparación con la radiación con UV, otro inductor de la muerte de células tumorales. Como control para la maduración, las pDC fueron se expusieron al agonista de TLR7/8, R848 (Figuras 13A y 13B).

45 Se ha demostrado anteriormente que la línea de células tumorales de mesotelioma pleural maligno (MPM) infectada con MV, Meso13, inducía la maduración de DC obtenidas de monocitos, sin adyuvantes adicionales, mientras que el virus solo o las Meso13 irradiadas con UV no lo hicieron (Gauvrit, A. *et al.*, *Cancer Res.*, 2008, 68:4882-4892). Los inventores realizaron un conjunto de experimentos con las pDC para determinar los efectos de MV solo, de las células tumorales infectadas con MV o irradiadas con UV sobre el estado de maduración de la pDC. El efecto de las células tumorales infectadas con MV e irradiadas con UV se comparó en cuanto al estado de maduración de las pDC (Figura 13). Se observó maduración en las pDC cocultivadas con células tumorales infectadas con MV, mientras que las células tumorales irradiadas con UV no activaron a las pDC. De hecho, las células infectadas con MV indujeron la expresión del marcador de maduración CD83 a un nivel similar al observado cuando las pDC se expusieron a R848. Los inventores observaron una inducción de la expresión de las moléculas de coestimulación, CD40 y CD86, en las pDC expuestas a las células tumorales infectadas con MV, aunque esta inducción fue baja en comparación con los niveles desencadenados por R848 solo.

50 Se han informado dos estudios que describen resultados contradictorios sobre la capacidad de MV solo para desencadenar la maduración de la pDC (Duhén, T. *et al.*, *Virus Res.*, 2010, 152: 115-125; Schlender, J. *et al.*, *J Virol.*, 2005, 79: 5507-5515). Sin embargo, el estudio de Duhén *et al.*, que informa que el MV activa las pDC, se realizó en presencia de IL-3, un factor de supervivencia de pDC, mientras que el otro estudio de Schlender *et al.*, quienes observaron que en las pDC cultivadas con MV no se induce la maduración de pDC, se realizó sin IL-3. Por lo tanto, los inventores realizaron y compararon las dos condiciones y encontraron resultados similares a los descritos por estos dos autores. De hecho, el MV a MOI=1 indujo la maduración de pDC solo en presencia de IL-3 (Figura 13). Como se observó para R848 solo, el MV indujo la maduración de pDC en presencia de IL3,

caracterizada principalmente por un aumento significativo de la expresión de CD83 y, en un menor grado, de CD40 y CD86 expresión. Los inventores también observaron supervivencia y maduración de las pDC en ausencia de IL-3 solo cuando se expusieron a una alta cantidad de MV (MOI = 50). A una concentración de virus más baja, en ausencia de IL-3, las pDC murieron.

En el último conjunto de experimentos, los inventores analizaron si eran necesarias la infección y la replicación del VM en las pDC para inducir su activación. Las pDC se expusieron a MV irradiado con UV (MV*), el cual no se puede replicar, y se observó un nivel similar de maduración (expresiones de CD83, CD80 y CD86) y producción de IFN- α , como con MV sin irradiar (Figuras 14A y 14C). La presencia de un anticuerpo específico anti CD46 bloqueante en el cultivo de las pDC expuestas a IL-3 y a MV no afectó la maduración de las pDC (Figura 14A). El mismo experimento se realizó con las pDC expuestas a células tumorales infectadas con MV. La maduración y la producción de IFN- α seguían sin observarse cuando las células tumorales infectadas con MV se irradiaron con UV antes de la exposición a las pDC (Figuras 14B y 14C). Por último, los inventores analizaron si un anticuerpo monoclonal específico para CD46 podía inhibir la maduración de pDC en respuesta a células tumorales infectadas con MV (Figuras 14B y 14C). No se observó inhibición, mientras que el anticuerpo anti CD46 inhibió completamente la infección de Meso13 como control (Figura 14D). En conjunto, estos resultados sugieren que la infección y la replicación de MV en las pDC no son necesarias para la activación de pDC en respuesta al MV.

Ejemplo 10

La pDC captura componentes celulares procedentes de células tumorales infectadas con MV

Debido a la expresión endo/lisosómica de TLR-7 y TLR-9, las pDC están especializadas en la detección de ácido nucleico vírico (Gilliet, M. *et al.*, Nat Rev Immunol., 2008, 8: 594-606). Estos dos receptores son los principales receptores innatos que activan las pDC (Reizis, B. *et al.*, Nat Rev Immunol., 2011, 11: 558-565). Dado que el MV, en presencia de IL-3 o de células tumorales infectadas con MV, tienen la capacidad de inducir la maduración de pDC, es probable que el estímulo de maduración sea ARNmc de MV, el cual activa el TLR7 en el compartimento endo/lisosómico. Esta hipótesis se ve reforzada por el hecho de que MV solo no induce la maduración de DC, dado que en el ser humano estas células no expresan TLR7. Esto implica que las pDC endocitan algunas partículas de MV cuando se cultivan con MV e IL-3, o con células cancerosas infectadas con MV. Después, los inventores luego investigaron si las pDC absorbían de forma eficaz material celular procedente de células tumorales infectadas con MV e irradiadas con UV (Figura 15). Las células tumorales M18 y A549 infectadas con MV e irradiadas con UV se marcaron con PKH67 y se cocultivaron con las pDC. Los inventores observaron que las pDC absorbían de forma eficaz a las células tumorales infectadas con MV a 37 °C, mientras que absorbieron a las células tumorales irradiadas con UV de forma menos eficaz (Figuras 15A y 15B). En dos experimentos adicionales, los inventores observaron que la presencia del anticuerpo monoclonal para CD46 en el cultivo no inhibió la fagocitosis de las células tumorales infectadas con MV.

Estos resultados se confirmaron por microscopía confocal (Figura 15C). Las pDC se cocultivaron durante 18 horas células tumorales infectadas con MV marcadas con PKH-67. Los cortes ópticos mostraron fragmentos fluorescentes de células tumorales infectadas con MV dentro de las pDC, confirmando la internalización de partes de células tumorales infectadas con MV por las pDC. Curiosamente, los inventores nunca observaron la formación de sincicios entre las pDC y las células tumorales. En conjunto, estos resultados sugieren que algunas partículas de MV contenidas en las células tumorales infectadas podrían acceder a los compartimentos donde se encuentra el TLR7.

Ejemplo 11

Las células tumorales infectadas con MV inducen una fuerte secreción de IFN tipo I al desencadenar TLR7

Se sabe que las pDC son las productoras más fuertes de IFN tipo I, especialmente contra un virus, tras la activación de TLR-7 o TLR-9 (Gilliet, M. *et al.*, Nat Rev Immunol. 2008, 8:594-606). Por lo tanto, los inventores midieron la producción de IFN- α por parte de las pDC después de la exposición a MV, a células tumorales infectadas por MV o irradiadas con UV, mediante ELISA (Figura 16A). La exposición directa a MV indujo la secreción de IFN- α por las pDC solamente en presencia de IL-3, coincidiendo con la maduración celular observada anteriormente en la Figura 13. La cantidad de IFN- α producida en respuesta a MV en presencia de IL-3 fue comparable con la cantidad inducida por R848 solo, un potente agonista de TLR7/8. Notablemente, los inventores encontraron altas cantidades de IFN- α en los sobrenadantes de cocultivos después de la exposición de las pDC a células tumorales infectadas con MV (20-40 veces más que lo que se observó en respuesta a MV en presencia de IL-3 o R848 solo). Estas altas cantidades de IFN- α fueron producidas por las pDC, dado que las células tumorales no produjeron IFN- α o lo hacen en una cantidad muy baja (en el intervalo de pg/ml) después de la infección por VM. Las células tumorales A549 o M18 irradiadas con UV no indujeron la producción de IFN- α por parte de las pDC. Estos resultados demuestran que las células tumorales infectadas con MV pueden desencadenar la producción de altos niveles de IFN- α por parte de las pDC, considerablemente más altos que los niveles producidos por las pDC expuestas al MV en presencia de IL-3 o R848 solo.

Los inventores han demostrado anteriormente que, tres días después de la infección de la línea de células tumorales Meso13, se produjo una gran cantidad de virus, alcanzando 1×10^8 DICT₅₀/ml, que corresponde a una MOI mayor a 100 a partir de una dosis inicial de virus de 1×10^6 DICT₅₀/ml, que corresponde a una MOI=1 (Gauvrit, A. *et al.*, Cancer Res., 2008, 68: 4882-4892). Por lo tanto, era probable que la gran cantidad de IFN- α producida por las pDC en respuesta a las células tumorales infectadas con MV fuera el resultado de la intensa replicación de MV en estas células tumorales. Para analizar esta hipótesis, Las pDC se cultivaron en presencia de MOI crecientes que oscilaban entre 1 y 50, con o sin IL-3 (Figura 16B). En presencia de IL-3, los inventores observaron que la producción de IFN- α por parte de las pDC aumentaba con la MOI. Por el contrario, las pDC no produjeron IFN- α en ausencia de IL-3, a excepción de la MOI más alta (MOI=50). Estos resultados sugieren que el nivel de producción de IFN- α por parte de las pDC depende de la cantidad de MV y de la presencia de IL-3 o de otras señales de supervivencia, lo que explica la gran cantidad de IFN- α producida en respuesta al alto título de virus después de la infección de células tumorales.

Dado que el MV y las células tumorales infectadas con MV contienen ARNmc vírico, es probable que la producción de IFN- α por parte de las pDC se deba principalmente al desencadenamiento de TLR-7. Por lo tanto, se llevó a cabo una inhibición de TLR7. Se utilizaron secuencias de ADN inmunorreguladoras específicas (IRS, forma siglada de *immunoregulatory sequences*), que inhiben la expresión de IFN- α mediada por TLR-7 (IRS661) Barrat, F. J. *et al.*, J. Exp. Med., 2005, 202: 1131-1139). Los inventores demostraron que la producción de IFN- α por parte de las pDC cultivadas en presencia de MV e IL-3 se inhibió cuando se añadió el IRS661 (Figura 16C). Además, se observó una inhibición similar de IFN- α cuando se añadió IRS661 a las pDC expuestas a células tumorales infectadas con MV. Como control, se demostró que IRS661 no inhibía la producción de IFN- α inducida por CpG-A por parte de las pDC, que es dependiente de TLR9. En conjunto, estos resultados demuestran que la producción de IFN- α inducida por MV o por células infectadas con MV es dependiente de TLR7.

Ejemplo 12

Las pDC tienen la capacidad de presentar de forma cruzada un antígeno asociado al tumor de células tumorales infectadas con MV

Se ha informado la capacidad de las pDC humanas de presentar de forma cruzada antígenos víricos (Di Pucchio, T. *et al.*, Nat Immunol., 2008, 9: 551-557; Hoeffel, G. *et al.* Immunity, 2007, 27:481-492; Lui, G. *et al.*, PLoS One, 2009, 4: e7111), pero aún no se ha descrito la presentación cruzada de antígenos asociados a tumores (los TAA, forma sigla de *tumour-associated antigens*). Los inventores se preguntaron si las pDC humanas expuestas a células tumorales infectadas con MV podrían tener la capacidad de presentar de forma cruzada un TAA humano expresado espontáneamente por células tumorales. Demostraron mediante RT-PCR que la línea celular de melanoma M18 HLA-A*0201^{neg} expresaba el antígeno cáncer testicular, NYESO-1, mientras que la línea celular de adenocarcinoma de pulmón A549 no lo hizo (Figura 17A).

Para determinar si las pDC HLA-A*0201^{pos} tenían la capacidad de presentar de forma cruzada este TAA después de la exposición a una línea celular tumoral M18 HLA-A*0201^{neg}/NYESO-1^{pos} infectada con MV o irradiada con UV, se utilizó el clon de linfocitos T CD8⁺, M117.167, que es específico para los complejos HLA-A*0201/NYESO-1(157-165) (Figuras 17B-D). En la Figura 18 se muestra un esquema de este experimento. El clon de linfocitos T M1 17.167 no produjo IFN- γ , solo o en presencia de las pDC de IL-3, pero se activó en presencia de las pDC pulsadas con péptidos NYESO-1 [157-161] (Figura 17B). El clon se activó tan pronto como el péptido a 0,1 μ M se cargó en las pDC (16,3 % de células IFN- γ +) y se activó más intensamente mediante las pDC pulsadas con péptido a 1 μ M (77,5 %). En presencia de las pDC cultivadas con células tumorales M18 infectadas con MV, se activó el 11,5 % de la población del clon, mientras que el clon no produjo IFN- γ en respuesta a las pDC cultivadas con células tumorales M18 irradiadas con UV (Figura 17B). En respuesta a las pDC cocultivadas con M18 infectadas con MV, el clon tenía un perfil de producción de IFN- γ comparable con el observado en respuesta a las pDC pulsadas con péptido NYESO-1(157-165) a 0,1 μ M.

Como control, los inventores fracasaron en detectar la activación del clon de linfocitos T M1 17.167 en respuesta a células tumorales M18 infectadas con MV o irradiadas con UV solo (Figura 17C). Este resultado era de esperar, dado que la línea celular tumoral M18 era HLA-A*0201^{neg}, por lo tanto, no tenía la capacidad de presentar directamente al clon el péptido NYESO-1(157-165). Esto demuestra que la producción de IFN- γ por parte del clon en respuesta a las pDC HLA-A*0201^{pos} cocultivadas con células tumorales M18 infectadas con MV se debe a la presentación cruzada. Los inventores tampoco observaron producción de IFN- γ en respuesta a las pDC cocultivadas con células tumorales A549 NYESO-1^{neg} infectadas con MV. En este experimento representativo, el clon produjo IFN- γ en respuesta a las pDC cocultivadas con M18 infectadas con MV (6,5 % de células IFN- γ), una tasa de producción cercana a la observada en respuesta a las pDC pulsadas con péptido NYESO-1(157-165) 0,1 μ M (10,8 % de células IFN- γ).

En conjunto, estos resultados demuestran que las pDC tienen la capacidad de presentar de forma cruzada un antígeno tumoral tal como NYESO-1 procedente de células tumorales infectadas con MV, pero no el procedente de las irradiadas con UV. Por lo tanto, La viroterapia antitumoral basada en VM debería poder emplear las pDC en la respuesta inmunitaria antitumoral activando su capacidad para producir altas cantidades de IFN- α y para presentar de forma cruzada el TAA de las células tumorales infectadas por MV a linfocitos T CD8⁺ específicos del tumor.

Los inventores caracterizaron, *in vitro*, las consecuencias de la viroterapia antitumoral basada en MV sobre las funciones de las pDC humanas. En primer lugar, demostraron que las pDC no eran sensibles a la infección por MV a pesar de la expresión de CD46. Sin embargo, las pDC fueron capaces de detectar el virus produciendo IFN- α en respuesta a una gran cantidad de virus en ausencia de una señal de supervivencia, y a una baja cantidad de virus cuando se añadió una señal de supervivencia al cultivo, tal como IL-3. En segundo lugar, cuando las pDC se cocultivaron con células tumorales infectadas con MV, las pDC experimentaron una maduración caracterizada por la inducción de la expresión de CD83 y una fuerte producción de IFN- α , con una expresión ligeramente aumentada de moléculas coestimuladoras. Por el contrario, las pDC cocultivadas con células tumorales irradiadas con UV conservaron un fenotipo inmaduro similar al observado cuando se cocultivaron solo con IL-3. Después, los inventores identificaron el TLR7 como el receptor de las pDC responsable de su activación, probablemente debido a la presencia de ARN vírico monocatenario en el compartimento endocítico de las pDC después de la internalización de fragmentos de células tumorales infectadas con MV. Por último, usando un clon de linfocitos T CD8+ específico de HLA-A*0201/NYESO-1(157-165), los inventores demostraron que las pDC HLA-A*0201+ tenían la capacidad de presentar de forma cruzada este antígeno asociado a tumor (TAA) procedente de las células tumorales NYESO-1+ HLA-A*0201^{neg} infectadas con MV, pero no el procedente de las irradiadas con UV. Por primera vez, los inventores demostraron la capacidad de las pDC humanas para presentar de forma cruzada un TAA de células tumorales muertas a linfocitos T CD8+. En conjunto, estos resultados sugirieron que la viroterapia antitumoral basada en MV, además de su lisis directa de células tumorales infectadas, tuvieron la capacidad de reclutar pDC en la respuesta inmunitaria antitumoral, para activar su capacidad de producir altos niveles de IFN tipo I y presentar de forma cruzada TAA.

En primer lugar, los inventores demostraron que las pDC humanas expuestas *in vitro* a MV a una MOI=1 no experimentaron maduración sin IL-3. En esta condición, sin señal de supervivencia, las pDC experimentaron apoptosis y fracasaron en adquirir MV en el compartimento endosómico para participar en un proceso de maduración mediante el ligamiento de ARNmc vírico en TLR7. Cuando las pDC se expusieron a MV en presencia de IL-3, estas sobrevivieron y se observó maduración (baja producción de IFN- α e inducción de la expresión de CD83). Los inventores observaron la activación de las pDC mediante MV en ausencia de IL-3, solo cuando utilizaban una cantidad alta de MV (MOI=50). A esta alta concentración de MV, los inventores pensaron que alcanzó el compartimento endocítico de las pDC suficiente MV como para proporcionar una señal de supervivencia/maduración, antes de que se activara su programa de apoptosis. Por lo tanto, cuando las pDC se expusieron a MV en presencia de IL-3, las pDC sobrevivieron y el MV se internalizó y permitió el desencadenamiento de TLR7 por el ARNmc vírico. Cuando las pDC se expusieron a MV en ausencia de IL-3, experimentaban apoptosis a menos que alcanzara el compartimento endocítico suficiente MV como para activarlas y madurarlas. Estos resultados explicaron los informes contradictorios en la bibliografía, debido a las diferencias en las condiciones experimentales. De hecho, los inventores obtuvieron resultados similares a Schlender *et al.*, quienes informaron que una cantidad baja de MV Schwarz no logró inducir IFN- α por parte de las pDC cultivadas en ausencia de IL-3 (Schlender, J. *et al.*, *J Virol.*, 2005, 79:5507-5515), y a Duhon *et al.*, quienes afirmaron que MV Schwarz inducía grandes cantidades de producción de IFN- α por parte de las pDC en presencia de IL-3 (Duhon *et al.*, *Virus Res.*, 2010, 152:115-125). Sin embargo, los inventores no observaron que MV Schwarz inhibiera la producción de IFN- α por parte de las pDC (31), dado que las pDC producían IFN- α en presencia de IL-3. Por último, ambos grupos describieron la tinción de las pDC por un anticuerpo monoclonal para la hemaglutinina (H) de MV, pero interpretaron el resultado de manera distinta. Un argumento afirmó que las pDC se infectaron y amplificaron el virus (Schlender, J. *et al.*, *J Virol.*, 2005, 79:5507-5515), mientras que el otro grupo concluyó que, a pesar de la tinción de la proteína H en las pDC, la replicación del VM fue baja (Duhon *et al.*, *Virus Res.*, 2010, 152:115-125). Los resultados presentados en el presente documento apoyan esta última conclusión, dado que los inventores no observaron una infección productiva utilizando MV-eGFP, incluso a una MOI alta, en ausencia o presencia de IL-3.

Los inventores también demostraron que, en presencia de MV o de células tumorales infectadas con MV, las pDC experimentaron una maduración caracterizada por la regulación al alza de la expresión de la molécula CD83 en la superficie celular. En presencia de MV o de células tumorales infectadas con MV, las pDC produjeron mayores cantidades de IFN- α en respuesta a una carga vírica alta que las pDC estimuladas solo con R848. Sin embargo, estas células no expresaron tantas moléculas coestimuladoras CD40 y CD86. Por lo tanto, este fenotipo de maduración se asemejaba al fenotipo de maduración inducido por la infección con VIH (Fonteneau, J.F. *et al.*, *J Virol.*, 2004, 78:5223-5232; O'Brien, M. *et al.*, *J Clin Invest.*, 2011, 121:1088-1101), que activa a las pCD mediante el TLR7, como hizo el MV (Beignon, A.S. *et al.*, *J Clin Invest.*, 2005, 115:3265-3275). De hecho, ahora estaba claro que, dependiendo de la naturaleza del agonista del TLR utilizado, podrían desencadenarse dos rutas de activación principales en las pDC humanas. Esta dicotomía fue informada primero por Kerkmann *et al.*, quien mostró que dos agonistas del TLR9, CpG-A y CpG-B, activaba la maduración de pDC utilizando dos rutas distintas (Kerkmann, M. *et al.*, *J Immunol.* 2003, 170:4465-4474). Más recientemente, la misma dicotomía se observó para los agonistas de TLR7 (O'Brien, M. *et al.*, *J Clin Invest.*, 2011, 121:1088-1101). De hecho, el VIH se comportó como CpG-A al desencadenar el TLR7 y la ruta de señalización de IRF7 en el endosoma temprano de las pDC, y al inducir una fuerte producción de IFN- α . Los inventores demostraron que la maduración inducida por MV+IL-3 o las células infectadas por MV fue similar a la activación inducida por el VIH, lo que sugiere un desencadenamiento endosómico temprano del TLR7 mediante ARNmc del MV. Esta ruta temprana de activación endosómica era compatible con la presentación cruzada de antígenos expresados por células infectadas por virus, dado que se ha demostrado la presentación cruzada de antígenos víricos de células infectadas (Hoeffel, G. *et al.*, *Immunity*, 2007, 27:481-492) y la

presentación cruzada de TAA de células infectadas con MV, como se describe en el presente documento. Por el contrario, Schnurr *et al.* informaron que, *in vitro*, las pDC, al contrario de las CD mieloides, no tenían la capacidad de presentar de forma cruzada un TAA de una proteína de longitud completa sola o como una forma de complejo inmunitario (Schnurr, M. *et al.*, Blood, 2005, 105:2465-2472). Sin embargo, estos autores utilizaron una proteína soluble y no utilizaron células tumorales que expresan NYESO-1 como fuente de antígeno. *In vivo*, la presentación cruzada de antígenos por las pDC también fue controvertida. Salio *et al.* informaron que pDC murinas estimuladas por CpG no tenían la capacidad de presentar antígenos de forma cruzada, mientras que podían montar una respuesta de linfocitos T contra antígenos endógenos (Salio, M. *et al.*, J. Exp. Med., 2004, 199:567-579). Mouries *et al.* demostraron, *in vivo* e *in vitro*, también en un modelo murino, que la proteína OVA soluble y los agonistas del TLR (CpG o R848) activaron a las pDC para sensibilizar de forma cruzada OVA en linfocitos T CD8+ específicos (Mouries, J. *et al.*, Blood, 2008, 112:3713-3722). De forma similar, Kool *et al.* (Kool *et al.*, J Leukoc Biol., 2011, 90:1177-1190) confirmaron recientemente *in vitro* la presentación y presentación cruzada del péptido OVA soluble o de la proteína completa, después de la estimulación del TLR9 por CpG o por una infección con el virus de la gripe que contenía epítomos de OVA. Por último, Liu *et al.* informaron que la inyección intratumoral de pDC estimuladas con CpG-A en ratones portadores de melanoma B16 indujo una sensibilización cruzada de antígeno tumoral, pero esta sensibilización cruzada se realizó mediante DC CD11c+, no mediante las pDC (Liu *et al.*, J Clin Invest., 2008, 118:1165-1175). Los inventores han demostrado que, *in vitro*, las pDC humanas expuestas a células tumorales infectadas con MV tuvieron la capacidad de presentar de forma cruzada NYESO-1 a un clon de linfocitos T CD8+ específico para este TAA. Los inventores demostraron que las células tumorales infectadas con MV experimentaron muerte celular y después fueron fagocitadas por las pDC. Estas células infectadas con MV tuvieron la capacidad de activar las pDC sin la adición de adyuvantes o de agonistas del TLR. La eficacia de la viroterapia antitumoral basada en MV se ha demostrado *in vivo* en distintos modelos de xenoinjertos de tumores humanos en ratones inmunodeficientes (Peng, K. W. *et al.*, Cancer Res., 2002, 62:4656-4662; McDonald, C.J. *et al.*, Breast Cancer Res Treat., 2006, 99:177-184; Blechacz, B. *et al.*, Hepatology, 2006, 44:1465-1477). Los primeros ensayos clínicos de viroterapia basada en VM han mostrado resultados alentadores (Heinzerling, L. *et al.*, Blood, 2005, 106:2287-2294; Galanis, E. *et al.*, Cancer Res., 2010, 70:875-882). La eficacia de la viroterapia basada en MV se debe probablemente a la lisis de las células tumorales por el virus. Sin embargo, una parte de su eficacia también puede deberse a la capacidad de las células tumorales infectadas con MV para activar las células del sistema inmunitario, en particular las pDC. De hecho, se ha demostrado que la activación de las pDC por un agonista del TLR en ratones portadores de tumores induce una respuesta inmunitaria antitumoral y la remisión tumoral (Drobits, B; *et al.*, J Clin Invest., 2012, 122:575-585; Liu, C. *et al.*, J Clin Invest., 2008, 118:1165-1175; Palamara, F. *et al.*, J Immunol., 2004, 173:3051-3061). Liu *et al.* demostraron que las pDC murinas estimuladas por un agonista del TLR9 inducían la activación y el reclutamiento de linfocitos NK en el tumor, lo que desencadenó la presentación cruzada de antígeno tumoral por las DC CD11c+ (Liu, C. *et al.*, J Clin Invest., 2008, 118:1165-1175). Drobits *et al.* de mostraron que el tratamiento tópico de tumores de melanoma en ratones con el agonista del TLR7, imiquimod, inducía la activación y el reclutamiento de las pDC en el tumor y provocaba la remisión tumoral (Drobits, B; *et al.*, J Clin Invest., 2012, 122:575-585). Drobits *et al.* demostraron que las pDC adquirirían una actividad citotóxica contra células tumorales al secretar TRAIL y granzima B, en un mecanismo dependiente de IFNAR1. La secreción de IFN- α por parte de las pDC no solo indujo una actividad citotóxica antitumoral en las pDC mediante un bucle autocrino, sino que también podía actuar directamente sobre las células tumorales para inducir apoptosis (Thyrell, L. *et al.*, Oncogene, 2002, 21:1251-1262). El IFN tipo I también desempeñó un papel en la activación de NK y fue necesario en un modelo de ratón de rechazo de tumores dependiente de linfocitos NK (Swann, J.B. *et al.*, J Immunol., 2007, 178:7540-7549). Por último, estos linfocitos NK probablemente también participaron en el inicio de la respuesta antitumoral mediante la estimulación de las DC mieloides, dado que en ratones deficientes en IFNAR1 y STAT1, la respuesta antitumoral de los linfocitos T fracasó en desarrollarse (Diamond, M.S. *et al.*, J. Exp. Med., 2011, 208:1989-2003; Fuertes, M.B. *et al.*, J. Exp. Med., 2011, 208:2005-2016). Por lo tanto, los inventores demostraron que las células tumorales infectadas con MV inducían una alta cantidad de IFN- α por las pDC, lo que podría ser favorable para el desarrollo de subconjuntos multicelulares implicados en una respuesta inmunitaria antitumoral. Adicionalmente, se usan en ensayos clínicos de viroterapia antitumoral otros virus oncolíticos que se sabe que activan a las pDC, tales como el virus de la variolovacuna (Kim, J. H. *et al.*, Mol Ther., 2006, 14:361-370), Virus del Herpes Simple (Kaufman, H.L. *et al.*, Future Oncol., 2010, 6:941-949) y adenovirus (Ramesh, N. *et al.*, Clin Cancer Res., 2006, 12:305-313). Las células tumorales infectadas por estos virus también pueden inducir la producción de IFN- α y la presentación cruzada de antígenos tumorales por las pDC.

La viroterapia antitumoral basada en MV es un enfoque prometedor para tratar el cáncer a través de la actividad oncolítica del virus. Adicionalmente, los inventores demostraron que las células tumorales infectadas con MV activaron la maduración y las capacidades de presentación cruzada de antígeno tumoral de las pDC humanas. Por lo tanto, la viroterapia antitumoral basada en VM puede representar un enfoque interesante para el reclutamiento de las pDC en la respuesta inmunitaria antitumoral.

Ejemplo 13

Estudios comparativos entre el MV no modificado y MV-deltaC utilizando distintas líneas celulares de melanoma

Materiales y métodos

Cultivo celular. Las líneas celulares tumorales analizadas fueron líneas celulares obtenidas de melanoma: M6, M17, M117, M88 y M113. Las células se cultivaron en medio RPMI 1640 complementado con suero fetal de ternera (SFT) al 10 %, L-glutamina al 1 % y penicilina G/estreptomomicina al 1 %. Las células se cultivaron a una concentración inicial de $3 \cdot 10^6$ células en matraces de 75 cm² y se mantuvieron a 37 °C en CO₂ al 5 %. Las células se analizaron de forma rutinaria y se encontró que eran negativas para la infección por *Mycoplasma*.

Infección de células tumorales. Las células se sembraron 24 horas antes de la infección en placas de 12 pocillos como resultado de $200 \cdot 10^3$ células por pocillo en 1 ml de medio RPMI con SFT al 10 %, para permitir que se adhirieran. Se usaron dos virus para infectar células tumorales: (I) MV-eGFP: un virus del sarampión recombinante vivo atenuado (MV Schwarz) que contiene el gen que codifica la proteína fluorescente GFP para investigar la infección de células tumorales; (II) MV-deltaC-eGFP: una cepa vacunal recombinante modificada del MV que contiene el gen que codifica la GFP.

La eficacia de infección fue distinta para los dos virus MV no modificados frente a MV-deltaC, y entre distintas líneas celulares de melanoma. Los inventores observaron que MV-deltaC tenía la capacidad de infectar células tumorales de forma más eficaz que el MV no modificado a las 24 h posinfección (Figuras 19 y 20).

Además, se demostró que las células tumorales expresaban en la membrana más "señales de peligro", tales como HSP 70 y CRT, después de la infección por MV-deltaC en comparación con MV no modificado (Figura 21). Esto sugirió una mayor eficacia para inducir respuestas inmunitarias, a través de la maduración y activación de las células dendríticas, después de que fagocitan las células apoptóticas.

La inyección *in vivo* de vacunas de MV-deltaC dentro de los tumores de melanoma evidenció el efecto potenciado de MV-deltaC para inducir una respuesta rápida en comparación con un control (Figura 22).

En conclusión, la cepa vacunal MV-deltaC presentó interesantes y mejores propiedades proapoptóticas, en comparación con la cepa vacunal de MV no modificado convencional.

Ejemplo 14

Comparación de la inducción de muerte celular en células cancerosas y no cancerosas mediante MV no modificado y MV-deltaC

Para evaluar si la inducción de una muerte celular más fuerte mediante MV-deltaC con respecto a MV no modificado era específica para células cancerosas, los inventores compararon su actividad en líneas de células cancerosas humanas (adenocarcinoma de pulmón humano A549 y cáncer de cuello uterino de Hela) y en células inmortalizadas no originadas en cánceres (células de riñón embrionario humano HEK 293 y células de riñón de mono verde africano Vero). A549 y Hela son prototipos de células cancerosas humanas usados comúnmente. Por el contrario, como están transformadas experimentalmente con Ad5, las células HEK 293 no son células cancerosas. El linaje de células Vero es continuo y aneuploide, es decir, se pueden replicar a través de muchos ciclos de división y no volverse senescentes.

Las células (40.000 por pocillo en placas de 96 pocillos) se cultivaron junto con los virus MV-deltaC o MV no modificado a distintas MOI (0,1, 1, 5, 10). Las infecciones se realizaron en células no adherentes en DMEM (0,2 ml). Después de 0, 24, 46 y 68 horas de cultivo, se determinó el número de células vivas utilizando el reactivo CellTiter-GLO (Promega). Este ensayo basado en luciferasa evaluó mediante cuantificación de ATP el número de células metabólicamente activas en los pocillos de cultivo.

Estos análisis confirmaron que MV-deltaC inducía una muerte celular mucho más alta y más temprana que el MV no modificado, tanto en las células de cáncer humano A549 como Hela, incluso a una baja MOI (Figura 23A). Por lo tanto, la mejor capacidad oncolítica de MV-deltaC se extendió del mesotelioma, el melanoma y el pulmón a las células cancerosas de cuello uterino. Por el contrario, no se observó diferencia entre los dos virus en la inducción de muerte celular en células Vero, y no se observó muerte celular en células HEK 293 después de 68 horas de infección (Figura 23B). Esto sugirió que el mecanismo por el cual MV-deltaC aceleró la muerte celular en comparación con el MV no modificado, o con las rutas de senescencia reactivadas, era específico para las células cancerosas humanas. La observación de que las células Vero no eran más sensibles a MV-deltaC que a MV no modificado fue crucial, debido a que el MV se fabrica comúnmente en esta línea celular.

La cinética de crecimiento vírico de ambos virus se evaluó simultáneamente en las mismas líneas celulares (Figura 24). Se infectaron células Vero, HEK293, Hela y A549 a una MOI de 1, con MV no modificado o con MV-deltaC en pocillos de cultivo de 35 mm. Los títulos víricos se determinaron como DICT50 en distintos puntos de tiempo después de la infección. Se observó una alta tasa de replicación para ambos virus en las células no cancerosas Vero y HEK293. Por el contrario, los títulos de replicación fueron más bajos en las células cancerosas Hela y A549, y MV-deltaC se replicó a un nivel muy bajo en las células A549. Esto indicó que la inducción de muerte celular en células cancerosas dio como resultado una menor producción de progenie vírica, lo que fue una ventaja en cuanto a seguridad para un virus oncolítico.

LISTADO DE SECUENCIAS

5 <110> INSTITUT PASTEUR
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE

<120> USO DE UN VIRUS DEL SARAMPIÓN INFECCIOSO GENÉTICAMENTE MODIFICADO CON PROPIEDADES PROAPOPTÓTICAS POTENCIADAS (VIRUS MV-DELTAC)

10 <130> B10060A AD/DP/AM

<140> PCT/EPXXXXXX
<141> 20-01-2014

15 <150> EP 13305086.4
<151> 24-01-2013

<160> 5

20 <170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 19843
<212> ADN
25 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> pTM-MV Schw-deltaC-ATU1 (eGFP)

30 <220>
<221> mutación
<222> (2788)..(2788)
<223> El nucleótido T del ADNc genómico de MV Schw nativo se reemplaza por un nucleótido C

35 <400> 1

gcggccgcta atacgactca ctatagggcc aactttgttt ggtctgatga gtccgtgagg 60
acgaaacccg gagtcccggg tcaccaaaca aagttgggta aggatagttc aatcaatgat 120
catcttctag tgcacttagg attcaagatc ctattatcag ggacaagagc aggattaggg 180
atatccgaga cgcgtagcat ggtgagcaag ggcgaggagc tgttcaccgg ggtggtgccc 240
atcctggtcg agctggacgg cgacgtaaac ggccacaagt tcagcgtgtc cggcgagggc 300
gagggcgatg ccacctacgg caagctgacc ctgaagttca tctgcaccac cggcaagctg 360
cccgtgccct ggcccaccct cgtgaccacc ctgacctacg gcgtgcagtg cttcagccgc 420
taccgccgacc acatgaagca gcacgacttc ttcaagtccg ccatgcccga aggctacgtc 480
caggagcgca ccatcttctt caaggacgac ggcaactaca agaccgcgcg cgaggtgaag 540
ttcgagggcg acaccctggt gaaccgcatc gagctgaagg gcatcgactt caaggaggac 600
ggcaacatcc tggggcacia gctggagtac aactacaaca gccacaacgt ctatatcatg 660
gccgacaagc agaagaacgg catcaaggtg aacttcaaga tccgccacia catcgaggac 720
ggcagcgtgc agctcgccga ccaactaccag cagaacaccc ccatcgccga cggccccgtg 780

ES 2 700 749 T3

ctgctgccccg acaaccacta cctgagcacc cagtccgccc tgagcaaaga ccccaacgag 840
aagcgcgatc acatggtcct gctggagttc gtgaccgccc cgggatcac tctcggcatg 900
gacgagctgt acaagtaggc gcgcagcgcct tagacgtctc gcgatcgatt agtgcgagag 960
gccgagggcc agaacaacat cgcctacca tccatcattg ttataaaaaa cttaggattc 1020
aagatcctat tatcagggac aagagcagga ttagggatat ccgagatggc cacactttta 1080
aggagcttag cattgttcaa aagaacaag gacaaaccac ccattacatc aggatccggt 1140
ggagccatca gaggaatcaa acacattatt atagtaccaa tccctggaga ttcctcaatt 1200
accactcgat ccagacttct ggaccggttg gtgagggttaa ttggaaccg ggatgtgagc 1260
gggccccaac taacaggggc actaataggt atattatcct tatttgtgga gtctccaggt 1320
caattgattc agaggatcac cgatgaccct gacgtagca taaggctggt agaggttgtc 1380
cagagtgacc agtcacaatc tggccttacc ttcgcatcaa gaggtaccaa catggaggat 1440
gaggcggacc aatacttttc acatgatgat ccaattagta gtgatcaatc caggttcgga 1500
tggttcggga acaaggaaat ctcagatatt gaagtgcaag accctgaggg attcaacatg 1560
attctgggta ccaccttagc ccaaatttgg gtcttgctcg caaaggcgggt tacggcccca 1620
gacacggcag ctgattcggga gctaagaag tggataaagt acaccaaca aagaagggta 1680
gttggtgaat ttagattgga gagaaaatgg ttggatgtgg tgaggaacag gattgccgag 1740
gacctctcct tacgcccatt catggtcgcct ctaatcctgg atatcaagag aacacccgga 1800
aaciaaccba ggattgctga aatgatatgt gacattgata catatcctgt agaggcagga 1860
ttagccagtt ttatcctgac tattaagttt gggatagaaa ctatgtatcc tgctcttgga 1920
ctgcatgaat ttgctggtga gttatccaca cttgagtcct tgatgaacct ttaccagcaa 1980
atgggggaaa ctgcacccta catggtaatc ctggagaact caattcagaa caagttcagt 2040
gcaggatcat accctctgct ctggagctat gccatgggag taggagtgga acttgaaaac 2100
tccatgggag gtttgaactt tggccgatct tactttgatc cagcatattt tagattaggg 2160
caagagatgg taaggaggtc agctggaaag gtcagttcca cattggcatc tgaactcgggt 2220
atcactgccg aggatgcaag gcttgtttca gagattgcaa tgcatactac tgaggacaag 2280
atcagtagag cggttggacc cagacaagcc caagtatcat ttctacacgg tgatcaaagt 2340
gagaatgagc taccgagatt ggggggcaag gaagatagga ggggtcaaaca gagtcgagga 2400
gaagccaggg agagctacag agaaaccggg cccagcagag caagtgatgc gagagctgcc 2460
catcttcaa cgggcacacc cctagacatt gacactgcaa cggagtccag ccaagatccg 2520
caggacagtc gaaggtcagc tgacgccctg cttaggctgc aagccatggc aggaatctcg 2580
gaagaacaag gctcagacac ggacaccctt atagtgtaca atgacagaaa tcttctagac 2640
taggtgcgag aggccgaggg ccagaacaac atccgcctac catccatcat tgttataaaa 2700

ES 2 700 749 T3

aacttaggaa	ccagggtccac	acagccgccca	gcccatacaac	catccactcc	cacgattgga	2760
gccaatggca	gaagagcagg	cacgccacgt	caaaaacgga	ctggaatgca	tccgggctct	2820
caaggccgag	cccatcggct	cactggccat	cgaggaagct	atggcagcat	ggtcagaaat	2880
atcagacaac	ccaggacagg	agcgagccac	ctgcagggaa	gagaaggcag	gcagttcggg	2940
tctcagcaaa	ccatgcctct	cagcaattgg	atcaactgaa	ggcgggtgcac	ctcgcacccg	3000
cggtcagggga	cctggagaga	gcgatgacga	cgctgaaact	ttgggaatcc	ccccaaagaaa	3060
tctccaggca	tcaagcactg	ggttacagtg	ttattacggt	tatgatcaca	gcgggtgaagc	3120
ggttaagggga	atccaagatg	ctgactctat	catggttcaa	tcaggccttg	atggtgatag	3180
caccctctca	ggaggagaca	atgaatctga	aaacagcgat	gtggatattg	gcgaacctga	3240
taccgagggga	tatgctatca	ctgaccgggg	atctgctccc	atctctatgg	ggttcagggc	3300
ttctgatggt	gaaactgcag	aaggagggga	gatccacgag	ctcctgagac	tccaatccag	3360
aggcaacaac	tttccgaagc	ttgggaaaac	tctcaatggt	cctccgcccc	cggaccccgg	3420
tagggccagc	acttccggga	caccattaa	aaagggcaca	gacgcgagat	tagcctcatt	3480
tggaacggag	atcgcgtctt	tattgacagg	tggtgcaacc	caatgtgctc	gaaagtcacc	3540
ctcggaaacca	tcagggccag	gtgcacctgc	ggggaatgtc	cccgagtgtg	tgagcaatgc	3600
cgcaactgata	caggagtggga	caccogaatc	tggtaccaca	atctccccga	gatcccagaa	3660
taatgaagaa	gggggagact	attatgatga	tgagctgttc	tctgatgtcc	aagatattaa	3720
aacagccttg	gccaaaatac	acgaggataa	tcagaagata	atctccaagc	tagaatcact	3780
gctgttattg	aagggagaag	ttgagtcaat	taagaagcag	atcaacaggc	aaaatatcag	3840
catatccacc	ctggaaggac	acctctcaag	catcatgatc	gccattcctg	gacttgggaa	3900
ggatcccaac	gaccccactg	cagatgtcga	aatcaatccc	gacttgaaac	ccatcatagg	3960
cagagattca	ggccgagcac	tggccgaagt	tctcaagaaa	cccgttgcca	gcgcacaact	4020
ccaaggaatg	acaaatggac	ggaccagttc	cagaggacag	ctgctgaagg	aatttcagct	4080
aaagccgatc	gggaaaaaga	tgagctcagc	cgtcgggttt	gttcctgaca	ccggccctgc	4140
atcacgcagt	gtaatccgct	ccattataaa	atccagccgg	ctagaggagg	atcgggaagcg	4200
ttacctgatg	actctccttg	atgatataca	aggagccaat	gatcttgcca	agttccacca	4260
gatgctgatg	aagataataa	tgaagtagct	acagctcaac	ttacctgcca	accccatgcc	4320
agtcgaccca	actagtataa	cctaaatcca	ttataaaaaa	cttaggagca	aagtgattgc	4380
ctcccaaggt	ccacaatgac	agagacctac	gacttcgaca	agtcggcatg	ggacatcaaa	4440
gggtcgatcg	ctccgatata	accaccacc	tacagtgatg	gcaggctggt	gccccaggtc	4500
agagtcatag	atcctggtct	aggcgacagg	aaggatgaat	gctttatgta	catgtttctg	4560

ES 2 700 749 T3

ctgggggttg ttgaggacag cgattcccta gggcctccaa tcgggcgagc atttgggttc 4620
ctgcccttag gtgttggcag atccacagca aagcccgaaa aactcctcaa agaggccact 4680
gagcttgaca tagttgtag acgtacagca gggctcaatg aaaaactggt gttctacaac 4740
aacacccac taactctcct cacaccttg agaaaggtcc taacaacagg gagtgtcttc 4800
aacgcaaacc aagtgtgcaa tgcggttaat ctgataccgc tcgatacccc gcagaggttc 4860
cgtgttgttt atatgagcat caccgctctt tcggataacg ggtattacac cgttcctaga 4920
agaatgctgg aattcagatc ggtcaatgca gtggccttca acctgctggt gacccttagg 4980
attgacaagg cgataggccc tgggaagatc atcgacaata cagagcaact tcctgaggca 5040
acatttatgg tccacatcgg gaacttcagg agaagaaga gtgaagtcta ctctgccgat 5100
tattgcaaaa tgaaaatcga aaagatgggc ctggtttttg cacttgggtg gatagggggc 5160
accagtcttc acattagaag cacaggcaaa atgagcaaga ctctccatgc acaactcggg 5220
ttcaagaaga ccttatgtta cccgctgatg gatatcaatg aagacctta tcgattactc 5280
tggaggagca gatgcaagat agtaagaatc caggcagttt tgcagccatc agttcctcaa 5340
gaattccgca tttacgacga cgtgatcata aatgatgacc aaggactatt caaagttctg 5400
tagaccgtag tgcccagcaa tgcccgaaaa cgacccccct cacaatgaca gccagaaggc 5460
ccggacaaaa aagccccctc cgaaagactc cacggaccaa gcgagaggcc agccagcagc 5520
cgacggcaag cggaacacc aggcggcccc agcacagaac agccctgaca caagccacc 5580
accagccacc ccaatctgca tcctcctcgt gggacccccg aggaccaacc cccaaggctg 5640
ccccgatcc aaaccaccaa ccgcatcccc accacccccg ggaaagaaac ccccagcaat 5700
tggaaggccc ctccccctct tcctcaacac aagaactcca caaccgaacc gcacaagcga 5760
ccgaggtgac ccaaccgcag gcatccgact ccctagacag atcctctctc cccggcaaac 5820
taaacaaaac ttagggcaa ggaacataca cacccaacag aaccagacc ccggccccacg 5880
gcgcccgcgc cccaaccccc gacaaccaga gggagcccc aaccaatccc gccggtccc 5940
ccggtgccc caggcagga caccaacccc cgaacagacc cagcaccaa ccatcgacaa 6000
tccaagacgg gggggcccc ccaaaaaaag gccccaggg gccgacagcc agcacccgga 6060
ggaagcccac ccacccaca cacgaccag gcaaccaaac cagaaccag accaccctgg 6120
gccaccagct ccagactcg gccatcccc cgcagaaagg aaaggccaca acccgcgcac 6180
cccagcccc atccggcggg gagccacca acccgaacca gcaccaaga gcgatccccg 6240
aaggaccccc gaaccgaaa ggacatcagt atcccacagc ctctccaagt cccccggtct 6300
cctcctcttc togaaggac caaaagatca atccaccaca cccgacgaca ctcaactccc 6360
caccctaaa ggagacaccg ggaatcccag aatcaagact catccaatgt ccatcatggg 6420
tctcaaggtg aacgtctctg ccatattcat ggcagtactg ttaactctcc aaacaccac 6480

ES 2 700 749 T3

cgggtcaaatc cattggggca atctctctaa gataggggtg gtaggaatag gaagtgcaag 6540
 ctacaaagtt atgactcgtt ccagccatca atcattagtc ataaaattaa tgoccaatat 6600
 aactctcctc aataactgca cgagggtaga gattgcagaa tacaggagac tactgagaac 6660
 agttttggaa ccaattagag atgcacttaa tgcaatgacc cagaatataa gaccggttca 6720
 gagtgtagct tcaagtagga gacacaagag atttgcggga gtagtcctgg caggtgcggc 6780
 cctaggcggt gccacagctg ctcaagataac agccggcatt gcacttcacc agtccatgct 6840
 gaactctcaa gccatcgaca atctgagagc gagcctggaa actactaatc aggcaattga 6900
 gacaatcaga caagcagggc aggagatgat attggctggt caggggtgtcc aagactacat 6960
 caataatgag ctgataccgt ctatgaacca actatcttgt gatttaatcg gccagaagct 7020
 cgggctcaaa ttgctcagat actatacaga aatcctgtca ttatttgcc ccagtttacg 7080
 ggaccccata tctgcggaga tatctatcca ggctttgagc tatgcgcttg gaggagacat 7140
 caataaggtg ttagaaaagc tcggatacag tggaggtgat ttactgggca tcttagagag 7200
 cggaggaata aaggccccga taactcacgt cgacacagag tcctacttca ttgtcctcag 7260
 tatagcctat ccgacgctgt ccgagattaa gggggtgatt gtccaccggc tagaggggggt 7320
 ctctacaac ataggctctc aagagtggta taccactgtg cccaagtatg ttgcaaccca 7380
 aggttacctt atctcgaatt ttgatgagtc atcgtgtact ttcatgccag aggggactgt 7440
 gtgcagccaa aatgccttgt acccgatgag tcctctgctc caagaatgcc tccgggggta 7500
 caccaagtcc tgtgctcgta cactcgtatc cgggtctttt gggaaaccgggt tcattttatc 7560
 acaagggaac ctaatagcca attgtgcac aatcctttgc aagtgttaca caacaggaac 7620
 gatcattaat caagaccctg acaagatcct aacatacatt gctgccgatc actgcccggt 7680
 agtcgaggtg aacggcgtga ccatccaagt cgggagcagg aggtatccag acgctgtgta 7740
 cttgcacaga attgacctg gtccctccat atcattggag aggttggacg tagggacaaa 7800
 tctggggaat gcaattgcta agttggagga tgccaaggaa ttggtggagt catcggacca 7860
 gatattgagg agtatgaaag gtttatcgag cactagcata gtctacatcc tgattgcagt 7920
 gtgtcttga gggttgatag ggatccccgc tttaatatgt tgctgcaggg ggcgttgtaa 7980
 caaaaaggga gaacaagttg gtatgtcaag accaggccta aagcctgatc ttacgggaac 8040
 atcaaaatcc tatgtaaggt cgctctgatc ctctacaact cttgaaacac aaatgtocca 8100
 caagtctcct ctctcgtcatc aagcaaccac cgcaccagc atcaagcca cctgaaatta 8160
 tctccggctt ccctctggcc gaacaatata ggtagttaat caaaacttag ggtgcaagat 8220
 catccacaat gtcaccacaa cgagaccgga taaatgcctt ctacaaagat aacccccatc 8280
 ccaaggggaag taggatagtc attaacagag aacatcttat gattgataga ccttatgttt 8340

ES 2 700 749 T3

tgctggctgt	tctgtttgtc	atgtttctga	gcttgatcgg	gttgctagcc	attgcaggca	8400
ttagacttca	tcgggcagcc	atctacaccg	cagagatcca	taaaagcctc	agcaccaatc	8460
tagatgtaac	taactcaatc	gagcatcagg	tcaaggacgt	gctgacacca	ctcttcaaaa	8520
tcatcgggta	tgaagtgggc	ctgaggacac	ctcagagatt	cactgaccta	gtgaaattaa	8580
tctctgacaa	gattaaattc	cttaatccgg	atagggagta	cgacttcaga	gatctcactt	8640
gggtgatcaa	cccgccagag	agaatcaaat	tggattatga	tcaatactgt	gcagatgtgg	8700
ctgctgaaga	gctcatgaat	gcattgggtga	actcaactct	actggagacc	agaacaacca	8760
atcagttcct	agctgtctca	aagggaact	gctcagggcc	cactacaatc	agaggtcaat	8820
tctcaaacat	gtcgtgtcc	ctgttagact	tgtatthagg	tcgaggttac	aatgtgtcat	8880
ctatagtac	tatgacatcc	cagggaatgt	atgggggaac	ttacctagt	gaaaagccta	8940
atctgagcag	caaaagggtca	gagttgtcac	aactgagcat	gtaccgagt	tttgaagtag	9000
gtgttatcag	aaatccgggt	ttgggggctc	cggtgttcca	tatgacaaac	tatcttgagc	9060
aaccagtcag	taatgatctc	agcaactgta	tgggtggcttt	gggggagctc	aaactcgcag	9120
ccctttgtca	cggggaagat	tctatcacia	ttccctatca	gggatcagg	aaaggtgtca	9180
gcttccagct	cgtcaagcta	gggtgtctgga	aatccccaac	cgacatgcaa	tcctgggtcc	9240
ccttatcaac	ggatgatcca	gtgatagaca	ggctttacct	ctcatctcac	agaggtgtta	9300
tcgctgacaa	tcaagcaaaa	tgggctgtcc	cgacaacacg	aacagatgac	aagttgcgaa	9360
tggagacatg	cttccaacag	gcgtgtaagg	gtaaaatcca	agcactctgc	gagaatccc	9420
agtgggcacc	attgaaggat	aacaggattc	cttcatacgg	ggctctgtct	gttgatctga	9480
gtctgacagt	tgagcttaaa	atcaaaattg	cttcgggatt	cgggccattg	atcacacacg	9540
gttcagggat	ggacctatac	aaatccaacc	acaacaatgt	gtattggctg	actatcccgc	9600
caatgaagaa	cctagcctta	gggtgtaatca	acacattgga	gtggataccg	agattcaagg	9660
ttagtcccta	cctcttcact	gtcccatta	aggaagcagg	cgaagactgc	catgccccaa	9720
catacctacc	tgcggagggtg	gatgggtgatg	tcaaactcag	ttccaatctg	gtgattctac	9780
ctggtcaaga	tctccaatat	gttttggtgca	cctacgatac	ttccaggggt	gaacatgctg	9840
tggtttatta	cgtttacagc	ccaagccgct	cattttctta	cttttatcct	tttaggttgc	9900
ctataaagg	ggtccccatc	gaattacaag	tggaatgctt	cacatgggac	caaaaactct	9960
ggtgccgtca	cttctgtgtg	cttgccgact	cagaatctgg	tggacatac	actcactctg	10020
ggatgggtgg	catgggagtc	agctgcacag	tcaccgggga	agatggaacc	aatcgcagat	10080
agggctgcta	gtgaaccaat	cacatgatgt	caccagaca	tcaggcatac	ccactagtgt	10140
gaaatagaca	tcagaattaa	gaaaaacgta	gggtccaagt	ggttccccgt	tatggactcg	10200
ctatctgtca	accagatctt	ataccctgaa	gttcacctag	atagcccgat	agttaccaat	10260

ES 2 700 749 T3

aagatagtag ccatacctgga gtatgctcga gtccctcacg cttacagcct ggaggaccct 10320
aactgtgtc agaacatcaa gcaccgcta aaaaacggat tttccaacca aatgattata 10380
aacaatgtgg aagttgggaa tgtcatcaag tccaagctta ggagttatcc ggcccactct 10440
catattccat atccaaattg taatcaggat ttatttaaca tagaagacaa agagtcaacg 10500
aggaagatcc gtgaactcct caaaaagggg aattcgctgt actccaaagt cagtgataag 10560
gttttccaat gcttaagggg cactaactca cggcttggcc taggctccga attgagggag 10620
gacatcaagg agaaagtat taacttggga gtttacctgc acagctcca gtggtttgag 10680
ccctttctgt tttggtttac agtcaagact gagatgaggt cagtgattaa atcacaacc 10740
catacttgcc ataggaggag acacacacct gtattcttca ctggtagttc agttgagttg 10800
ctaactcttc gtgaccttgt tgctataatc agtaaagagt ctcaacatgt atattacctg 10860
acatttgaac tggttttgat gtattgtgat gtcataagagg ggaggttaat gacagagacc 10920
gctatgacta ttgatgctag gtatacagag cttctaggaa gagtcaagata catgtggaaa 10980
ctgatagatg gtttcttccc tgcactcggg aatccaactt atcaaattgt agccatgctg 11040
gagcctcttt cacttgctta cctgcagctg agggatataa cagtagaact cagaggtgct 11100
ttccttaacc actgctttac tgaatacat gatgttcttg accaaaacgg gttttctgat 11160
gaaggtactt atcatgagtt aactgaagct ctagattaca ttttcataac tgatgacata 11220
catctgacag gggagatfff ctcatffffc agaagtttcg gccaccccag acttgaagca 11280
gtaacggctg ctgaaaatgt taggaaatac atgaatcagc ctaaagtcac tgtgtatgag 11340
actctgatga aaggtcatgc catatfffgt ggaatcataa tcaacggcta tcgtgacagg 11400
cacggaggca gttggccacc gctgaccctc cccctgcatg ctgcagacac aatccggaat 11460
gctcaagctt caggtgaagg gttaacacat gagcagtgcg ttgataactg gaaatctfff 11520
gctggagtga aatftggctg ctttatgcct cttagcctgg atagtgatct gacaatgtac 11580
ctaaaggaca aggcacttgc tgctctccaa agggaatggg attcagttta cccgaaagag 11640
ttcctgcgtt acgaccctcc caaggaacc gggtcacgga ggctttaga tgttttcctt 11700
aatgattcga gctttgacc atatgatgtg ataatgtatg ttgtaagtgg agcttacctc 11760
catgaccctg agttcaacct gtcttacagc ctgaaagaaa aggagatcaa ggaaacaggt 11820
agactffffg ctaaaatgac ttacaaaatg agggcatgcc aagtgattgc tgaaaatcta 11880
atctcaaacg ggattggcaa atatfttaag gacaatggga tggccaagga tgagcacgat 11940
ttgactaagg cactccacac tctagctgtc tcaggagtcc ccaaagatct caaagaaagt 12000
cacagggggg ggccagtctt aaaaacctac tcccgaagcc cagtccacac aagtaccagg 12060
aacgtgagag cagcaaaagg gtttataggg ttccctcaag taattcggca ggaccaagac 12120

ES 2 700 749 T3

actgatcatc cggagaatat ggaagcttac gagacagtca gtgcatttat cacgactgat 12180
ctcaagaagt actgccttaa ttggagatat gagaccatca gcttgtttgc acagaggcta 12240
aatgagattt acggattgcc ctcatTTTTc cagtggctgc ataagaggct tgagacctct 12300
gtcctgtatg taagtgacct tcattgcccc cccgacctg acgccccatat cccgttatat 12360
aaagtcccca atgatcaaat ctctattaag taccctatgg gaggtataga agggatttgt 12420
cagaagctgt ggaccatcag caccattccc tatctataacc tggctgctta tgagagcggga 12480
gtaaggattg cttegttagt gcaaggggac aatcagacca tagccgtaac aaaaagggtta 12540
cccagcacat ggccctacaa ccttaagaaa cgggaagctg ctagagtaac tagagattac 12600
tttghtaattc ttaggcaaag gctacatgat attggccatc acctcaaggc aatgagaca 12660
attgtttcat cacatTTTTt tgtctattca aaaggaatat attatgatgg gctacttgtg 12720
tcccaatcac tcaagagcat cgcaagatgt gtattctggg cagagactat agttgatgaa 12780
acaagggcag catgcagtaa tattgctaca acaatggcta aaagcatcga gagaggttat 12840
gaccgttacc ttgcatattc cctgaacgtc ctaaaagtga tacagcaaat tctgatctct 12900
cttggcttca caatcaattc aaccatgacc cgggatgtag tcataccct cctcacaac 12960
aacgacctct taataaggat ggactgttg cccgtccta ttggggggat gaattatctg 13020
aatatgagca ggctgtttgt cagaaacatc ggtgatccag taacatcatc aattgctgat 13080
ctcaagagaa tgattctcgc ctactaatg cctgaagaga ccctccatca agtaatgaca 13140
caacaaccgg gggactcttc attcctagac tgggctagcg acccttactc agcaaatctt 13200
gtatgtgtcc agagcatcac tagactcctc aagaacataa ctgcaagggt tgtcctgatc 13260
catagtccaa acccaatggt aaaaggatta ttccatgatg acagtaaaga agaggacgag 13320
ggactggcgg cattcctcat ggacaggcat attatagtac ctagggcagc tcatgaaatc 13380
ctggatcata gtgtcacagg ggcaagagag tctattgcag gcatgctgga taccacaaaa 13440
ggcttgattc gagccagcat gaggaagggg gggttaacct ctcgagtgat aaccagattg 13500
tccaattatg actatgaaca attcagagca gggatggtgc tattgacagg aagaaagaga 13560
aatgtcctca ttgacaaaga gtcatgttca gtgcagctgg cgagagctct aagaagccat 13620
atgtggcga ggctagctcg aggacggcct atttacggcc ttgaggtccc tgatgtacta 13680
gaatctatgc gaggccacct tattcggcgt catgagacat gtgtcatctg cgagtgtgga 13740
tcagtcaact acggatgggt ttttgtcccc tcgggttgcc aactggatga tattgacaag 13800
gaaacatcat ccttgagagt cccatatatt ggttctacca ctgatgagag aacagacatg 13860
aagcttgctt togtaagagc cccaagtcga tccttgcgat ctgctgtag aatagcaaca 13920
gtgtactcat gggcttacgg tgatgatgat agctcttgga acgaagcctg gttgttggt 13980
aggcaaaggg ccaatgtgag cctggaggag ctaaggggta tcactcccat ctcaacttcg 14040

ES 2 700 749 T3

actaatttag cgcataggtt gagggatcgt agcactcaag tgaaatactc aggtacatcc 14100
 cttgtccgag tggcgaggtt taccacaatc tccaacgaca atctctcatt tgtcatatca 14160
 gataagaagg ttgatactaa ctttatatac caacaaggaa tgcttctagg gttgggtggt 14220
 ttagaaacat tgtttcgact cgagaaagat accggatcat ctaacacggt attacatctt 14280
 cacgtcgaaa cagattggtg cgtgatcccg atgatagatc atcccaggat acccagctcc 14340
 cgcaagctag agctgagggc agagctatgt accaaccocat tgatatatga taatgcacct 14400
 ttaattgaca gagatgcaac aaggctatac acccagagcc ataggaggca ctttgtggaa 14460
 tttgttacat ggtccacacc ccaactatat cacatthtag ctaagtccac agcactatct 14520
 atgattgacc tggtaacaaa atttgagaag gaccatatga atgaaatttc agctctcata 14580
 ggggatgacg atatcaatag tttcataact gagtttctgc tcatagagcc aagattattc 14640
 actatctact tgggccagtg tgcggccatc aattgggcat ttgatgtaca ttatcataga 14700
 ccatcagga aatatcagat gggtgagctg ttgtcatcgt tcctttctag aatgagcaaa 14760
 ggagtgttta aggtgcttgt caatgctcta agccacccaa agatctacaa gaaattctgg 14820
 cattgtggta ttatagagcc tatccatggt ccttcacttg atgctcaaaa cttgcacaca 14880
 actgtgtgca acatggttta cacatgctat atgacctacc tcgacctggt gttgaatgaa 14940
 gagttagaag agttcacatt tctcttgtgt gaaagcgacg aggatgtagt accggacaga 15000
 ttcgacaaca tccaggcaaa aacttatgt gttctggcag atttgtactg tcaaccaggg 15060
 acctgcccac caattcgagg tctaagaccg gtagagaaat gtgcagttct aaccgacct 15120
 atcaaggcag aggctatggt atctccagca ggatcttcgt ggaacataaa tccaattatt 15180
 gtagaccatt actcatgctc tctgacttat ctccggcgag gatcgatcaa acagataaga 15240
 ttgagagttg atccaggatt cattttcgac gccctcgctg aggtaaatgt cagtcagcca 15300
 aagatcgga gcaacaacat ctcaaatatg agcatcaagg ctttcagacc cccacacgat 15360
 gatgttgcaa aattgctcaa agatatcaac acaagcaagc acaatcttcc catttcaggg 15420
 ggcaatctcg ccaattatga aatccatgct ttccgcagaa tcgggttgaa ctcatctgct 15480
 tgctacaaag ctggtgagat atcaacatta attaggagat gccttgagcc aggggaggac 15540
 ggcttgttct tgggtgaggg atcgggttct atgttgatca cttataaaga gatacttaaa 15600
 ctaaacaagt gcttctataa tagtggggtt tccgccaatt ctagatctgg tcaaagggaa 15660
 ttagcaccct atccctccga agttggcctt gtcgaacaca gaatgggagt aggtaatatt 15720
 gtcaaagtgc tctttaacgg gaggccgaa gtcacgtggg taggcagtgt agattgcttc 15780
 aatttcatag ttagtaatat ccctacctct agtgtgggggt ttatccattc agatatagag 15840
 accttgctg acaaagatac tatagagaag ctagaggaat tggcagccat cttatcgatg 15900

ES 2 700 749 T3

gctctgctcc tgggcaaaat aggatcaata ctggtgatta agcttatgcc tttcagcggg 15960
gattttgttc agggatttat aagttatgta gggcttcatt atagagaagt gaaccttgta 16020
taccctagat acagcaactt catctctact gaatcttatt tggttatgac agatctcaag 16080
gctaaccggc taatgaatcc tgaaaagatt aagcagcaga taattgaatc atctgtgagg 16140
acttcacctg gacttatagg tcacatccta tccattaagc aactaagctg catacaagca 16200
attgtgggag acgcagttag tagaggatgtag atcaatccta ctctgaaaaa acttacacct 16260
atagagcagg tgctgatcaa ttgcgggttg gcaattaacg gacctaagct gtgcaaagaa 16320
ttgatccacc atgatgttgc ctgaggcaaa gatggattgc ttaattctat actcatcctc 16380
tacagggagt tggcaagatt caaagacaac caaagaagtc aacaagggat gttccacgct 16440
taccocgtat tggtaagtag caggcaacga gaacttatat ctaggatcac ccgcaaattc 16500
tgggggcaca ttcttcttta ctccgggaac aaaaagttga taaataagtt tatccagaat 16560
ctcaagtccg gctatctgat actagactta caccagaata tcttcgtaa gaatctatcc 16620
aagtcagaga aacagattat tatgacgggg ggtttgaaac gtgagtgagg ttttaaggta 16680
acagtcaagg agaccaaaga atggataag ttagtcggat acagtgcctt gattaaggac 16740
taattggttg aactccggaa ccctaactct gccctaggtg gttaggcatt atttgcaata 16800
tattaaagaa aactttgaaa atacgaagtt tctattocca gctttgtctg gtggccggca 16860
tgggtcccagc ctctctgctg gcgcccgtg ggcacattc cgaggggacc gtcccctcgg 16920
taatggcgaa tgggacgcgg ccgatccggc tgctaacaaa gcccgaaagg aagctgagtt 16980
ggctgctgcc accgctgagc aataactagc ataaccctt ggggcctcta aacgggtctt 17040
gaggggtttt ttgctgaaag gaggaactat atccggatgc ggccgcgggc cctatggtac 17100
ccagcttttg ttcccttag tgagggttaa ttccgagctt ggcgtaatca tggatcatagc 17160
tgtttcctgt gtgaaattgt tatccgctca caattccaca caacatagga gccggaagca 17220
taaagtgtaa agcctggggg gcctaagtag tgaggtaact cacattaatt gcgttgctgct 17280
cactgcccgc tttccagtcg ggaaacctgt cgtgccagct gcattaatga atcgccaac 17340
gcgccccggg aggggggttg cgtattgggc gctcttcgc ttctctgctc actgactcgc 17400
tgcgctcggc cgttcggctg cggcgagcgg tatcagctca ctcaaaggcg gtaatacggc 17460
tatccacaga atcaggggat aacgcaggaa agaacatgtg agcaaaaggc cagcaaaagg 17520
ccaggaaccg taaaaaggcc gcgttgctg cgtttttcca taggctcggc ccccctgacg 17580
agcatcacia aatcgacgc tcaagtcaga ggtggcgaaa cccgacagga ctataaagat 17640
accagcgctt cccccctgga agctccctcg tgcgctctcc tgttccgacc ctgccgctta 17700
ccggatacct gtccgccttt ctccctcgg gaagcgtggc gctttctcaa tgctcacgct 17760
gtaggtatct cagttcggtg taggtcgttc gctccaagct gggctgtgtg cacgaacccc 17820

ES 2 700 749 T3

ccgttcagcc cgaccgctgc gccttatccg gtaactatcg tcttgagtcc aaccoggtaa 17880
 gacacgactt atcgccactg gcagcagcca ctggtaacag gattagcaga gcgaggtatg 17940
 taggcggtgc tacagagttc ttgaagtggg ggcctaacta cggctacact agaaggacag 18000
 tatttggtat ctgcgctctg ctgaagccag ttacctcggg aaaaagagtt ggtagctctt 18060
 gatccggcaa acaaaccacc gctggtagcg gtggtttttt tgtttgcaag cagcagatta 18120
 cgcgcagaaa aaaaggatct caagaagatc ctttgatctt ttctacgggg tctgacgctc 18180
 agtggaacga aaactcacgt taagggatth ttggatcatg attatcaaaa aggatcttca 18240
 cctagatcct tttaaattaa aatgaagtt ttaaataaat ctaaagtata tatgagtaaa 18300
 cttggtctga cagttaccaa tgcttaatca gtgaggcacc tatctcagcg atctgtctat 18360
 ttcgttcac catagttgcc tgactgcccg tcgtgtagat aactacgata cgggagggct 18420
 taccatctgg cccagtgct gcaatgatac cgcgagaccc acgctcaccg gctccagatt 18480
 tatcagcaat aaaccagcca gccggaaggg ccgagcgcag aagtggctct gcaactttat 18540
 ccgcctccat ccagtctatt aattggtgcc gggagctag agtaagtagt tcgccagtta 18600
 atagtttgcg caacgttggt gccattgcta caggcatcgt ggtgtcacgc tcgtcgtttg 18660
 gtatggcttc attcagctcc ggttcccaac gatcaaggcg agttacatga tccccatgt 18720
 tgtgaaaaaa agcgggttagc tccttcggtc ctccgatcgt tgtcagaagt aagttggccg 18780
 cagtgttacc actcatgctt atggcagcac tgcataattc tcttactgtc atgccatccg 18840
 taagatgctt ttctgtgact ggtgagtact caaccaagtc attctgagaa tagtgtatgc 18900
 ggcgaccgag ttgctcttgc ccggcgtcaa tacgggataa taccgcgcca catagcagaa 18960
 ctttaaaagt gctcatcatt ggaaaacggt cttcggggcg aaaactctca aggatcttac 19020
 cgctggtgag atccagttcg atgtaaccca ctcgtgcacc caactgatct tcagcatctt 19080
 ttactttcac cagcgtttct ggggtgagcaa aaacaggaag gcaaaatgcc gcaaaaaagg 19140
 gaataagggc gacacggaaa tgttgaatac tcatactctt cttttttcaa tattattgaa 19200
 gcatttatca gggttattgt ctcatgagcg gatacatatt tgaatgtatt tagaaaaata 19260
 aacaaatagg ggttccgcgc acatttcccc gaaaagtgcc acctgaaatt gtaaacgtta 19320
 atattttggt aaaattcgcg ttaaattttt gttaaatcag ctcatTTTTT aaccaatagg 19380
 ccgaaatcgg caaaatccct tataaatcaa aagaatagac cgagataggg ttgagtgttg 19440
 ttccagtttg gaacaagagt ccactattaa agaacgtgga ctccaacgtc aaagggcgaa 19500
 aaaccgtcta tcagggcgat ggcccactac gtgaaccatc accctaatca agttttttgg 19560
 ggtcgaggtg ccgtaaagca ctaaactcga accctaaagg gagccccga tttagagctt 19620
 gacggggaaa gccggcgaac gtggcgagaa aggaagggaa gaaagcgaaa ggagcggggc 19680

ES 2 700 749 T3

	ctagggcgct ggcaagtgta gcggtcacgc tgcgcgtaac caccacaccc gccgcgctta	19740
	atgcgccgct acagggcgcg tcccattcgc cattcaggct gcgcaactgt tgggaagggc	19800
	gatcgggtgcg ggcctcttcg ctattacgcc agccaccgcg gtg	19843
	<210> 2	
	<211> 19843	
5	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
10	<223> Variante de pTM-MV Schw-deltaC-ATU1 (eGFP)	
	<220>	
	<221> mutación	
	<222> (2788)..(2788)	
15	<223> El nucleótido T del ADNc genómico de MV Schw nativo se reemplaza por un nucleótido C	
	<220>	
	<221> mutación	
	<222> (2803)..(2803)	
20	<223> El nucleótido G del ADNc del genoma de MV Schw nativo se reemplaza por un nucleótido A	
	<400> 2	
	gcgggccgcta atacgactca ctatagggcc aactttgttt ggtctgatga gtccgtgagg	60
	acgaaacccg gagtcccggg tcaccaaaca aagttgggta aggatagtgc aatcaatgat	120
	catcttctag tgcacttagg attcaagatc ctattatcag ggacaagagc aggattaggg	180
	atatccgaga cgcgtacgat ggtgagcaag ggcgaggagc tgttcaccgg ggtggtgccc	240
	atcctggtcg agctggacgg cgacgtaaac ggccacaagt tcagcgtgtc cggcgagggc	300
	gagggcgatg ccacctacgg caagctgacc ctgaagttca tctgcaccac cggcaagctg	360
	cccgtgccct ggcccaccct cgtgaccacc ctgacctacg gcgtgcagtg cttcagccgc	420
	taccccgacc acatgaagca gcacgacttc ttcaagtccg ccatgcccga aggctacgtc	480
	caggagcgca ccatcttctt caaggacgac ggcaactaca agacccgcgc cgaggtgaag	540
	ttcgagggcg acaccctggt gaaccgcatc gagctgaagg gcatcgactt caaggaggac	600
	ggcaacatcc tggggcacia gctggagtag aactacaaca gccacaacgt ctatatcatg	660
	gccgacaagc agaagaacgg catcaagggtg aacttcaaga tccgccacia catcgaggac	720
	ggcagcgtgc agctcgccga ccaactaccag cagaacaccc ccatcggcga cggccccgtg	780
	ctgctgcccg acaaccacta cctgagcacc cagtccgccc tgagcaaaga cccaacgag	840
	aagcgcgatc acatggtcct gctggagttc gtgaccgccc cgggatcac tctcggcatg	900
	gacgagctgt acaagtaggc ggcgagcgtc tagacgtctc gcgatcgatt agtgcgagag	960
	gccgagggcc agaacaacat ccgcctacca tccatcattg ttataaaaaa cttaggattc	1020

ES 2 700 749 T3

aagatcctat tatcagggac aagagcagga ttagggatat ccgagatggc cacactttta 1080
aggagcttag cattgttcaa aagaacaag gacaaaccac ccattacatc aggatccggt 1140
ggagccatca gaggaatcaa acacattatt atagtaccaa tccctggaga ttcctcaatt 1200
accactcgat ccagacttct ggaccgggtg gtgagggttaa ttggaaaccg ggatgtgagc 1260
gggcccaaac taacaggggc actaataggt atattatcct tatttgtgga gtctccaggt 1320
caattgattc agaggatcac cgatgaccct gacgtagca taaggctgtt agaggttgtc 1380
cagagtgacc agtcacaatc tggccttacc ttcgcatcaa gaggtaccaa catggaggat 1440
gaggcggacc aatacttttc acatgatgat ccaattagta gtgatcaatc caggttcgga 1500
tggttcggga acaaggaaat ctgagatatt gaagtgcaag accctgaggg attcaacatg 1560
attctgggta ccaccttagc ccaaatttgg gtcttgctcg caaaggcgggt tacggcccca 1620
gacacggcag ctgattcggga gctaagaag tggataaagt acaccaaca aagaagggta 1680
gttggtgaat ttagattgga gagaaaatgg ttggatgtgg tgaggaacag gattgccgag 1740
gacctctct tacgccgatt catggtcgtct ctaatcctgg atatcaagag aacaccgga 1800
aacaaccca ggattgctga aatgatatgt gacattgata catatatcgt agaggcagga 1860
ttagccagtt ttatcctgac tattaagttt gggatagaaa ctatgtatcc tgctcttggga 1920
ctgcatgaat ttgctggtga gttatccaca cttgagtcct tgatgaacct ttaccagcaa 1980
atgggggaaa ctgcacccta catggtaatc ctggagaact caattcagaa caagttcagt 2040
gcaggatcat accctctgct ctggagctat gccatgggag taggagtgga acttgaaaac 2100
tccatgggag gtttgaactt tggccgatct tactttgatc cagcatattt tagattaggg 2160
caagagatgg taaggaggtc agctggaaag gtcagttcca cattggcatc tgaactcgggt 2220
atcactgccg aggatgcaag gcttgtttca gagattgcaa tgcatactac tgaggacaag 2280
atcagtagag cggttggacc cagacaagcc caagtatcat ttctacacgg tgatcaaagt 2340
gagaatgagc taccgagatt ggggggcaag gaagatagga ggggtcaaaca gagtcgagga 2400
gaagccaggg agagctacag agaaaccggg cccagcagag caagtgatgc gagagctgcc 2460
catcttcaa cgggcacacc cctagacatt gacactgcaa cggagtccag ccaagatccg 2520
caggacagtc gaaggtcagc tgacgccctg cttaggctgc aagccatggc aggaatctcg 2580
gaagaacaag gctcagacac ggacaccctt atagtgtaca atgacagaaa tcttctagac 2640
taggtgagag aggccgaggg ccagaacaac atccgcctac catccatcat tgttataaaa 2700
aacttaggaa ccaggtccac acagccgcca gcccatcaac catccactcc cacgattgga 2760
gccaatggca gaagagcagg cacgccacgt caaaaacgga ctagaatgca tccgggctct 2820
caagccgag cccatcggct cactggccat cgaggaagct atggcagcat ggtcagaaat 2880
atcagacaac ccaggacagg agcgagccac ctgcagggaa gagaaggcag gcagttcggg 2940

ES 2 700 749 T3

tctcagcaaa	ccatgcctct	cagcaattgg	atcaactgaa	ggcgggtgcac	ctcgcacccg	3000
cggtcagga	cctggagaga	gcgatgacga	cgctgaaact	ttgggaatcc	ccccaaagaaa	3060
tctccaggca	tcaagcactg	ggttacagtg	ttattacggt	tatgatcaca	gcgggtgaagc	3120
ggttaaggga	atccaagatg	ctgactctat	catggttcaa	tcaggccttg	atgggtgatag	3180
caccctctca	ggaggagaca	atgaatctga	aaacagcgat	gtggatattg	gcgaacctga	3240
taccgagga	tatgctatca	ctgaccgggg	atctgctccc	atctctatgg	ggttcagggc	3300
ttctgatggt	gaaactgcag	aaggagggga	gatccacgag	ctcctgagac	tccaatccag	3360
aggcaacaac	tttccgaagc	ttgggaaaac	tctcaatggt	cctccgcccc	cggaccccgg	3420
tagggccagc	acttccggga	caccatta	aaagggcaca	gacgcgagat	tagcctcatt	3480
tggaacggag	atcgcgtctt	tattgacagg	tggtgcaacc	caatgtgctc	gaaagtcacc	3540
ctcggaaacca	tcagggccag	gtgcacctgc	ggggaatgtc	cccagagtgtg	tgagcaatgc	3600
cgcactgata	caggagtga	caccogaatc	tggtaccaca	atctccccga	gatcccagaa	3660
taatgaagaa	gggggagact	attatgatga	tgagctgttc	tctgatgtcc	aagatattaa	3720
aacagccttg	gccaaaatac	acgaggataa	tcagaagata	atctccaagc	tagaatcact	3780
gctgttattg	aagggagaag	ttgagtcaat	taagaagcag	atcaacaggc	aaaatatcag	3840
catatccacc	ctggaaggac	acctctcaag	catcatgatc	gccattcctg	gacttgggaa	3900
ggatcccaac	gaccccactg	cagatgtcga	aatcaatccc	gacttgaaac	ccatcatagg	3960
cagagattca	ggccgagcac	tggccgaagt	tctcaagaaa	cccgttgcca	gccgacaact	4020
ccaaggaatg	acaaatggac	ggaccagttc	cagaggacag	ctgctgaagg	aatttcagct	4080
aaagccgatc	gggaaaaaga	tgagctcagc	cgtcgggttt	gttcctgaca	ccggccctgc	4140
atcacgcagt	gtaatccgct	ccattataaa	atccagccgg	ctagaggagg	atcggaagcg	4200
ttacctgatg	actctccttg	atgatatcaa	aggagccaat	gatcttgcca	agttccaacca	4260
gatgctgatg	aagataataa	tgaagtagct	acagctcaac	ttacctgcca	accccatgcc	4320
agtcgacca	actagtacaa	cctaaatcca	ttataaaaaa	cttaggagca	aagtgattgc	4380
ctccaaggt	ccacaatgac	agagacctac	gacttcgaca	agtcggcatg	ggacatcaaa	4440
gggtcgatcg	ctccgatata	acccaccacc	tacagtgatg	gcaggctggg	gccccaggtc	4500
agagtcatag	atcctggtct	aggcgacag	aaggatgaat	gctttatgta	catgtttctg	4560
ctgggggttg	ttgaggacag	cgattcccta	gggcctccaa	tcgggagagc	atttgggttc	4620
ctgcccttag	gtgttggcag	atccacagca	aagcccga	aaactcctcaa	agaggccact	4680
gagcttgaca	tagttgtag	acgtacagca	gggctcaatg	aaaaactggg	gttctacaac	4740
aacacccac	taactctcct	cacaccttgg	agaaagggtcc	taacaacagg	gagtgcttcc	4800

ES 2 700 749 T3

aacgcaaacc aagtgtgcaa tgcggttaat ctgataccgc tcgatacccc gcagaggttc 4860
 cgtgttgttt atatgagcat caccctctt tcggataacg ggtattacac cgttcctaga 4920
 agaatgctgg aattcagatc ggtcaatgca gtggccttca acctgctggt gacccttagg 4980
 attgacaagg cgataggccc tgggaagatc atcgacaata cagagcaact tcctgaggca 5040
 acatttatgg tccacatcgg gaacttcagg agaaagaaga gtgaagtcta ctctgccgat 5100
 tattgcaaaa tgaaaatcga aaagatgggc ctggtttttg cacttgggtg gatagggggc 5160
 accagtcttc acattagaag cacaggcaaa atgagcaaga ctctccatgc acaactcggg 5220
 ttcaagaaga ccttatgtta cccgctgatg gatatcaatg aagacctta tcgattactc 5280
 tggaggagca gatgcaagat agtaagaatc caggcagttt tgcagccatc agttcctcaa 5340
 gaattccgca tttacgacga cgtgatcata aatgatgacc aaggactatt caaagttctg 5400
 tagaccgtag tgcccagcaa tgcccgaaaa cgacccccct cacaatgaca gccagaaggc 5460
 ccggacaaaa aagccccctc cgaaagactc cacggaccaa gcgagaggcc agccagcagc 5520
 cgacggcaag cgcgaaacacc aggcggcccc agcacagaac agccctgaca caagccacc 5580
 accagccacc ccaatctgca tcctcctcgt gggacccccg aggaccaacc cccaaggctg 5640
 cccccgatcc aaaccaccaa ccgcatcccc accacccccg ggaaagaaac ccccagcaat 5700
 tggaaggccc ctccccctct tcctcaacac aagaactcca caaccgaacc gcacaagcga 5760
 ccgaggtgac ccaaccgcag gcatccgact ccctagacag atcctctctc cccggcaaac 5820
 taaacaaaac ttagggccaa ggaacataca cacccaacag aaccagacc ccggcccacg 5880
 gcgcccgcgc cccaaccccc gacaaccaga gggagcccc aaccaatccc gccggctccc 5940
 ccggtgccc aaggcaggg caaccacccc cgaacagacc cagcacccaa ccatcgacaa 6000
 tccaagacgg gggggcccc ccaaaaaaag gccccaggg gccgacagcc agcaccgcga 6060
 ggaagcccac ccacccaca cacgaccag gcaaccaaac cagaaccag accaccctgg 6120
 gccaccagct ccagactcg gccatcccc cgcagaaagg aaaggccaca acccgcgcac 6180
 ccagccccg atccggcggg gagccacca acccgaacca gcaccaaga gcgatccccg 6240
 aaggaccccc gaaccgcaa ggacatcagt atcccacagc ctctccaagt ccccgggtct 6300
 cctcctcttc tcgaaggac caaaagatca atccaccaca cccgacgaca ctcaactccc 6360
 caccctaaa ggagacaccg ggaatcccag aatcaagact catccaatgt ccatcatggg 6420
 tctcaaggtg aacgtctctg ccatattcat ggcagtactg ttaactctcc aaacaccac 6480
 cggtaaatac cattggggca atctctctaa gataggggtg gtaggaatag gaagtgcaag 6540
 ctacaaaagt atgactcgtt ccagccatca atcattagtc ataaaattaa tgcccaatat 6600
 aactctcctc aataactgca cgagggtaga gattgcagaa tacaggagac tactgagaac 6660
 agttttggaa ccaattagag atgcacttaa tgcaatgacc cagaatataa gaccggttca 6720

ES 2 700 749 T3

gagtgtagct tcaagtagga gacacaagag atttgcggga gtagtcctgg caggtgcggc 6780
cctaggcgtt gccacagctg ctcagataac agccggcatt gcacttcacc agtccatgct 6840
gaactctcaa gccatcgaca atctgagagc gagcctggaa actactaatc aggcaattga 6900
gacaatcaga caagcagggc aggagatgat attggctggt caggggtgtcc aagactacat 6960
caataatgag ctgataccgt ctatgaacca actatcttgt gatttaatcg gccagaagct 7020
cgggctcaaa ttgctcagat actatacaga aatcctgtca ttatttggcc ccagtttacg 7080
ggacccata tctgcggaga tatctatcca ggctttgagc tatgcgcttg gaggagacat 7140
caataaggtg ttagaaaagc tccgatacag tggaggtgat ttactgggca tcttagagag 7200
cggaggaata aaggcccgga taactcacgt cgacacagag tcctacttca ttgtcctcag 7260
tatagcctat ccgacgctgt ccgagattaa gggggtgatt gtccaccggc tagagggggt 7320
ctcgtacaac ataggctctc aagagtggta taccactgtg cccaagtatg ttgcaaccca 7380
aggtacctt atctcgaatt ttgatgagtc atcgtgtact ttcatgccag aggggactgt 7440
gtgcagccaa aatgccttgt acccgatgag tcctctgctc caagaatgcc tccgggggta 7500
caccaagtcc tgtgctcgta cactcgtatc cgggtctttt gggaaccggg tcattttatc 7560
acaaggaac ctaatagcca attgtgcac c aatcctttgc aagtgttaca caacaggaac 7620
gatcattaat caagaccctg acaagatcct aacatacatt gctgccgatc actgcccggt 7680
agtcgaggtg aacggcgtga ccatccaagt cgggagcagg aggtatccag acgctgtgta 7740
cttgcacaga attgacctcg gtcctcccat atcattggag aggttggacg tagggacaaa 7800
tctggggaat gcaattgcta agttggagga tgccaaggaa ttgttggagt catcggacca 7860
gatattgagg agtatgaaag gtttatcgag cactagcata gtctacatcc tgattgcagt 7920
gtgtcttggg gggttgatag ggatccccgc tttaatatgt tgctgcaggg ggcgttgtaa 7980
caaaaagggg gaacaagttg gtatgtcaag accaggccta aagcctgatc ttacgggaac 8040
atcaaaatcc tatgtaaggt cgctctgatc ctctacaact cttgaaacac aaatgtccca 8100
caagtctcct cttcgtcatc aagcaaccac cgcaccacagc atcaagccca cctgaaatta 8160
tctccggctt ccctctggcc gaacaatatc ggtagttaat caaaacttag ggtgcaagat 8220
catccacaat gtcaccacaa cgagaccgga taaatgcctt ctacaaagat aacccccatc 8280
ccaagggag taggatagtc attaacagag aacatcttat gattgataga ccttatgttt 8340
tgctggctgt tctgtttgtc atgtttctga gcttgatcgg gttgctagcc attgcaggca 8400
ttagacttca tcgggcagcc atctacaccg cagagatcca taaaagcctc agcaccaatc 8460
tagatgtaac taactcaatc gagcatcagg tcaaggacgt gctgacacca ctcttcaaaa 8520
tcatcgggtg tgaagtgggc ctgaggacac ctcagagatt cactgaccta gtgaaattaa 8580

ES 2 700 749 T3

tctctgacaa gattaaattc cttaatccgg ataggaggta cgacttcaga gatctcactt	8640
gggtgatcaa cccgccagag agaatcaaat tggattatga tcaatactgt gcagatgtgg	8700
ctgctgaaga gctcatgaat gcattggtga actcaactct actggagacc agaacaacca	8760
atcagttcct agctgtctca aagggaact gctcagggcc cactacaatc agaggtcaat	8820
tctcaaacat gtcgctgtcc ctgttagact tgtatttagg tcgaggttac aatgtgtcat	8880
ctatagtac tatgacatcc cagggaatgt atgggggaac ttacctagtg gaaaagccta	8940
atctgagcag caaaaggta gagttgtcac aactgagcat gtaccgagtg tttgaagtag	9000
gtgttatcag aaatccgggt ttgggggctc cggtgttcca tatgacaaac tatcttgagc	9060
aaccagtacg taatgatctc agcaactgta tgggtgcttt gggggagctc aaactcgag	9120
ccctttgtca cggggaagat tctatcacia ttccctatca gggatcaggg aaaggtgtca	9180
gcttccagct cgtcaagcta ggtgtctgga aatccccaac cgacatgcaa tcctgggtcc	9240
ccttatcaac ggatgatcca gtgatagaca ggctttacct ctcatctcac agaggtgta	9300
tcgctgacaa tcaagcaaaa tgggctgtcc cgacaacacg aacagatgac aagttgcaaa	9360
tggagacatg cttccaacag gcgtgtaagg gtaaaatcca agcactctgc gagaatcccg	9420
agtgggcacc attgaaggat aacaggattc cttcatacgg ggtcttgtct gttgatctga	9480
gtctgacagt tgagcttaa atcaaaattg cttcgggatt cgggccattg atcacacacg	9540
gttcagggat ggacctatac aaatccaacc acaacaatgt gtattggctg actatcccgc	9600
caatgaagaa cctagcctta ggtgtaatca acacattgga gtggataccg agattcaagg	9660
ttagtcccta cctcttact gtcccaatta aggaagcagg cgaagactgc catgccccaa	9720
catacctacc tgcggagggtg gatggtgatg tcaaactcag ttccaatctg gtgattctac	9780
ctggtcaaga tctccaatat gttttggcaa cctacgatac ttccaggggt gaacatgctg	9840
tggtttatta cgtttacagc ccaagccgct cttttctta cttttatcct tttaggttgc	9900
ctataaaggg ggtcccatc gaattacaag tggaatgctt cacatgggac caaaaactct	9960
ggtgccgtca cttctgtgtg cttgcgact cagaatctgg tggacatata actcactctg	10020
ggatggtggg catgggagtc agctgcacag tccccggga agatggaacc aatcgcagat	10080
agggtgcta gtgaaccaat cacatgatgt caccagaca tcaggcatac ccactagtgt	10140
gaaatagaca tcagaattaa gaaaaacgta gggccaagt ggttccccgt tatggactcg	10200
ctatctgtca accagatctt atacctgaa gttcacctag atagccgat agttaccaat	10260
aagatagtag ccatcctgga gtatgctcga gtccctcacg cttacagcct ggaggacct	10320
acactgtgtc agaacatcaa gcaccgccta aaaaocggat tttccaacca aatgattata	10380
aacaatgtgg aagttgggaa tgtcatcaag tccaagotta ggagttatcc ggcccactct	10440
catattccat atccaaattg taatcaggat ttatttaaca tagaagacaa agagtcaacg	10500

ES 2 700 749 T3

aggaagatcc gtgaactcct caaaaagggg aattcgctgt actccaaagt cagtgataag 10560
 gttttccaat gcttaagga cactaactca cggcttgcc taggctccga attgagggag 10620
 gacatcaagg agaaagttat taacttggga gtttacatgc acagctccca gtggtttgag 10680
 ccctttctgt tttggtttac agtcaagact gagatgaggt cagtgattaa atcacaaacc 10740
 catacttgcc ataggaggag acacacacct gtattcttca ctggtagttc agttgagttg 10800
 ctaatctctc gtgaccttgt tgctataatc agtaaagagt ctcaacatgt atattacctg 10860
 acatttgaac tggttttgat gtattgtgat gtcatagagg ggaggttaat gacagagacc 10920
 gctatgacta ttgatgctag gtatacagag cttctaggaa gagtcagata catgtggaaa 10980
 ctgatagatg gtttcttccc tgcactcggg aatccaactt atcaaattgt agccatgctg 11040
 gagcctcttt cacttgctta cctgcagctg agggatataa cagtagaact cagaggtgct 11100
 ttcttaacc actgctttac tgaataacat gatgttcttg accaaaacgg gttttctgat 11160
 gaaggtactt atcatgagtt aactgaagct ctagattaca ttttcataac tgatgacata 11220
 catctgacag gggagatfff ctcatffffc agaagtttcg gccaccccag acttgaagca 11280
 gtaacggctg ctgaaaatgt taggaaatac atgaatcagc ctaaagtcac tgtgtatgag 11340
 actctgatga aaggatcatgc catatfffgt ggaatcataa tcaacggcta tctgacaggg 11400
 cacggaggca gttggccacc gctgaccctc cccctgcatg ctgcagacac aatccggaat 11460
 gctcaagctt caggtgaagg gttaacacat gagcagtgcg ttgataactg gaaatctfff 11520
 gctggagtga aatttggctg ctttatgcct cttagcctgg atagtgatct gacaatgtac 11580
 ctaaaggaca aggcacttgc tgctctcaa agggaatggg attcagttta cccgaaagag 11640
 ttctgctgtt acgaccctcc caaggaacc gggtcacgga ggctttaga tgttttcctt 11700
 aatgattcga gctttgaccc atatgatgtg ataatgtatg ttgtaagtgg agcttacctc 11760
 catgaccctg agttcaacct gtcttacagc ctgaaagaaa aggagatcaa ggaaacaggt 11820
 agactfffft ctaaaatgac ttacaaaatg agggcatgcc aagtgattgc tgaaaatcta 11880
 atctcaaacg ggattggcaa atatfftaag gacaatggga tggccaagga tgagcacgat 11940
 ttgactaagg cactccacac tctagctgtc tcaggagtcc ccaaagatct caaagaaagt 12000
 cacagggggg ggccagtctt aaaaacctac tcccgaagcc cagtccacac aagtaccagg 12060
 aacgtgagag cagcaaaagg gtttataggg ttccctcaag taattcggca ggaccaagac 12120
 actgatcatc cggagaatat ggaagcttac gagacagtca gtgcatttat cacgactgat 12180
 ctcaagaagt actgccttaa ttggagatat gagaccatca gcttgtttgc acagaggcta 12240
 aatgagatff acggattgcc ctcatffffc cagtggctgc ataagaggct tgagacctct 12300
 gtctgtatg taagtgaccc tcattgcccc cccgaccttg acgcccataat cccgttatat 12360

ES 2 700 749 T3

aaagtcccca atgatcaaat cttcattaag taccctatgg gaggtataga agggattgt 12420
 cagaagctgt ggaccatcag caccattccc tatctataacc tggctgctta tgagagcgga 12480
 gtaaggattg cttcgttagt gcaaggggac aatcagacca tagccgtaac aaaaagggtta 12540
 cccagcacat ggccctacaa ccttaagaaa cgggaagctg ctagagtaac tagagattac 12600
 tttgtaattc ttaggcaaag gctacatgat attggccatc acctcaaggc aatgagaca 12660
 attgtttcat cacatTTTTT tgtctattca aaaggaatat attatgatgg gctacttgtg 12720
 tcccaatcac tcaagagcat cgcaagatgt gtattctggg cagagactat agttgatgaa 12780
 acaagggcag catgcagtaa tattgctaca acaatggcta aaagcatcga gagaggttat 12840
 gaccgttacc ttgcatattc cctgaacgtc ctaaaagtga tacagcaaat tctgatctct 12900
 cttggcttca caatcaattc aaccatgacc cgggatgtag tcataccctt cctcaciaaac 12960
 aacgacctct taataaggat ggcactgttg cccgctccta ttggggggat gaattatctg 13020
 aatatgagca ggctgtttgt cagaaacatc ggtgatccag taacatcatc aattgctgat 13080
 ctcaagagaa tgattctcgc ctactaatg cctgaagaga ccctccatca agtaatgaca 13140
 caacaaccgg gggactcttc attcctagac tgggctagcg acccttactc agcaaatctt 13200
 gtatgtgtcc agagcatcac tagactcctc aagaacataa ctgcaagggt tgtcctgatc 13260
 catagtccaa acccaatggt aaaaggatta ttccatgatg acagtaaaga agaggacgag 13320
 ggactggcgg cattcctcat ggacaggcat attatagtac ctagggcagc tcatgaaatc 13380
 ctggatcata gtgtcacagg ggcaagagag tctattgcag gcatgctgga taccacaaaa 13440
 ggcttgattc gagccagcat gaggaagggg gggttaacct ctcgagtgat aaccagattg 13500
 tccaattatg actatgaaca attcagagca gggatggtgc tattgacagg aagaaagaga 13560
 aatgtcctca ttgacaaaga gtcatgttca gtgcagctgg cgagagctct aagaagccat 13620
 atgtgggcga ggctagctcg aggacggcct atttacggcc ttgaggtccc tgatgtacta 13680
 gaatctatgc gaggccacct tattcggcgt catgagacat gtgtcatctg cgagtgtgga 13740
 tcagtcaact acggatgggt ttttgtcccc tcgggttgcc aactggatga tattgacaag 13800
 gaaacatcat ccttgagagt cccatatatt ggttctacca ctgatgagag aacagacatg 13860
 aagcttgccct tcgtaagagc cccaagtcga tccttgcgat ctgctgtagg aatagcaaca 13920
 gtgtactcat gggcttacgg tgatgatgat agctcttgga acgaagcctg gttgttggt 13980
 aggcaaaggg ccaatgtgag cctggaggag ctaaggggtga tcactcccat ctcaacttcg 14040
 actaatttag cgcatagggt gagggatcgt agcactcaag tgaaatactc aggtacatcc 14100
 cttgtccgag tggcgaggta taccacaatc tccaacgaca atctctcatt tgtcatatca 14160
 gataagaagg ttgatactaa ctttatatac caacaaggaa tgcttctagg gttgggtggt 14220
 ttagaaacat tgtttcgact cgagaaagat accggatcat ctaacacggt attacatctt 14280

ES 2 700 749 T3

cacgtcgaaa cagattggtg cgtgatcccg atgatagatc atcccaggat acccagctcc 14340
cgcaagctag agctgagggc agagctatgt accaaccocat tgatatatga taatgcacct 14400
ttaattgaca gagatgcaac aaggctatac acccagagcc ataggaggca ccttgtggaa 14460
tttgttacat ggtccacacc ccaactatat cacatthtag ctaagtccac agcactatct 14520
atgattgacc tggtaacaaa atttgagaag gaccatatga atgaaatttc agctctcata 14580
ggggatgacg atatcaatag tttcataact gagtttctgc tcatagagcc aagattattc 14640
actatctact tgggccagtg tgcggccatc aattgggcat ttgatgtaca ttatcataga 14700
ccatcagggg aatatcagat gggtgagctg ttgtcatcgt tcctttctag aatgagcaaa 14760
ggagtgttta aggtgcttgt caatgctcta agccacccaa agatctacaa gaaattctgg 14820
cattgtggta ttatagagcc tatccatggt ccttcacttg atgctcaaaa cttgcacaca 14880
actgtgtgca acatggttta cacatgctat atgacctacc tcgacctggt gttgaatgaa 14940
gagttagaag agttcacatt tctcttgtgt gaaagcgacg aggatgtagt accggacaga 15000
ttcgacaaca tccaggcaaa acacttatgt gttctggcag atttgtactg tcaaccaggg 15060
acctgcccac caattcgagg tctaagaccg gtagagaaat gtgcagttct aaccgacct 15120
atcaaggcag aggctatggt atctccagca ggatcttcgt ggaacataaa tccaattatt 15180
gtagaccatt actcatgctc tctgacttat ctccggcgag gatcgatcaa acagataaga 15240
ttgagagttg atccaggatt cattttcgac gccctcgctg aggtaaatgt cagtcagcca 15300
aagatcggca gcaacaacat ctcaaatatg agcatcaagg ctttcagacc cccacacgat 15360
gatgttgcaa aattgctcaa agatatcaac acaagcaagc acaatcttcc catttcaggg 15420
ggcaatctcg ccaattatga aatccatgct ttccgcagaa tcggggtgaa ctcatctgct 15480
tgctacaaaag ctgttgagat atcaacatta attaggagat gccttgagcc aggggaggac 15540
ggcttgttct tgggtgaggg atcgggttct atgttgatca cttataaaga gatacttaaa 15600
ctaaacaagt gcttctataa tagtgggggt tccgccaatt ctagatctgg tcaaagggaa 15660
ttagcaccct atccctccga agttggcctt gtcgaacaca gaatgggagt aggtaatatt 15720
gtcaaagtgc tctttaacgg gaggcccgaa gtcacgtggg taggcagtgt agattgcttc 15780
aatttcatag ttagtaatat ccctacctct agtgtgggggt ttatccattc agatatagag 15840
accttgctg acaaagatac tatagagaag ctagaggaat tggcagccat cttatcgatg 15900
gctctgctcc tgggcaaaat aggatcaata ctggtgatta agcttatgcc tttcagcggg 15960
gattttgttc agggatttat aagttatgta gggctcatt atagagaagt gaaccttgta 16020
taccctagat acagcaactt catctctact gaatcttatt tggttatgac agatctcaag 16080
gctaaccggc taatgaatcc tgaaaagatt aagcagcaga taattgaatc atctgtgagg 16140

ES 2 700 749 T3

acttcacctg gacttatagg tcacatccta tccattaagc aactaagctg catacaagca 16200
attgtgggag acgcagttag tagaggtgat atcaatccta ctctgaaaaa acttacacct 16260
atagagcagg tgctgatcaa ttgcgggttg gcaattaacg gacctaagct gtgcaaagaa 16320
ttgatccacc atgatgttgc ctcagggcaa gatggattgc ttaattctat actcatcctc 16380
tacagggagt tggcaagatt caaagacaac caaagaagtc aacaagggat gttccacgct 16440
taccocgtat tggtaagtag caggcaacga gaacttatat ctaggatcac ccgcaaattc 16500
tgggggcaca ttcttcttta ctccgggaac aaaaagttga taaataagtt tatccagaat 16560
ctcaagtccg gctatctgat actagactta caccagaata tcttcgtaa gaatctatcc 16620
aagtcagaga aacagattat tatgacgggg ggtttgaaac gtgagtgggt ttttaaggta 16680
acagtcaagg agaccaaaga atggataag ttagtcggat acagtgcctt gattaaggac 16740
taattggttg aactcoggaa ccctaactct gccctaggtg gttaggcatt atttgcaata 16800
tattaaagaa aactttgaaa atacgaagtt tctattccca gctttgtctg gtggccggca 16860
tggcccagc ctctcogctg gcgccggctg ggcaacattc cgaggggacc gtcccctcgg 16920
taatggcgaa tgggacgcgg ccgatccggc tgctaacaaa gcccgaaagg aagctgagtt 16980
ggctgctgcc accgctgagc aataactagc ataaccctt ggggcctcta aacgggtctt 17040
gaggggtttt ttgctgaaag gaggaactat atccggatgc ggccgcgggc cctatggtac 17100
ccagcttttg ttccctttag tgagggtaa ttccgagctt ggcgtaatca tggatcatagc 17160
tgtttctgt gtgaaattgt tatccgctca caattccaca caacatagga gccggaagca 17220
taaagtgtaa agcctggggg gcctaagtag tgaggttaact cacattaatt gcgttgcgct 17280
cactgcccgc tttccagctg ggaaacctgt cgtgccagct gcattaatga atcgccaac 17340
gcgcgggggag agggcgtttg cgtattgggc gctcttcgctc ttctcgcctc actgactcgc 17400
tgcgctcggc cgttcggctg cggcgagcgg tatcagctca ctcaaaggcg gtaatacggc 17460
tatccacaga atcaggggat aacgcaggaa agaacatgtg agcaaaaggc cagcaaaagg 17520
ccaggaaccg taaaaaggcc gcgttgctgg cgtttttcca taggctcggc ccccctgacg 17580
agcatcacia aatcgacgc tcaagtcaga ggtggcgaaa cccgacagga ctataaagat 17640
accagycgct cccccctgga agctccctcg tgcgctctcc tgttccgacc ctgccgctta 17700
ccggatacct gtccgccttt ctcccttcgg gaagcgtggc gctttctcaa tgctcaagct 17760
gtaggtatct cagttcggtg taggtcgttc gctccaagct gggctgtgtg cacgaacccc 17820
ccgttcagcc cgaccgctgc gccttatccg gtaactatcg tcttgagtcc aaccggtaa 17880
gacacgactt atcgccactg gcagcagcca ctggtaacag gattagcaga gcgaggtatg 17940
taggcggtgc tacagagttc ttgaagtggg ggccctaacta cggctacact agaaggacag 18000
tatttggtat ctgcgctctg ctgaagccag ttaccttcgg aaaaagagtt ggtagctctt 18060

ES 2 700 749 T3

gatccggcaa	acaaaccacc	gctggtagcg	gtgggttttt	tgtttgcaag	cagcagatta	18120
cgcgagaaa	aaaaggatct	caagaagatc	ctttgatctt	ttctacgggg	tctgacgctc	18180
agtggaacga	aaactcacgt	taagggatth	tggtcatgag	attatcaaaa	aggatcttca	18240
cctagatcct	tttaaattaa	aatgaagtt	ttaaataaat	ctaaagtata	tatgagtaaa	18300
cttggctctga	cagttaccaa	tgcttaatac	gtgaggcacc	tatctcagcg	atctgtctat	18360
ttcgttcatc	catagttgcc	tgactgcccg	tcgtgtagat	aactacgata	cgggagggct	18420
taccatctgg	ccccagtgct	gcaatgatac	cgcgagaccc	acgctcaccg	gctccagatt	18480
tatcagcaat	aaaccagcca	gccggaaggg	ccgagcgcag	aagtggctct	gcaactttat	18540
ccgcctccat	ccagtctatt	aattgttgcc	gggaagctag	agtaagtagt	tcgccagtta	18600
atagtttgcg	caacgttggt	gccattgcta	caggcatcgt	ggtgtcacgc	tcgtcgtttg	18660
gtatggcttc	attcagctcc	ggttcccaac	gatcaaggcg	agttacatga	tccccatgt	18720
tgtgaaaaaa	agcggtagc	tccttcggtc	ctccgatcgt	tgtcagaagt	aagttggccg	18780
cagtgttatc	actcatgctt	atggcagcac	tgcataattc	tcttactgtc	atgccatccg	18840
taagatgctt	ttctgtgact	ggtgagtact	caaccaagtc	attctgagaa	tagtgtatgc	18900
ggcgaccgag	ttgctcttgc	ccggcgtaaa	tacgggataa	taccgcgcca	catagcagaa	18960
ctttaaaagt	gctcatcatt	ggaaaacggt	cttcggggcg	aaaactctca	aggatcttac	19020
cgctggtgag	atccagttcg	atgtaacca	ctcgtgcacc	caactgatct	tcagcatctt	19080
ttactttcac	cagcgtttct	gggtgagcaa	aaacaggaag	gcaaaatgcc	gcaaaaaagg	19140
gaataagggc	gacacggaaa	tgttgaatac	tcatactctt	cctttttcaa	tattattgaa	19200
gcatttatca	gggttattgt	ctcatgagcg	gatacatatt	tgaatgtatt	tagaaaaata	19260
aacaaatagg	ggttccgcgc	acatttcccc	gaaaagtgcc	acctgaaatt	gtaaacgtta	19320
atattttggt	aaaattcgcg	ttaaattttt	gttaaatacag	ctcatttttt	aaccaatagg	19380
ccgaaatcgg	caaaatccct	tataaatcaa	aagaatagac	cgagataggg	ttgagtgttg	19440
ttccagtttg	gaacaagagt	ccactattaa	agaacgtgga	ctccaacgtc	aaagggcgaa	19500
aaaccgtcta	tcagggcgat	ggcccactac	gtgaaccatc	accctaatac	agtttttttg	19560
ggtcgaggtg	ccgtaaagca	ctaaatcgga	accctaaagg	gagcccccca	tttagagctt	19620
gacggggaaa	gccggcgaac	gtggcgagaa	aggaagggaa	gaaagcgaaa	ggagcgggcg	19680
ctagggcgct	ggcaagtgta	gcggtcacgc	tgcgcgtaac	caccacaccc	gccgcgctta	19740
atgcgccgct	acagggcgcg	tcccattcgc	cattcaggct	gcgcaactgt	tgggaagggc	19800
gatcgggtgcg	ggcctcttcg	ctattacgcc	agccaccgcg	gtg		19843

ES 2 700 749 T3

5 <210> 3
<211> 47
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Porción de la secuencia de nucleótidos del ADNc genómico de MVSchw que muestra parte de los ORF de P y C

10 <400> 3
atggcagaag agcagggcacg ccacgtcaaa aacggactgg aatgcat 47

15 <210> 4
<211> 47
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Porción de la secuencia de nucleótidos del ADNc del genoma de MVSchw-deltaC

25 <220>
<221> mutación
<222> (24)..(24)
<223> El nucleótido T del ADNc genómico de MVSchw nativo se reemplaza por un nucleótido C

30 <400> 4
atggcagaag agcagggcacg ccacgtcaaa aacggactgg aatgcat 47

35 <210> 5
<211> 47
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> Porción de la secuencia de nucleótidos del ADNc del genoma de MVSchw-deltaC

45 <220>
<221> mutación
<222> (39)..(39)
<223> El nucleótido T del ADNc genómico de MVSchw nativo se reemplaza por un nucleótido C

<400> 5
atggcagaag agcagggcacg ccacgtcaaa aacggactag aatgcat 47

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un virus del sarampión infeccioso genéticamente modificado obtenido de una cepa del virus del sarampión atenuada viva, en el que el gen que codifica la proteína C accesoria vírica se ha suprimido (MV-deltaC) para su uso en el tratamiento de un tumor maligno agresivo o de un cáncer agresivo mediante la activación de células dendríticas plasmocitoides (las pDC), cuando se administra a un individuo diagnosticado de tal tumor maligno o una afección relacionada con cáncer.
- 10 2. El MV-deltaC infeccioso genéticamente modificado para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 en el tratamiento de un mesotelioma maligno, en particular del mesotelioma pleural maligno.
- 15 3. El MV-deltaC infeccioso genéticamente modificado para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 en el tratamiento del melanoma o del adenocarcinoma de pulmón, cuando se administra a un individuo diagnosticado de tal afección.
- 20 4. El MV-deltaC infeccioso genéticamente modificado para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en el tratamiento de un tumor maligno o de células cancerosas que son resistentes al MV no modificado, cuando se administra a un individuo diagnosticado de un tumor maligno o una afección relacionada con cáncer.
- 25 5. El MV-deltaC infeccioso genéticamente modificado para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde dicha cepa del virus del sarampión atenuada viva es la cepa Schwarz o la cepa Moraten.
- 30 6. Un método para preparar células dendríticas plasmocitoides (las pDC) vacunales destinadas al tratamiento de un tumor maligno o un cáncer en un individuo diagnosticado de tal tumor maligno o una afección relacionada con cáncer, que comprende las siguientes etapas:
- 35 - la infección *in vitro* de un tumor maligno o de células cancerosas que previamente se han recogido del individuo, con un virus del sarampión infeccioso genéticamente modificado obtenido de una cepa del virus del sarampión atenuada viva, en el que el gen que codifica la proteína C accesoria vírica se ha suprimido (MV-deltaC) para producir un lisado celular;
 - poner en contacto las pDC con el lisado celular para producir las pDC vacunales;
 - 40 - recuperar las pDC cargadas.
- 45 7. El método de acuerdo con la reivindicación 6, en donde las pDC proceden del individuo a tratar, en particular en donde las pDC se obtienen de leucocitaféresis.
- 50 8. El método de acuerdo con la reivindicación 6 o 7, en donde dicho tumor maligno o cáncer es un tumor maligno agresivo o un cáncer agresivo, en particular es mesotelioma maligno, melanoma o adenocarcinoma de pulmón.
- 55 9. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, en donde dicha cepa del virus del sarampión atenuada viva es la cepa Schwarz o la cepa Moraten.
- 60 10. Una composición farmacéutica que comprende, como principio activo, un virus del sarampión infeccioso genéticamente modificado obtenido de una cepa del virus del sarampión atenuada viva, en el que el gen que codifica la proteína C accesoria vírica se ha suprimido (MV-deltaC), en asociación con un vehículo farmacéuticamente aceptable, para su uso en el tratamiento de un tumor maligno agresivo o de un cáncer agresivo mediante la activación de las pDC, cuando se administra a un individuo diagnosticado de tal tumor maligno o una afección relacionada con cáncer.
- 65 11. Una composición farmacéutica o un conjunto de principios activos que comprende un virus del sarampión infeccioso genéticamente modificado obtenido de una cepa del virus del sarampión atenuada viva en el que el gen que codifica la proteína C accesoria vírica se ha suprimido (MV-deltaC), y que comprende además un agente quimioterapéutico y un vehículo farmacéuticamente aceptable para su uso en el tratamiento de un tumor maligno agresivo o de un cáncer agresivo, cuando se administra a un individuo diagnosticado de tal tumor maligno o una afección relacionada con cáncer.
12. La composición farmacéutica o el conjunto de principios activos para su uso de acuerdo con la reivindicación 11, que comprende además las pDC vacunales que pueden obtenerse mediante el método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9.

- 5 13. Un conjunto de principios activos que comprende (i) un virus del sarampión infeccioso genéticamente modificado obtenido de una cepa del virus del sarampión atenuada viva, en el que el gen que codifica la proteína C accesoria vírica se ha suprimido (MV-deltaC) y (ii) las pDC vacunales que pueden obtenerse mediante el método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, para su uso para la administración simultánea o separada en el tratamiento de un tumor maligno agresivo o de un cáncer agresivo, cuando se administra a un individuo diagnosticado de tal tumor maligno o una afección relacionada con cáncer.

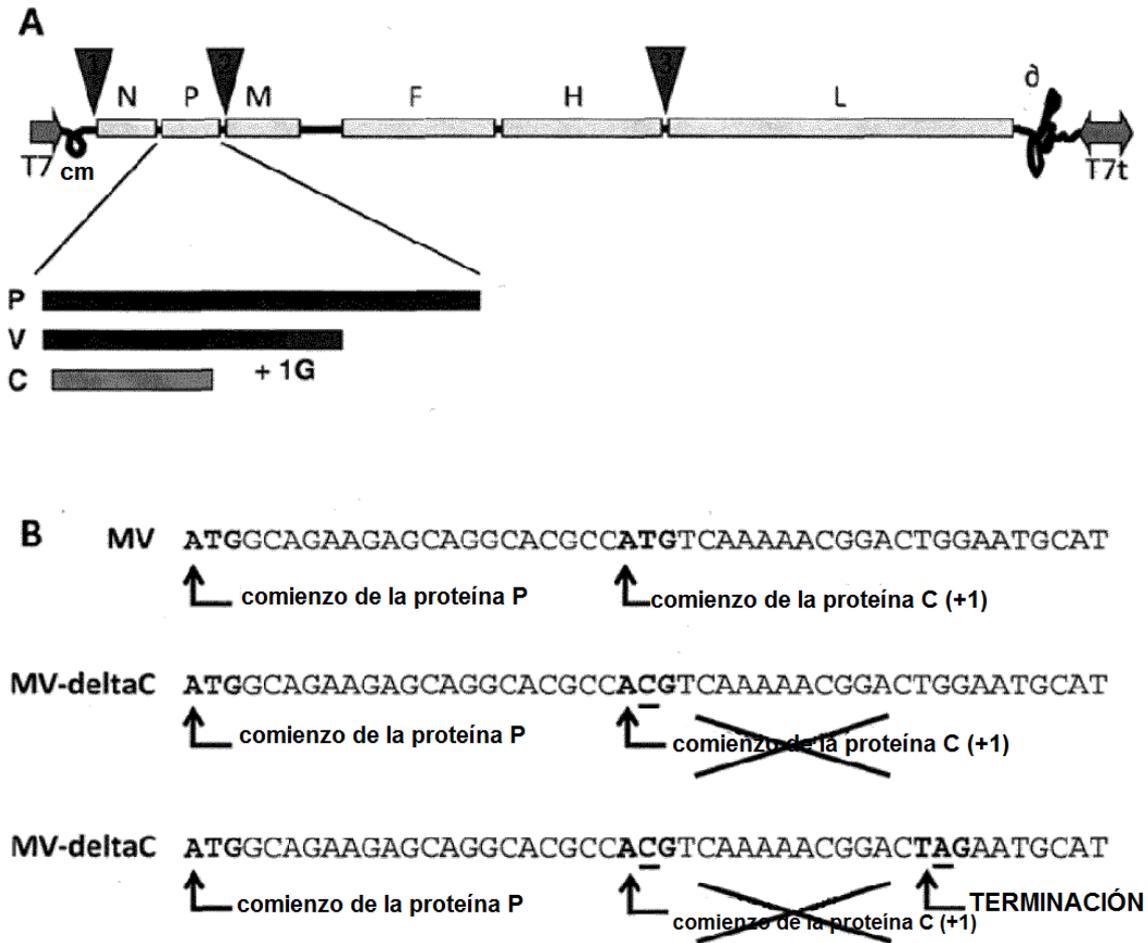


Figura 1

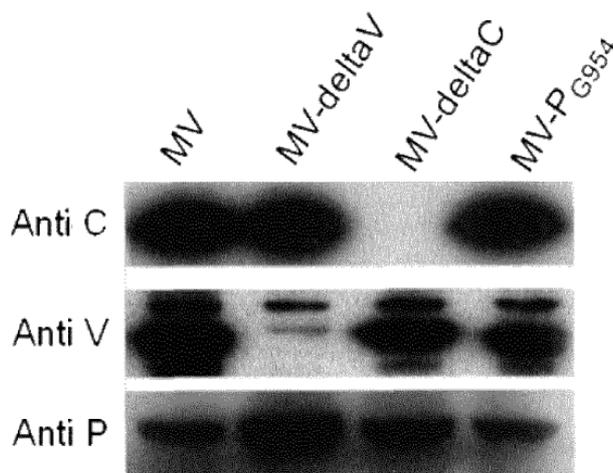


Figura 2

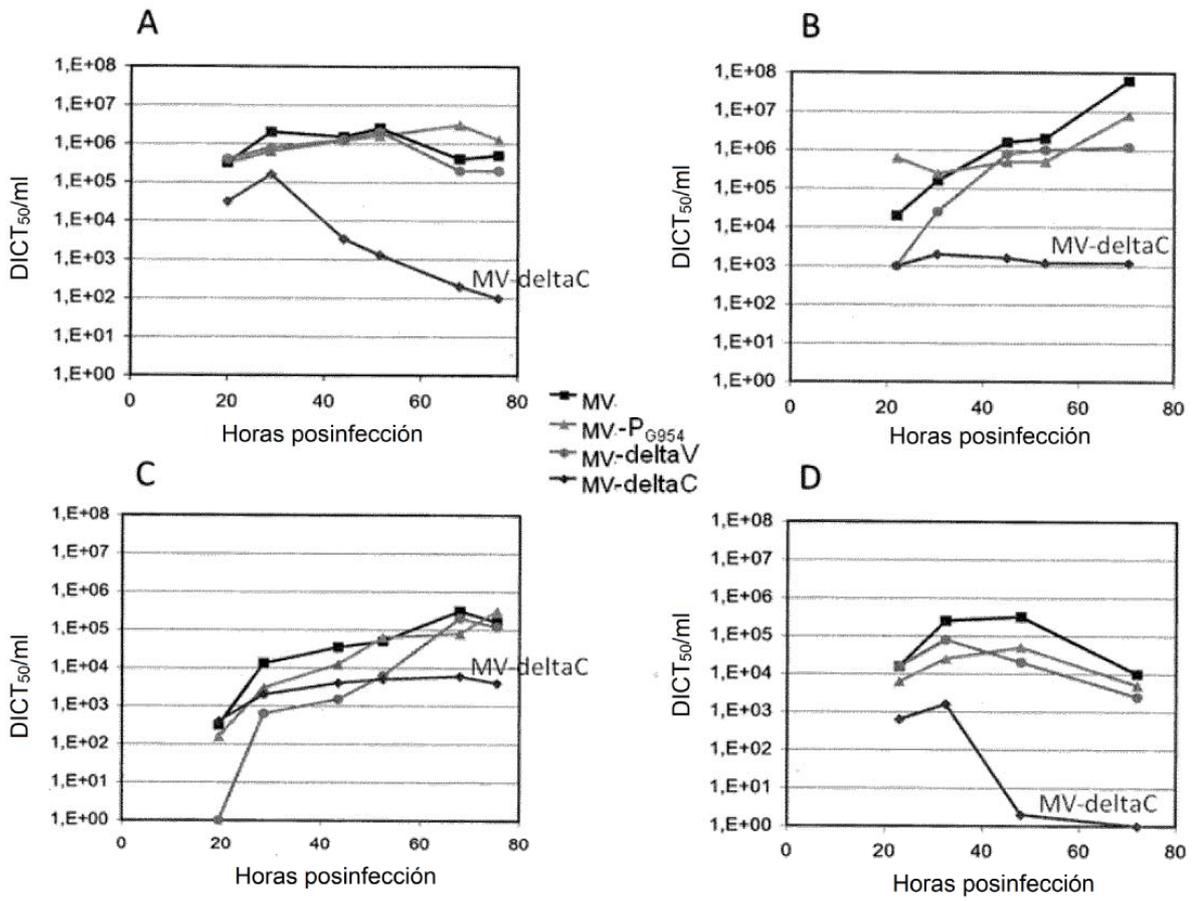


Figura 3

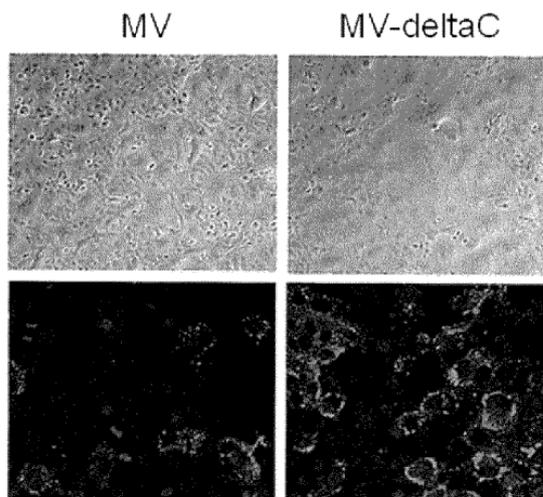


Figura 4

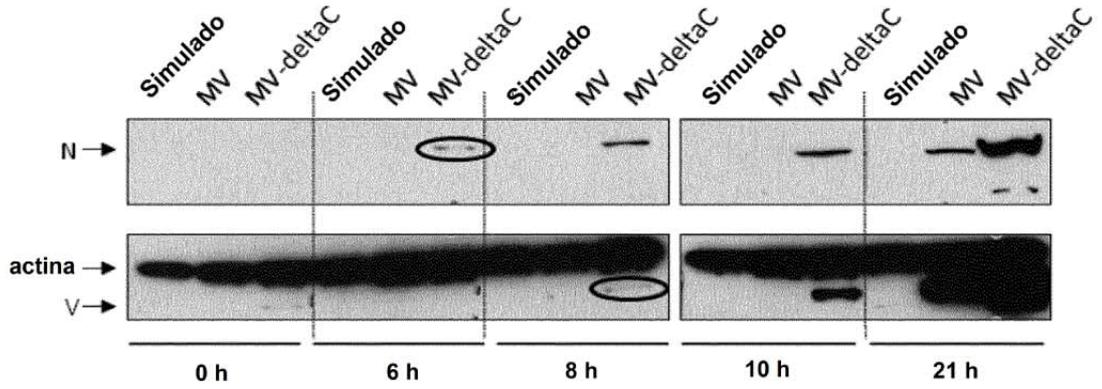


Figura 5

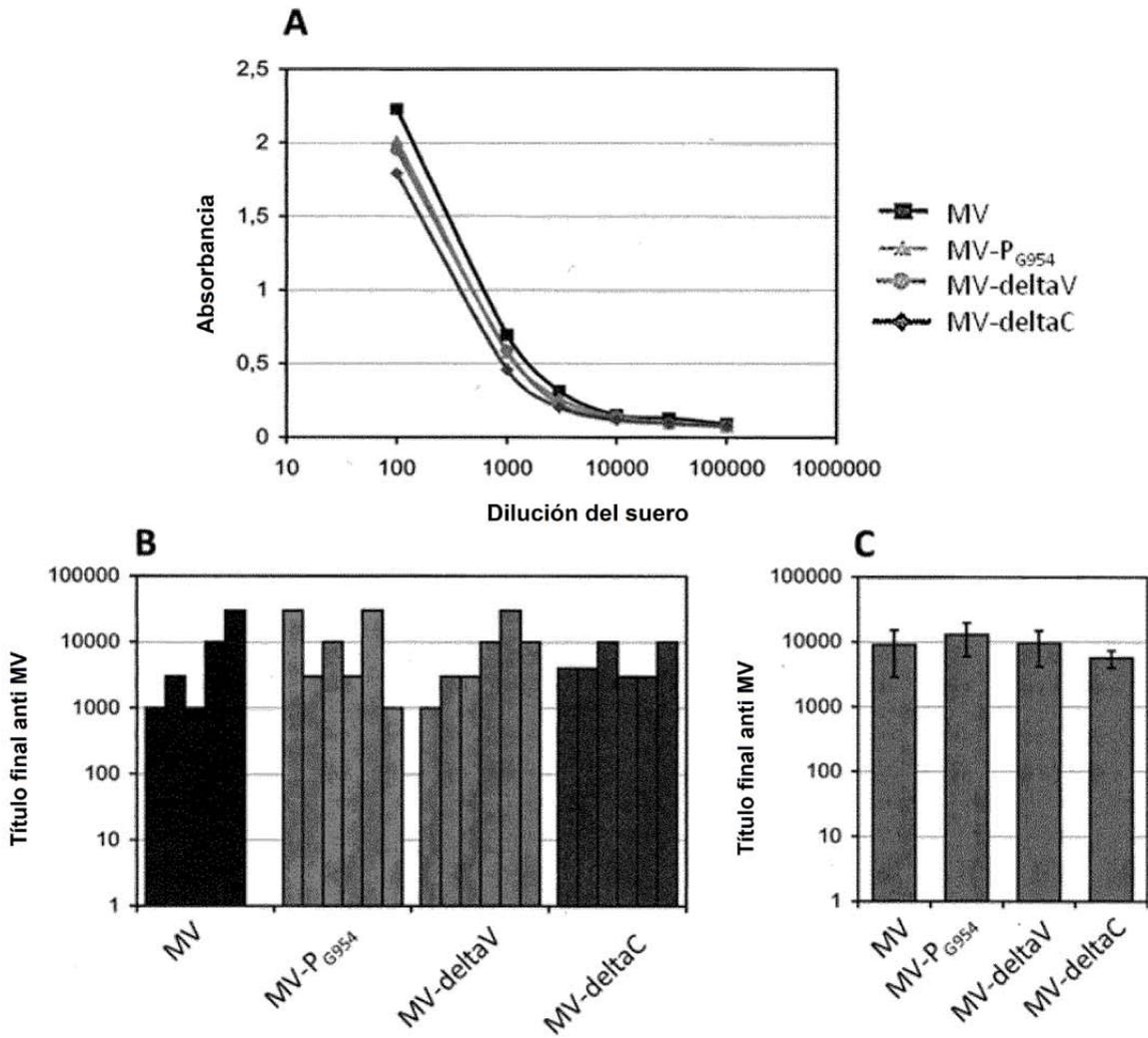
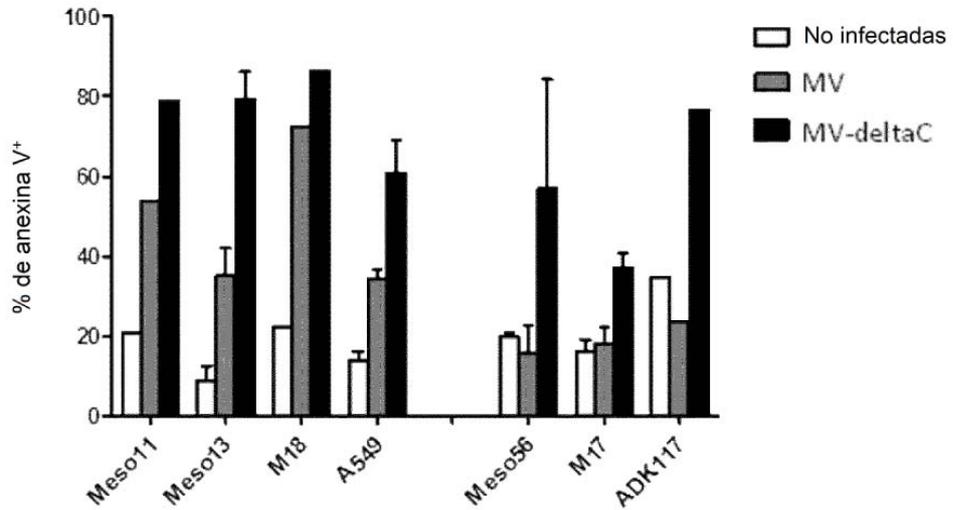


Figura 6

A



B

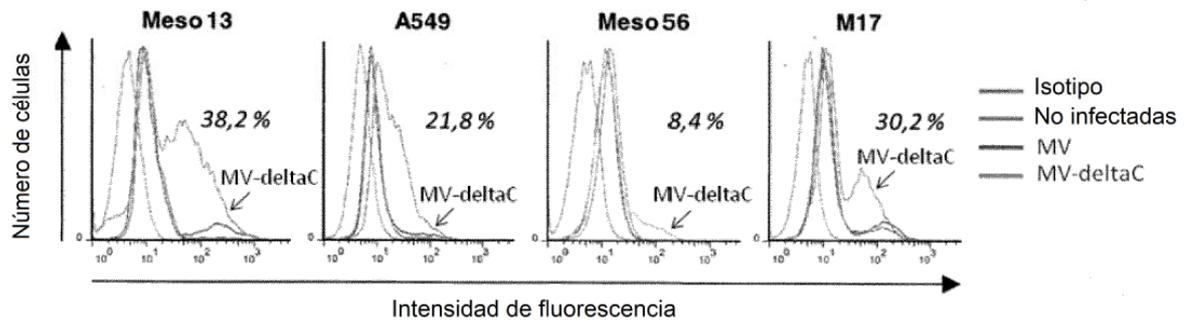


Figura 7

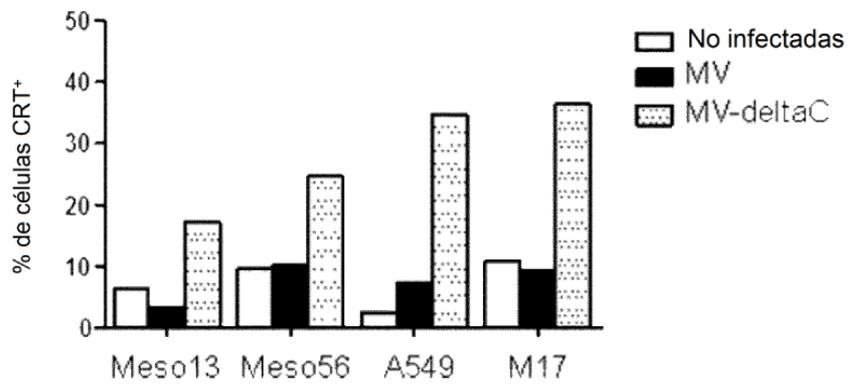


Figura 8

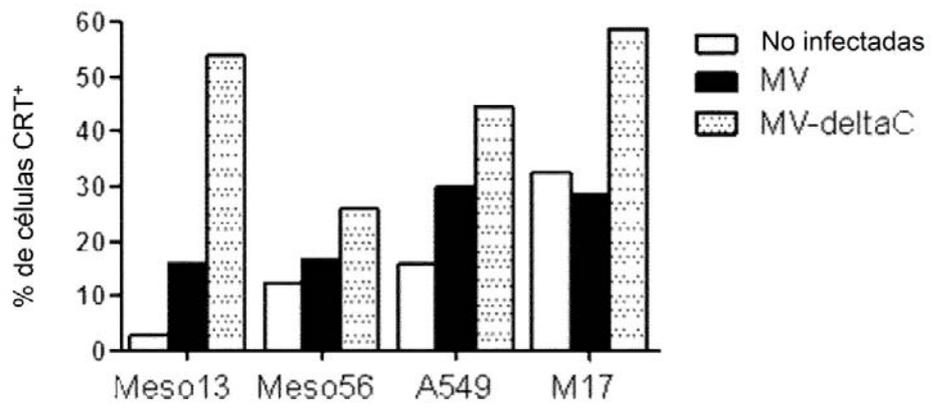


Figura 9

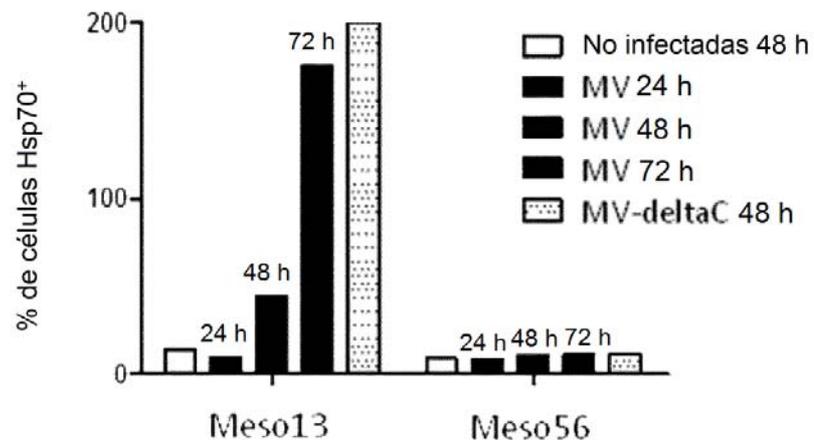


Figura 10

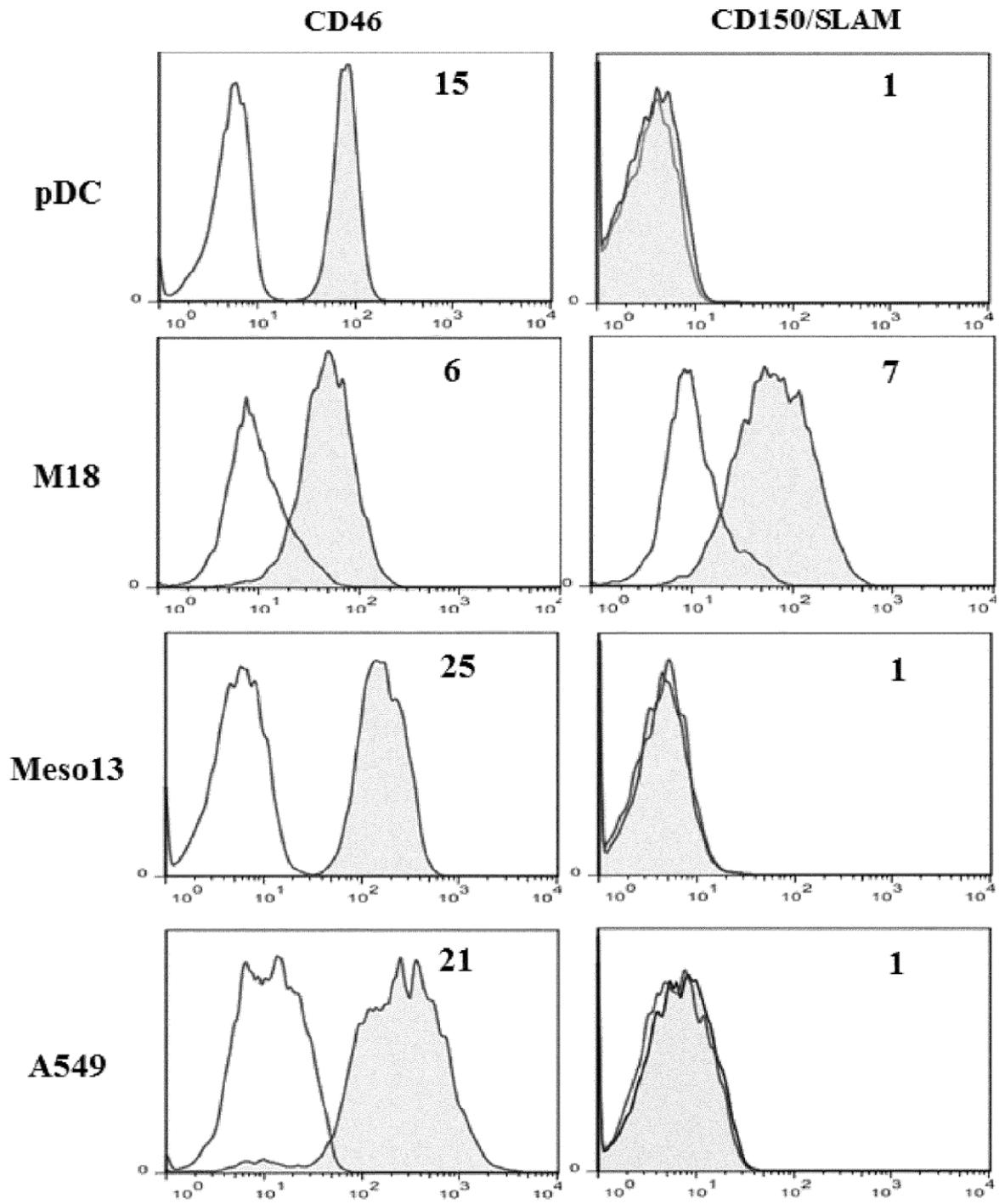


Figura 11A

B

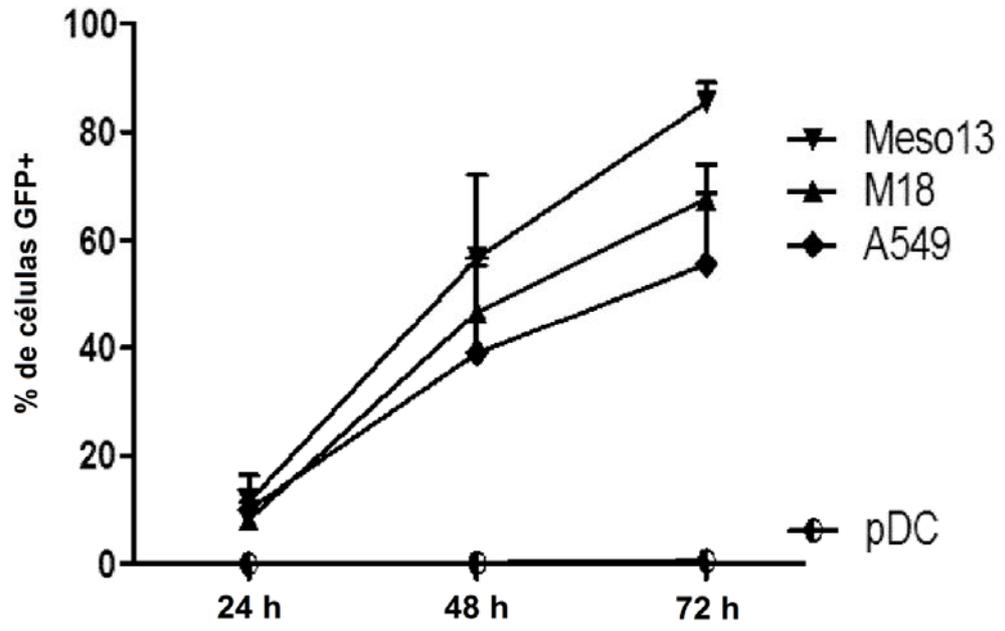


Figura 11B

EP 2 948 157 B1

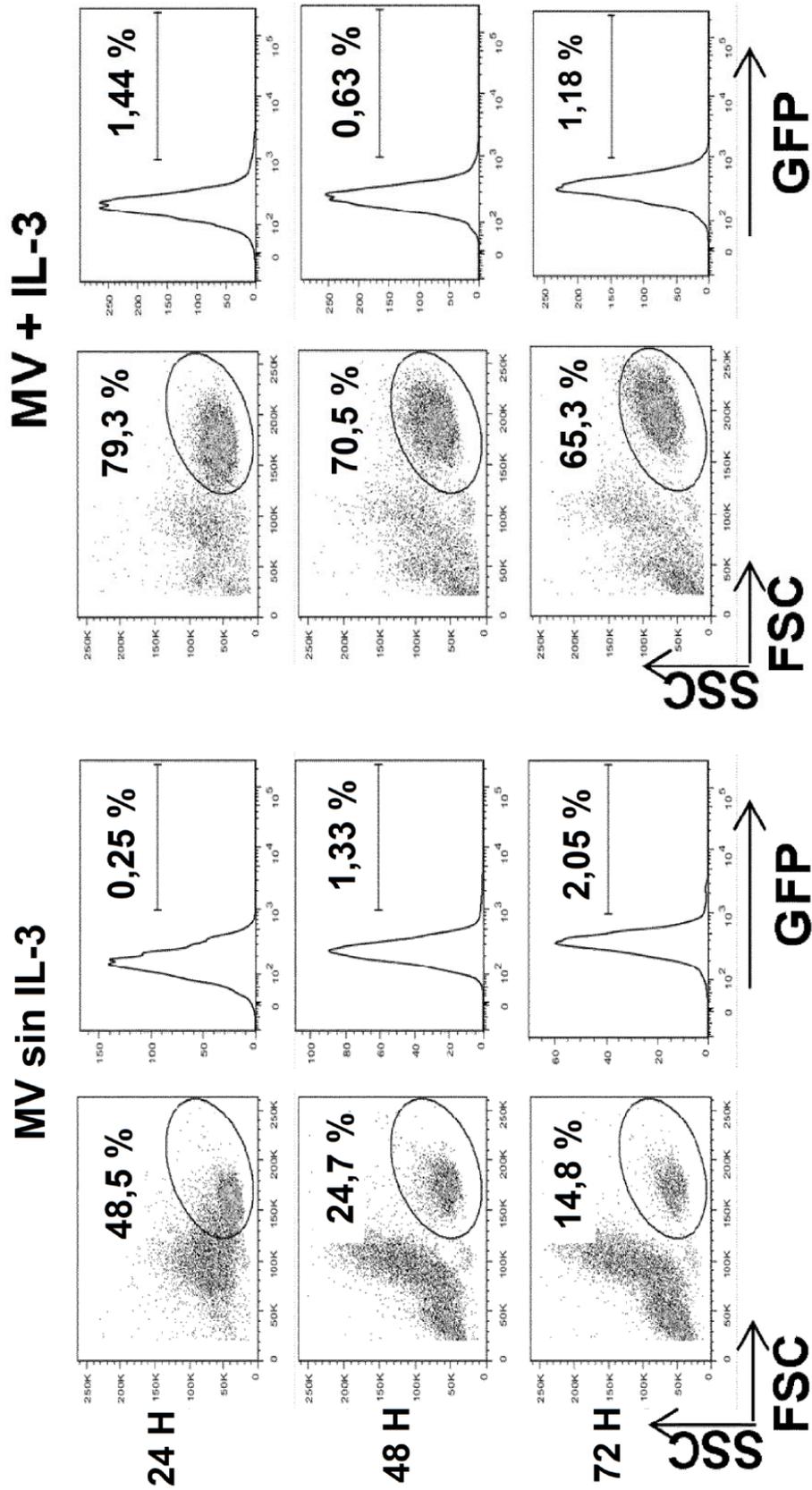


Figura 11C

D

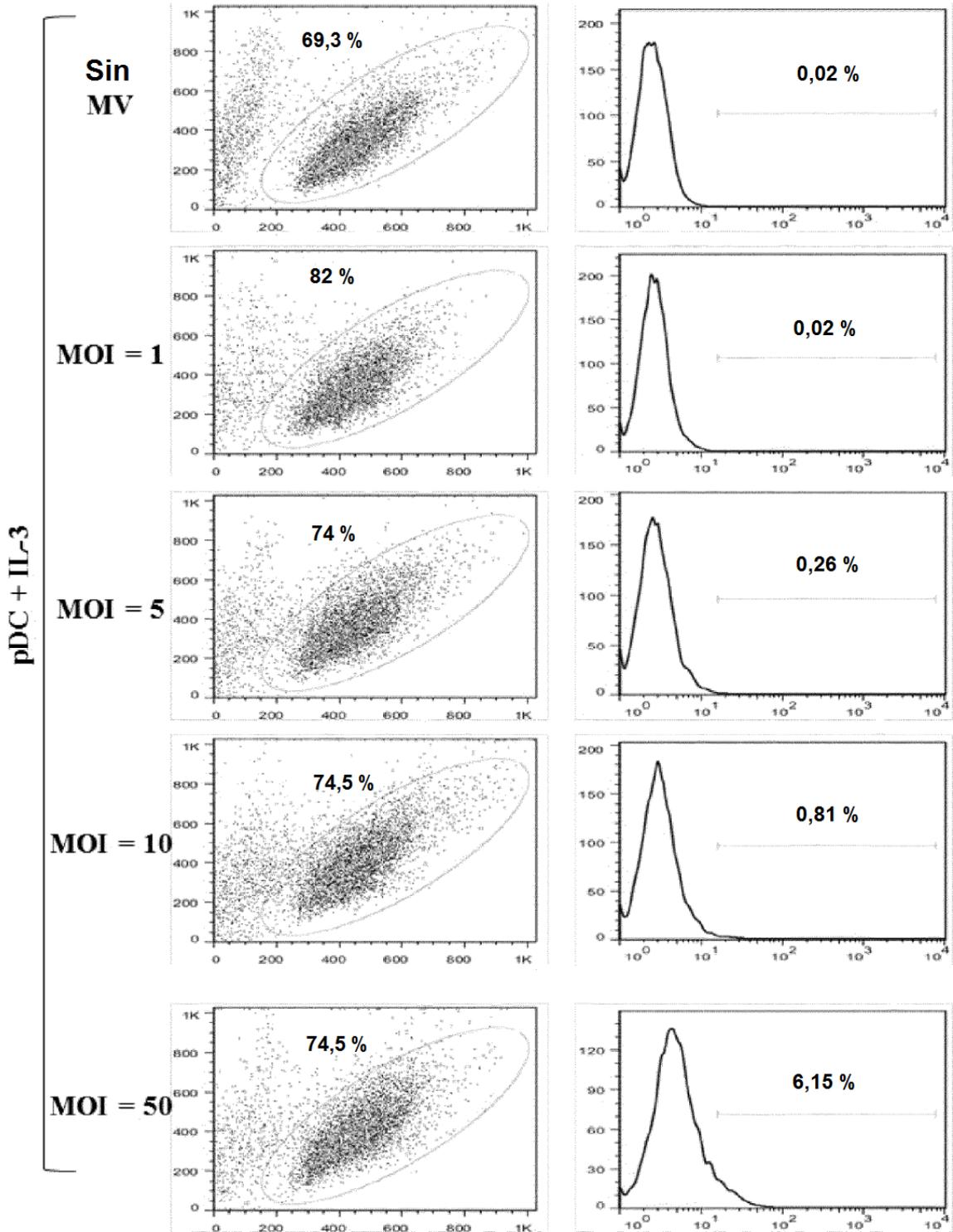


Figura 11D

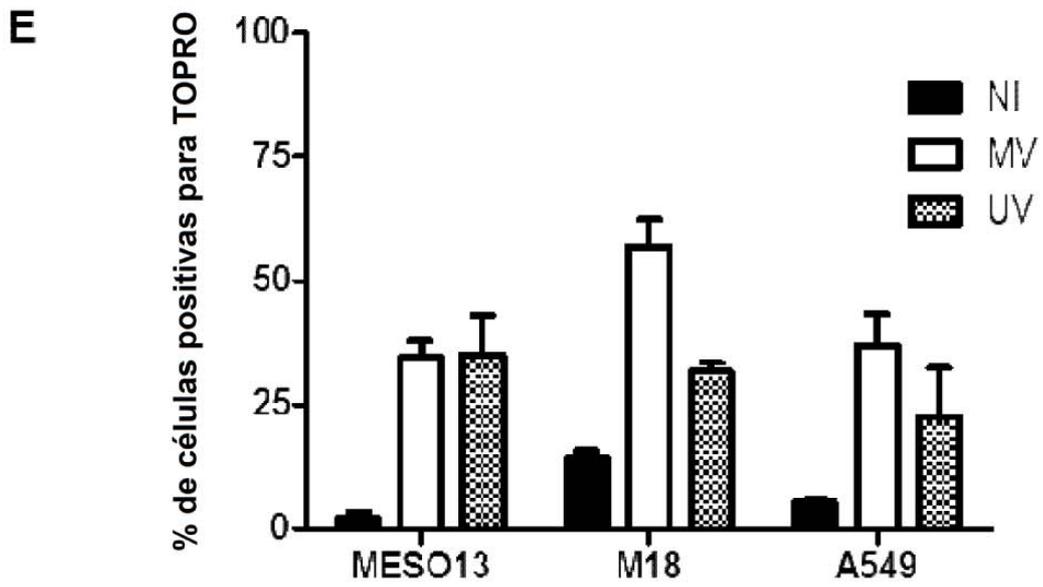


Figura 11E

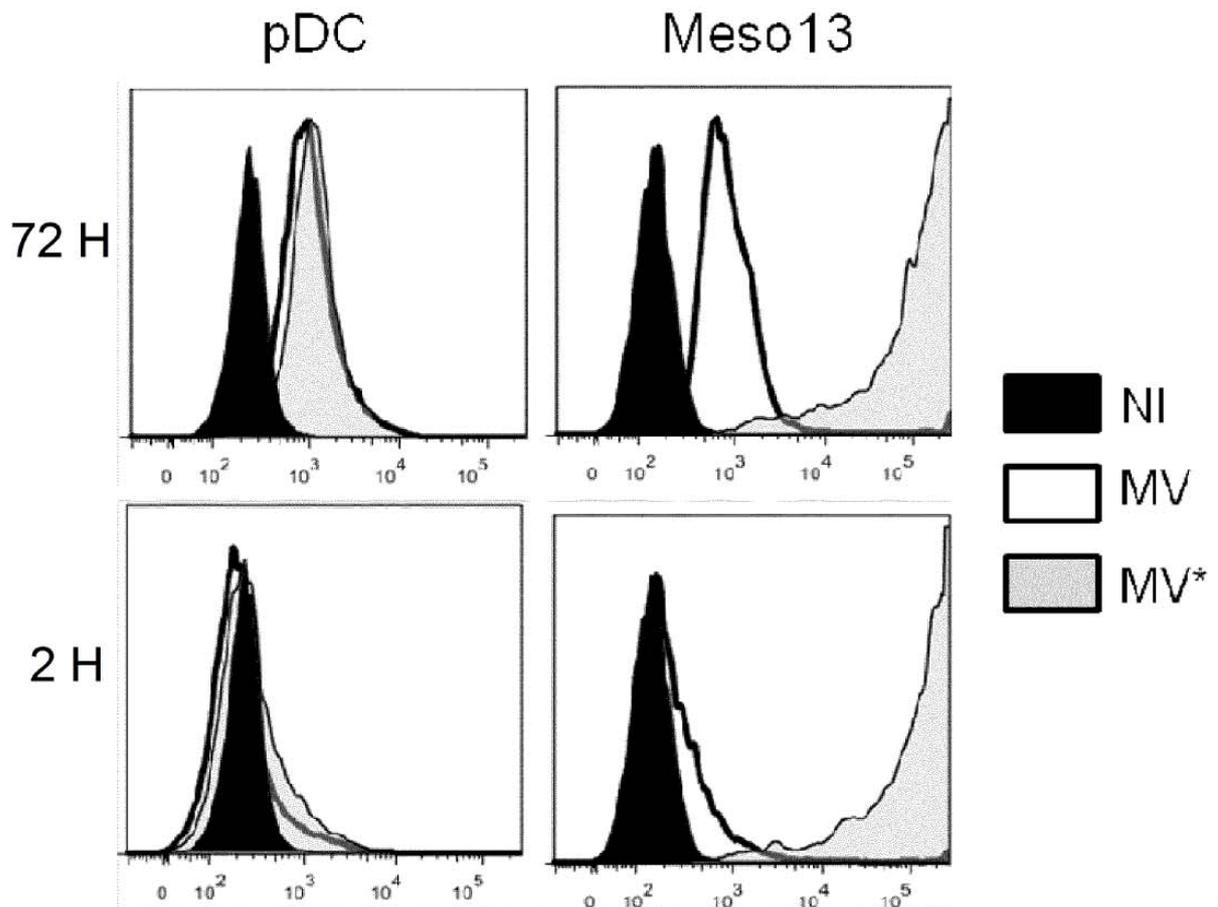


Figura 12

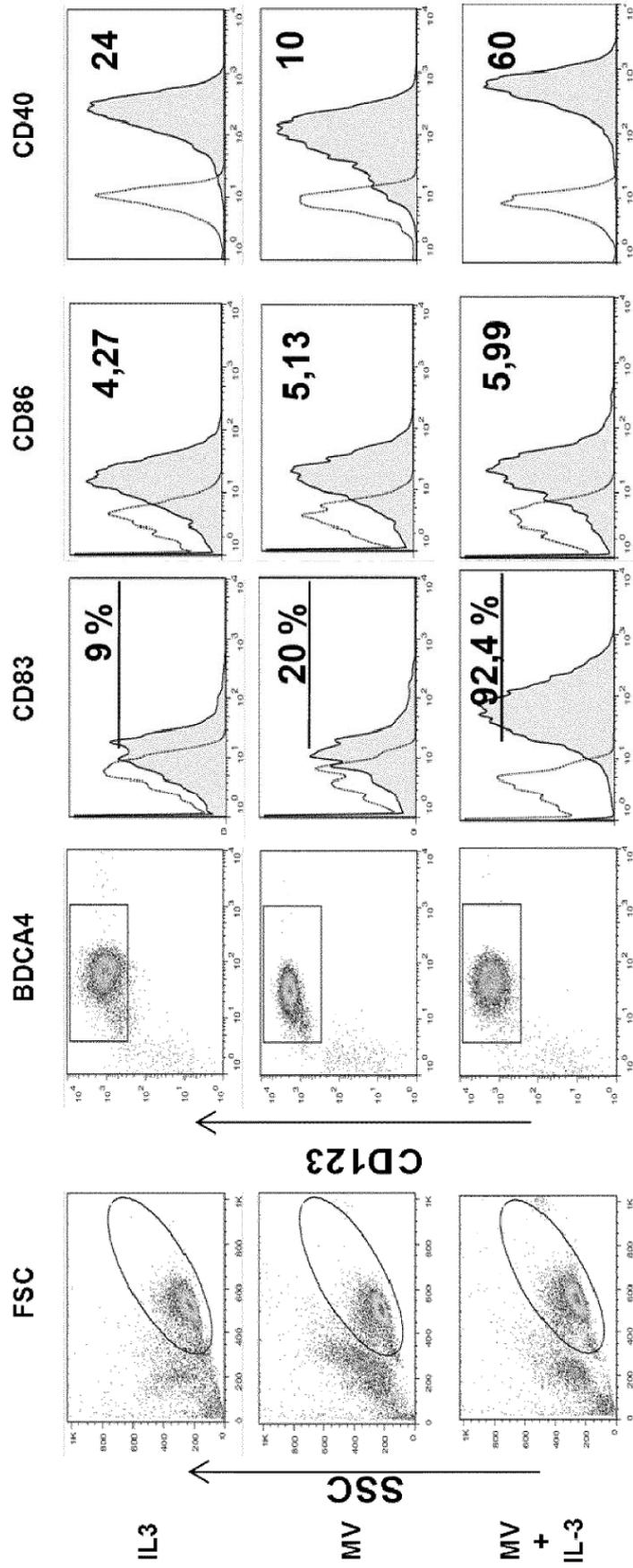


Figura 13 A (primera parte)

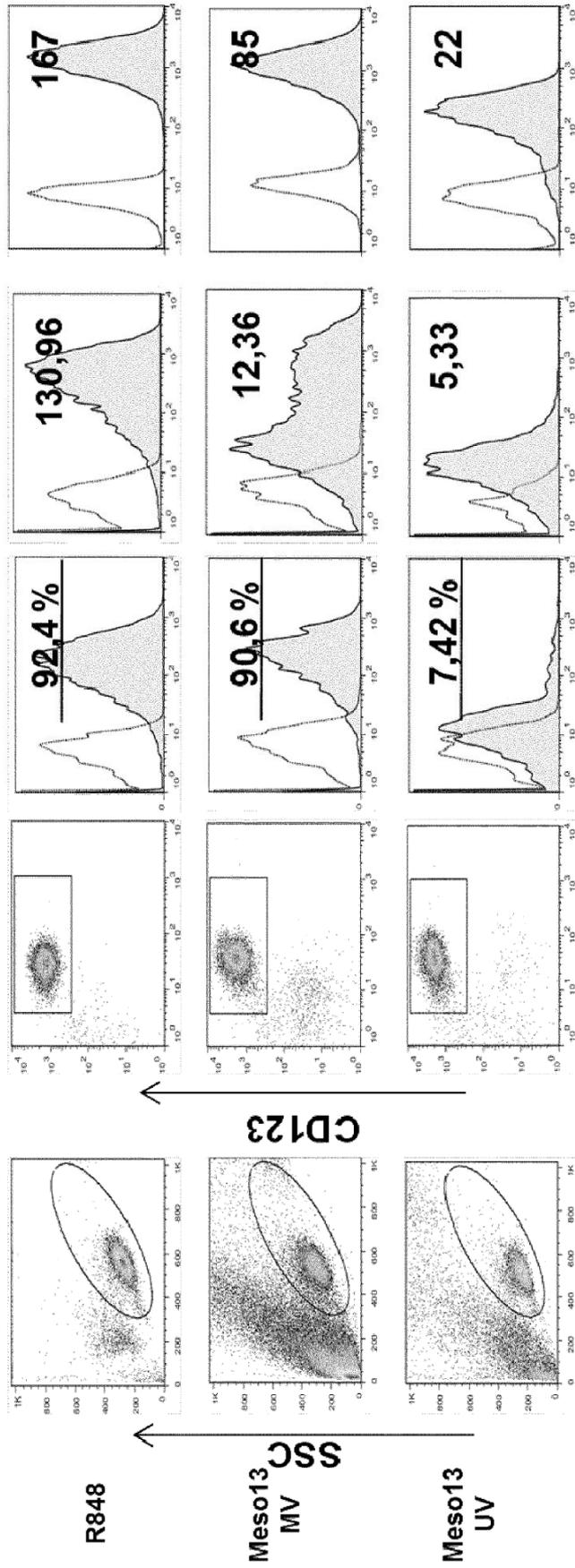


Figura 13 A (segunda parte)

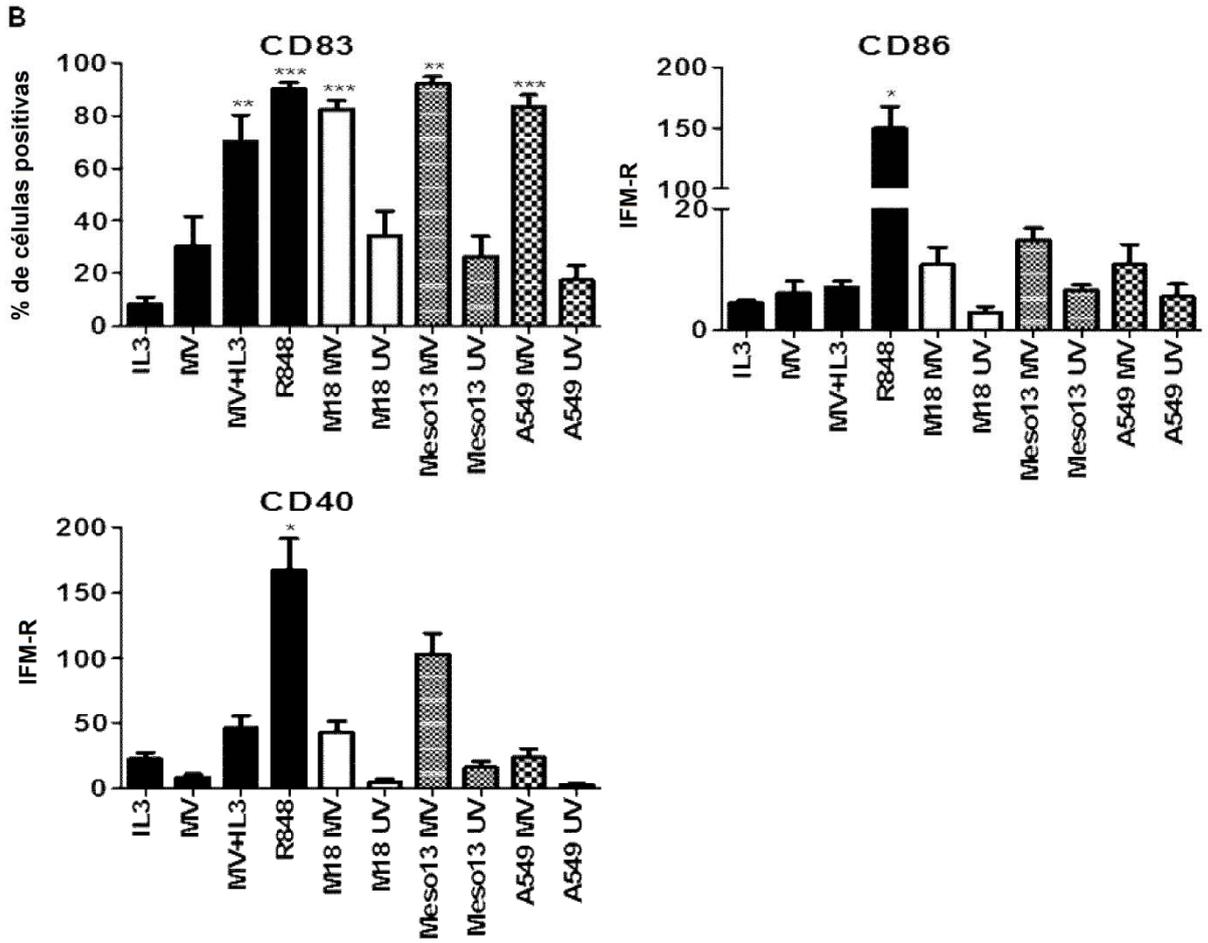


Figura 13B

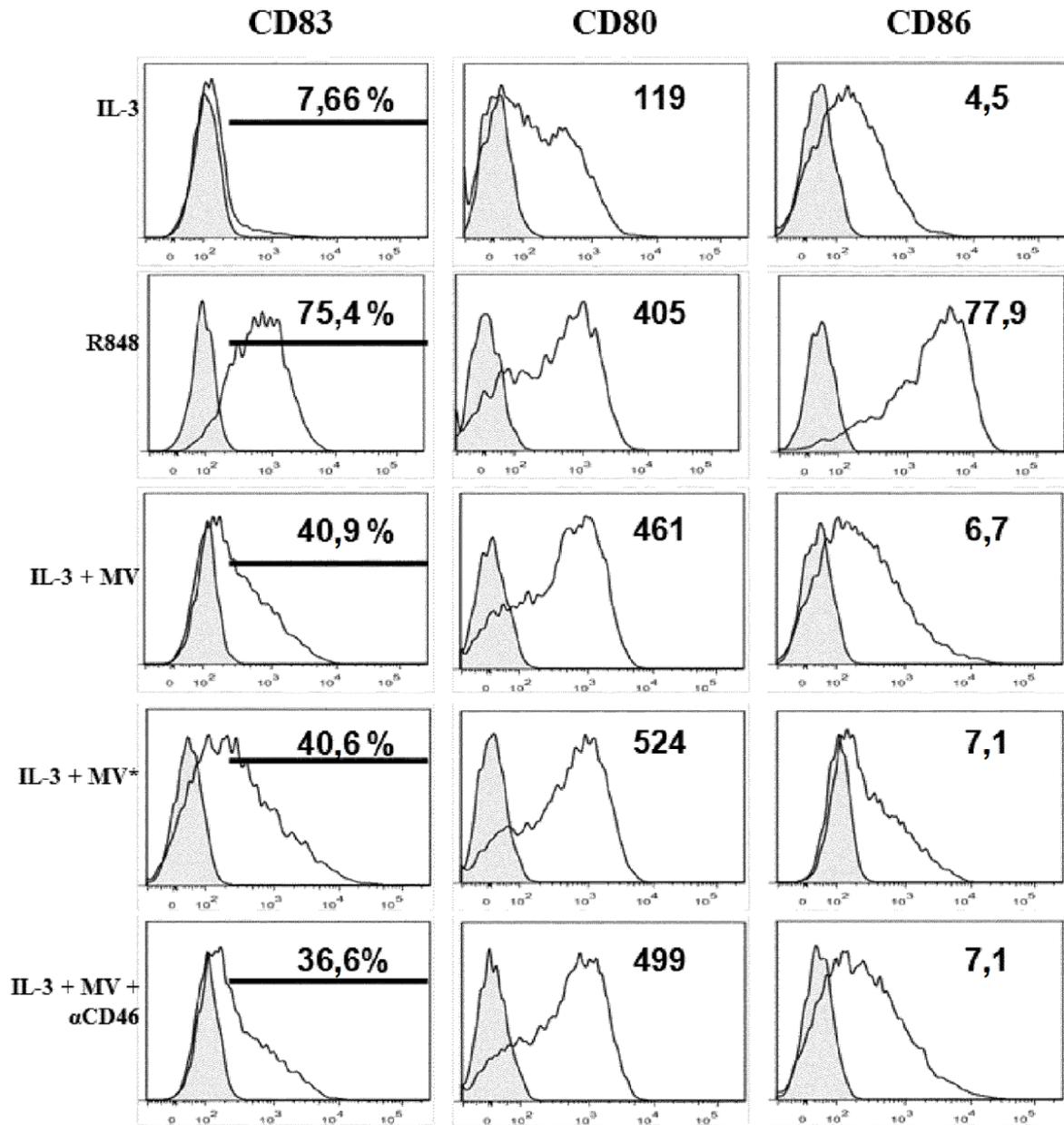


Figura 14A

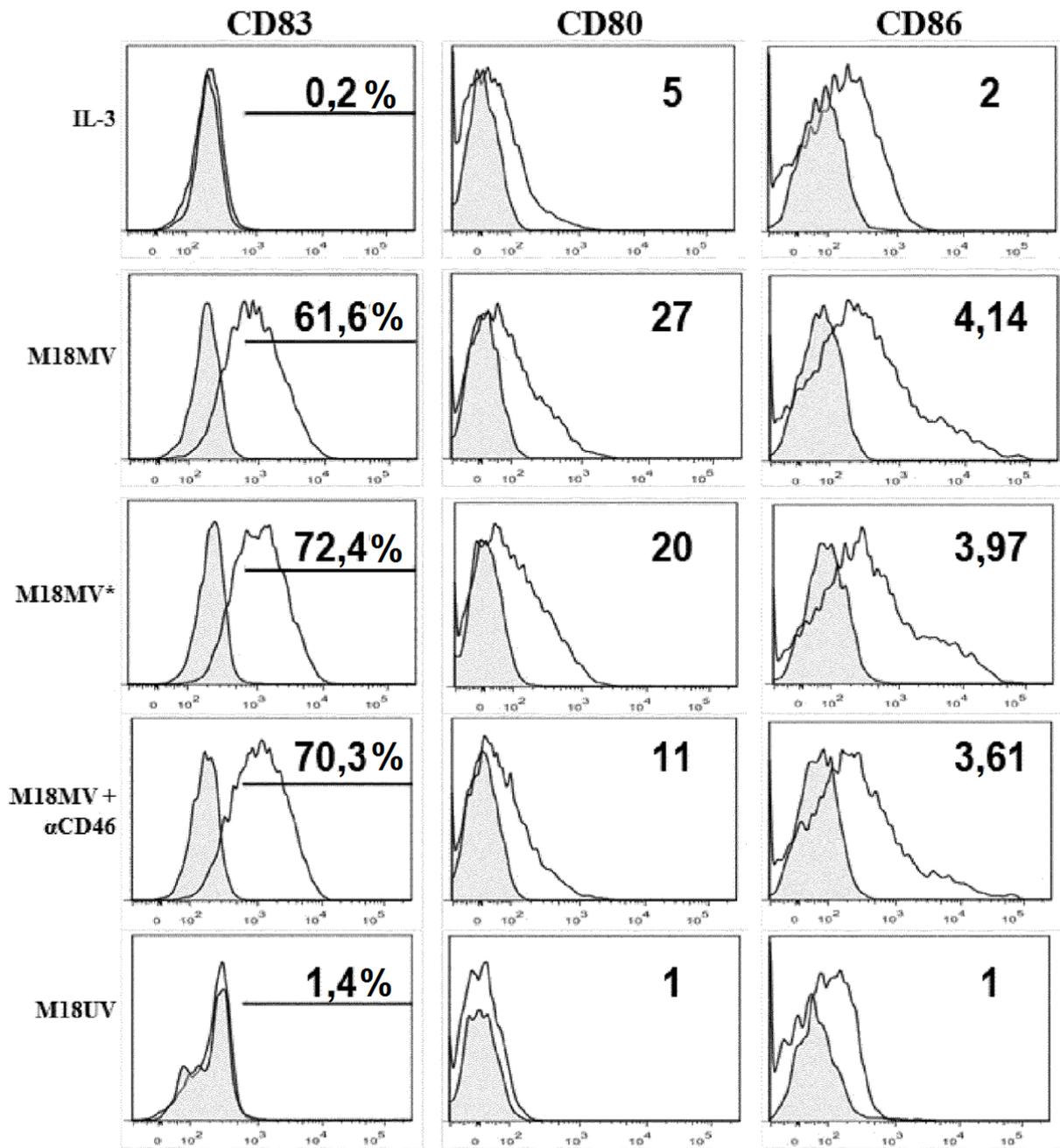


Figura 14B

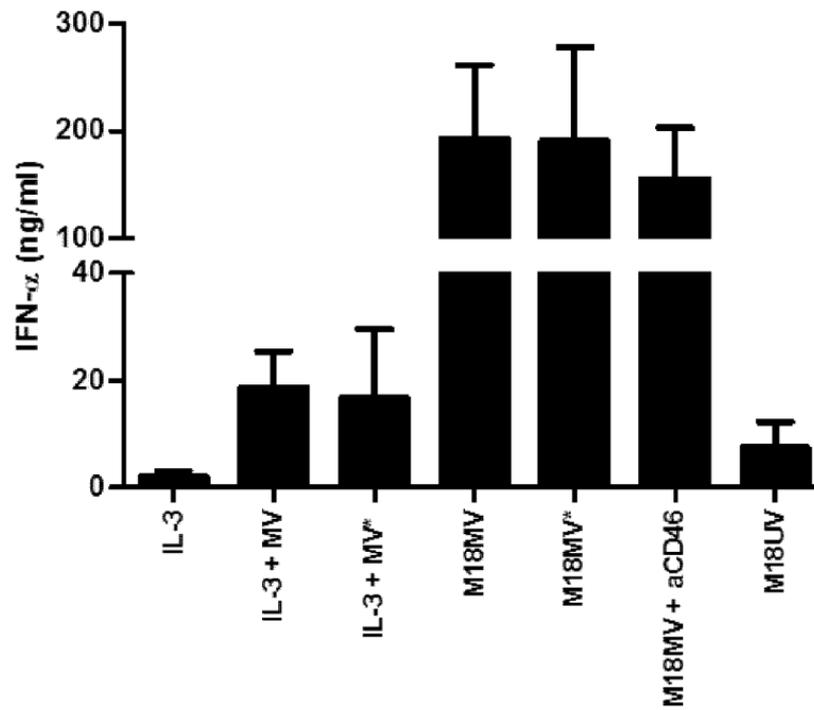


Figura 14C

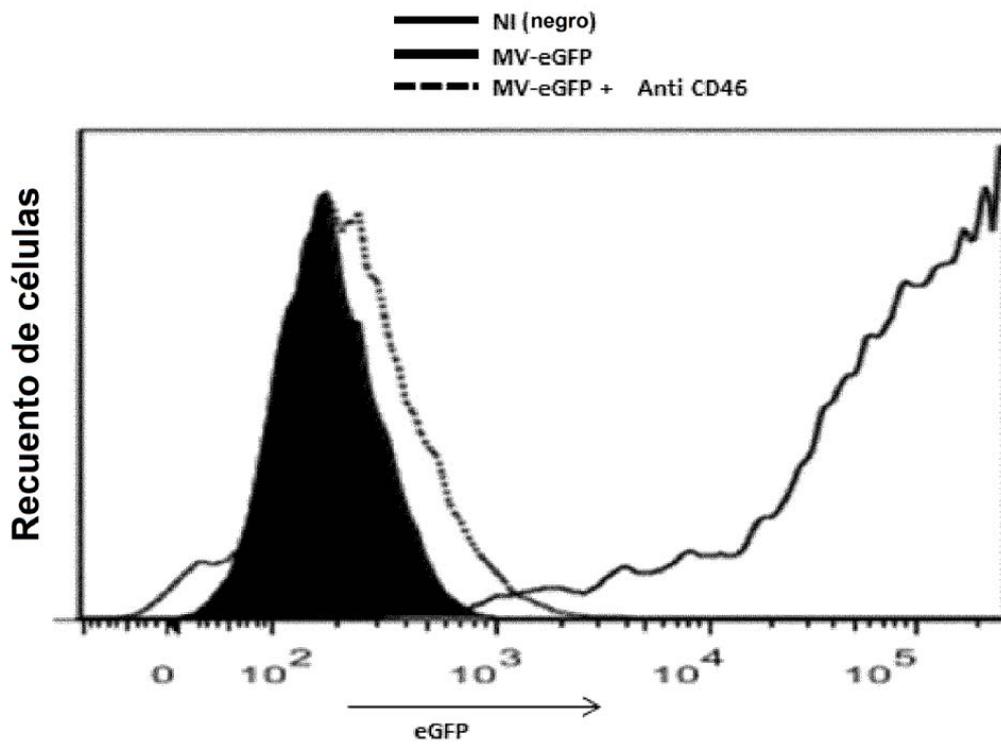


Figura 14D

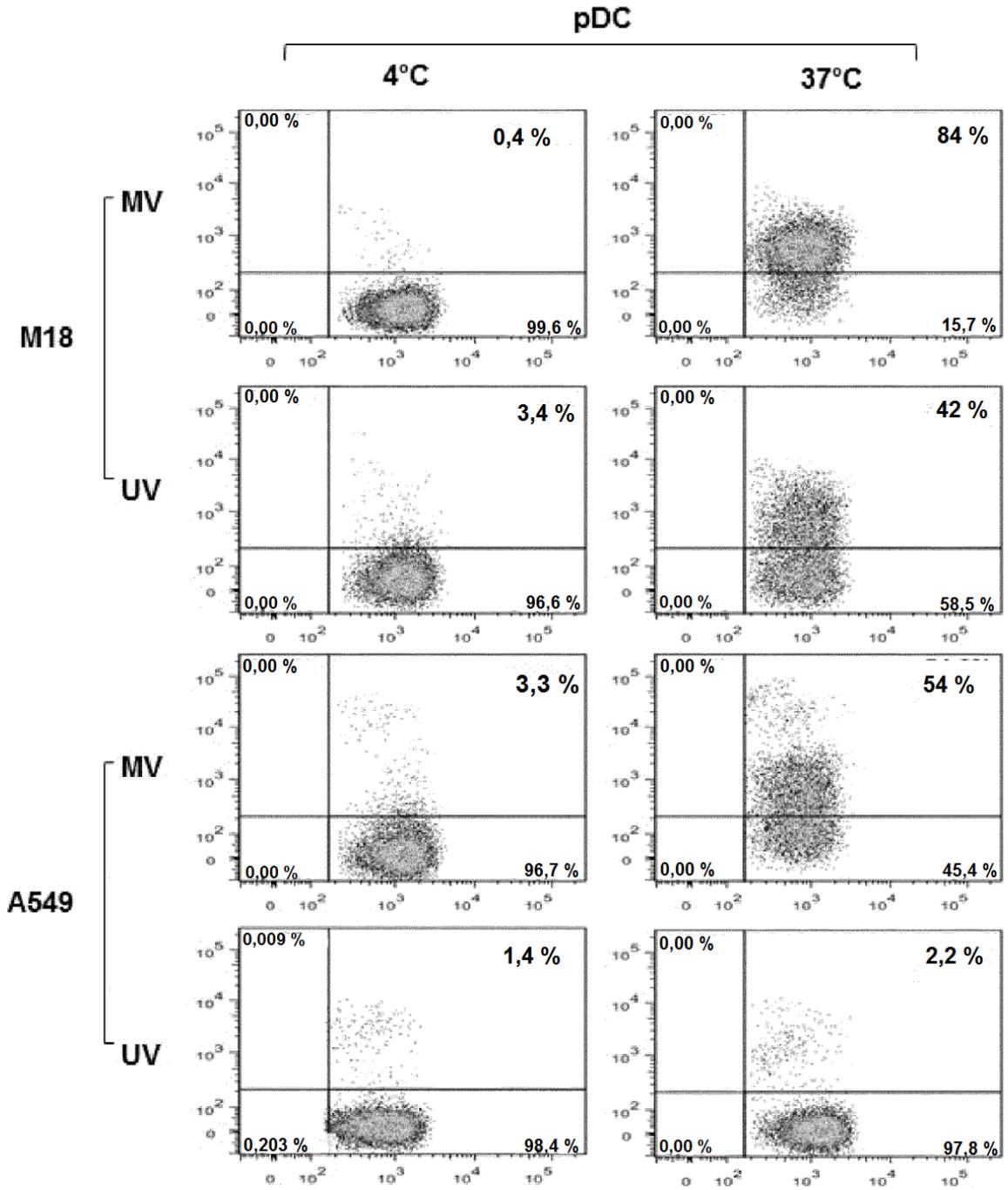


Figura 15A

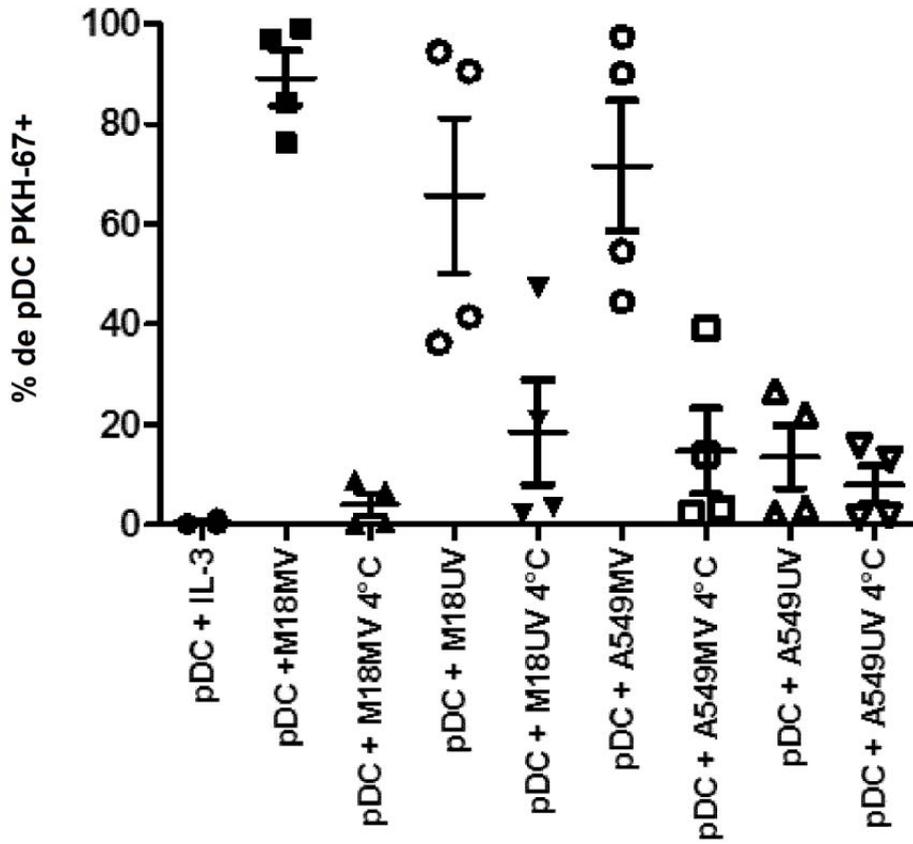


Figura 15B

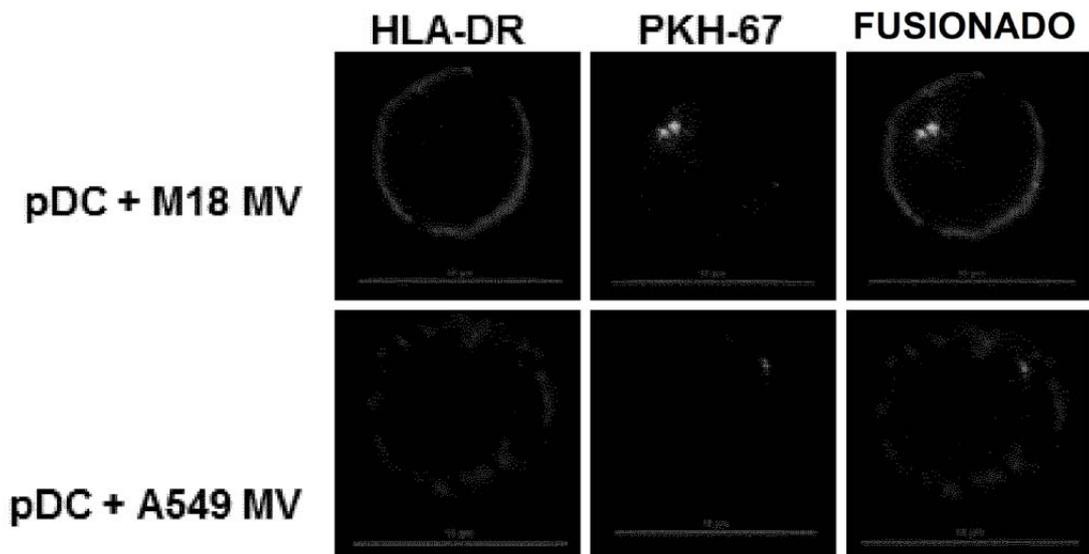


Figura 15C

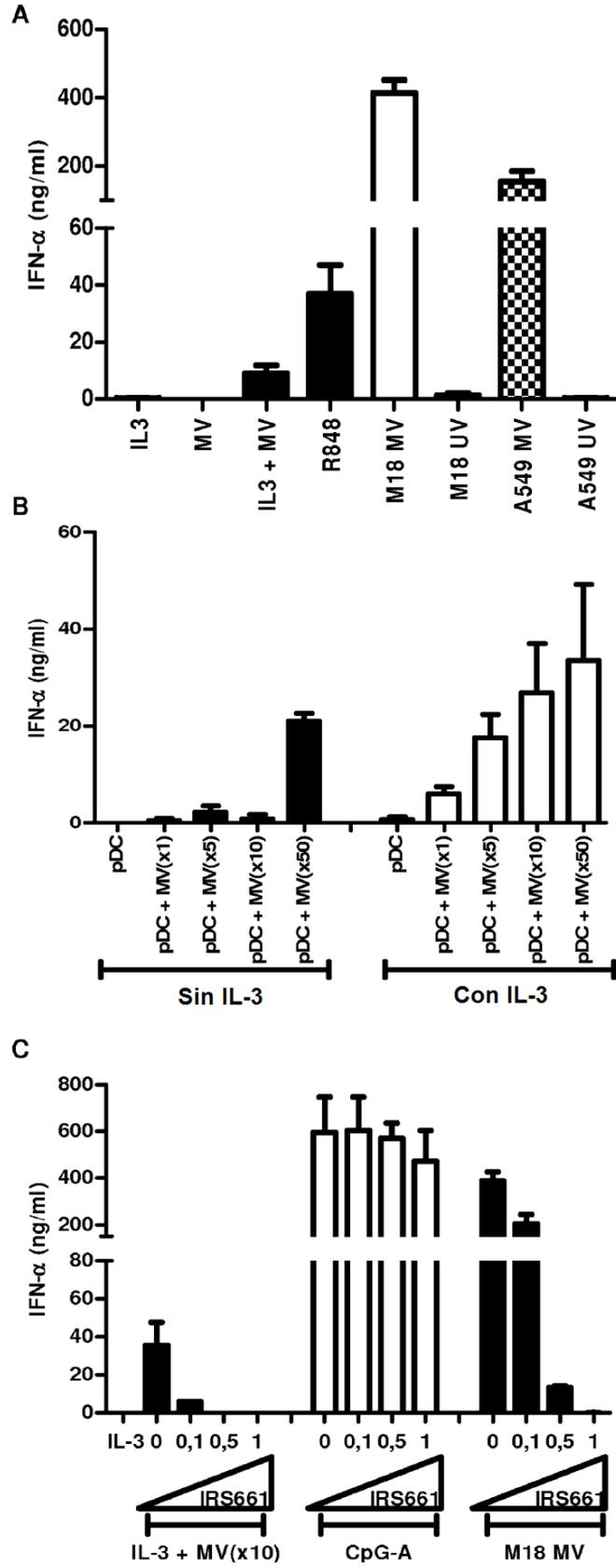


Figura 16

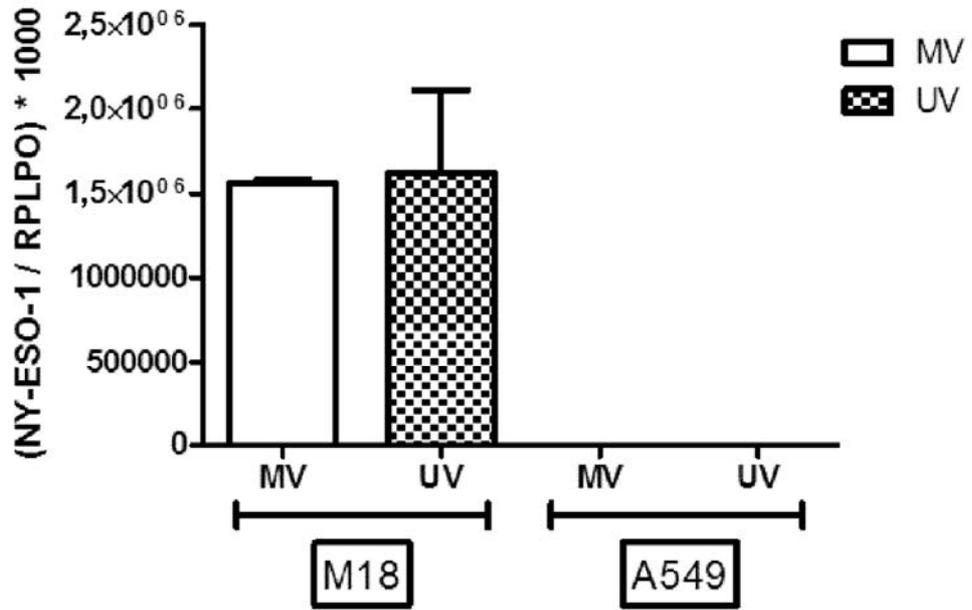


Figura 17A

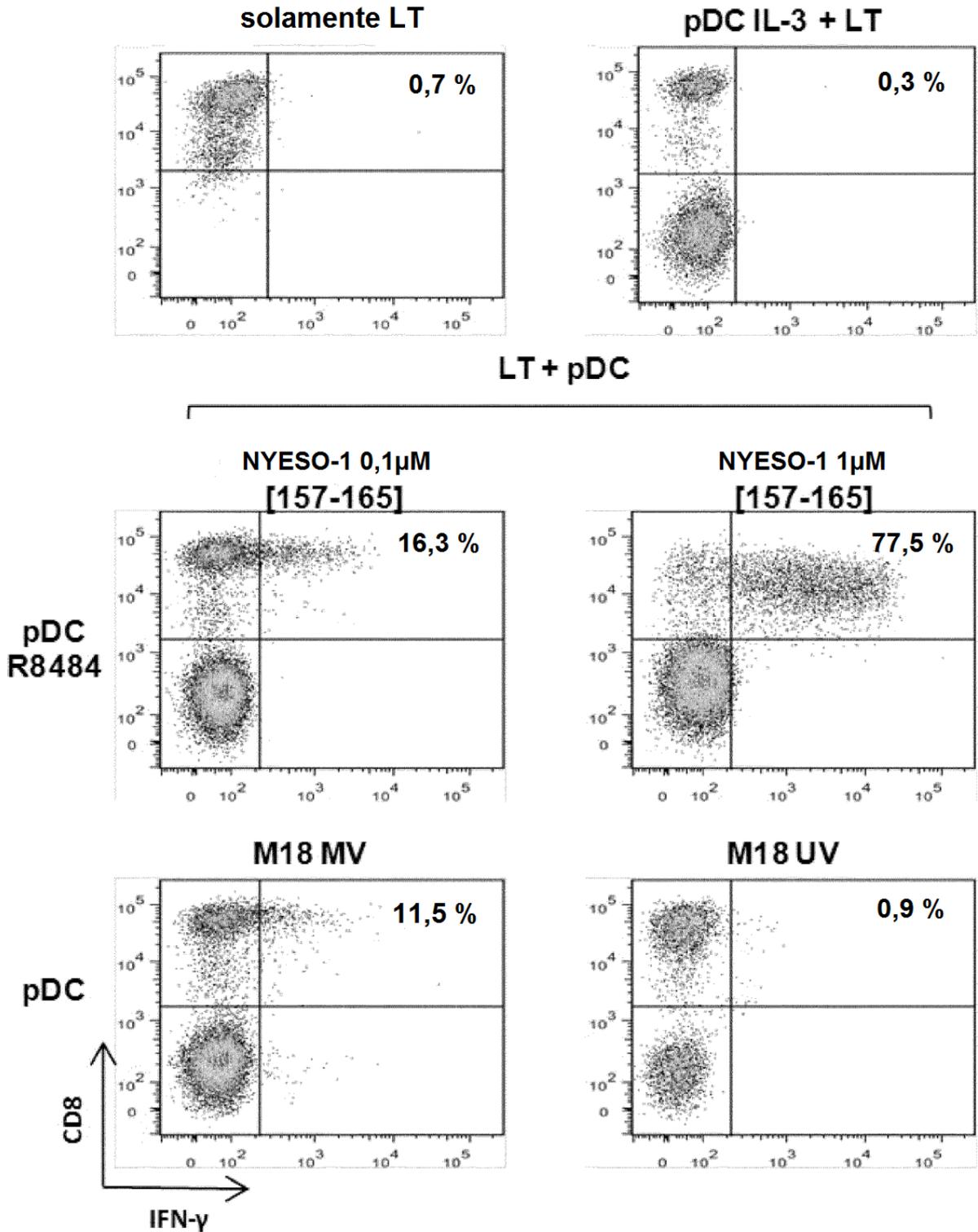


Figura 17B

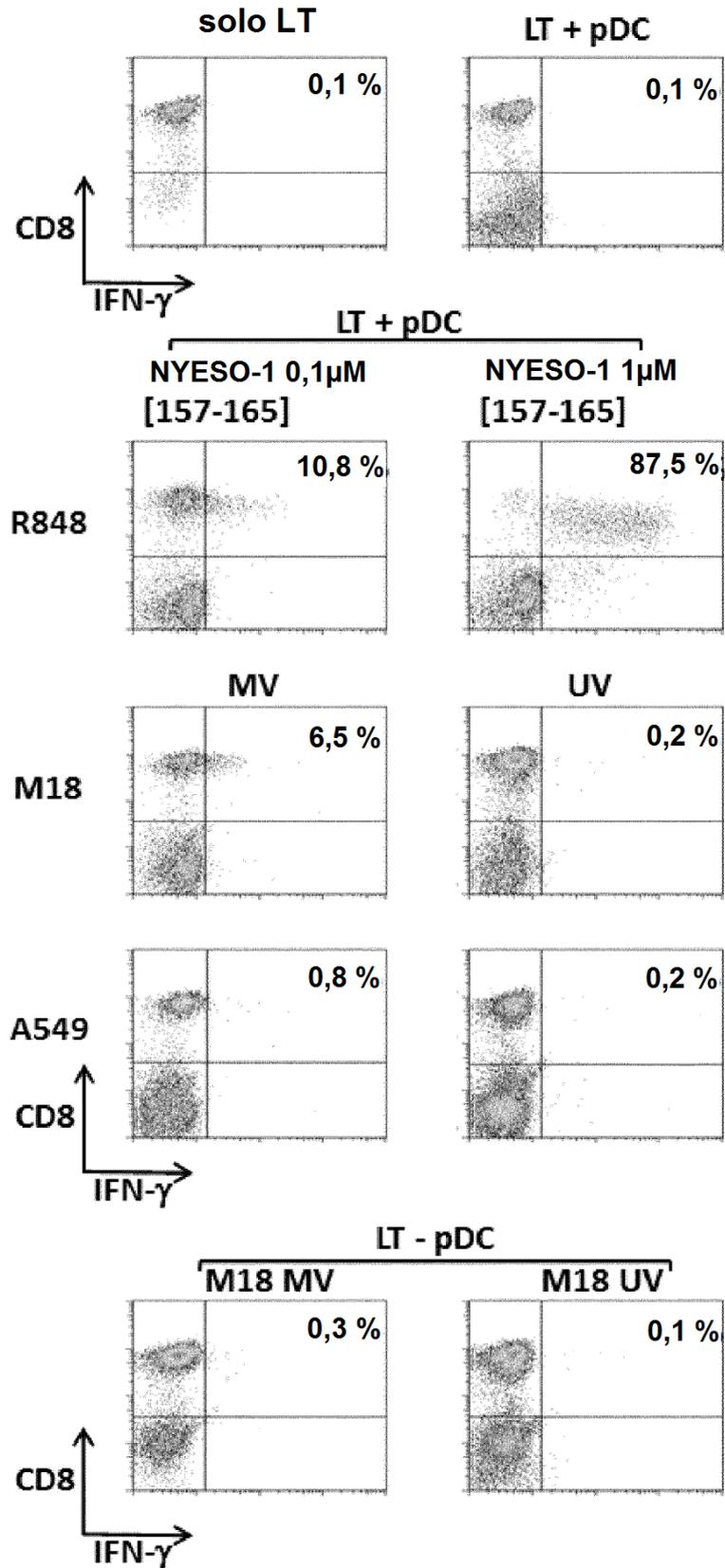


Figura 17C

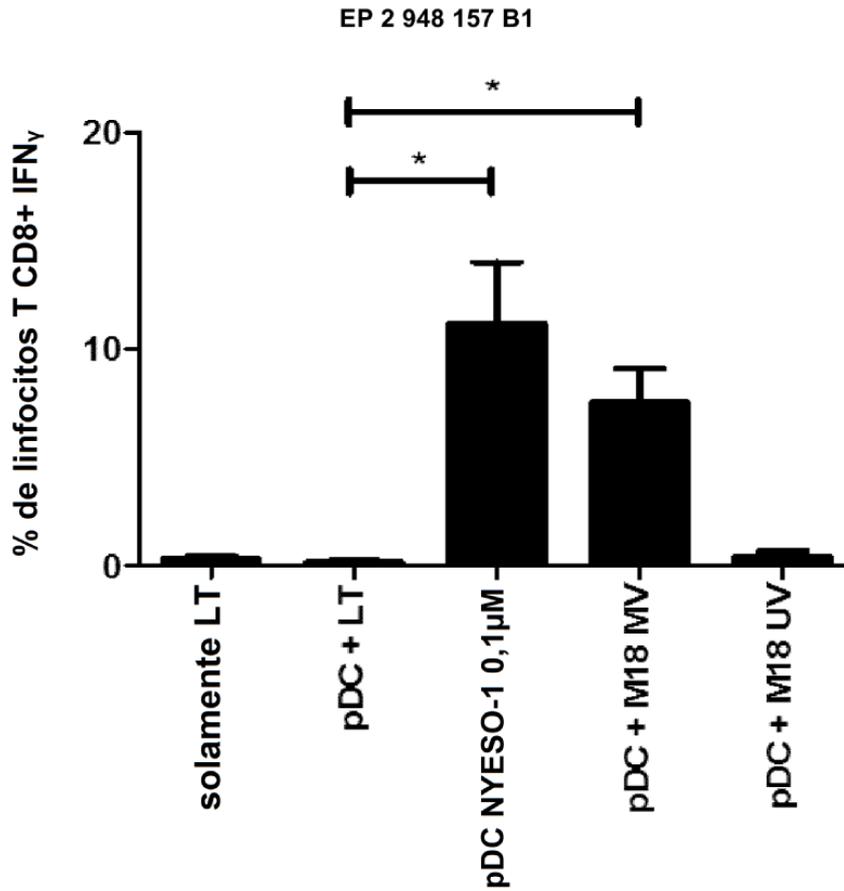


Figura 17D

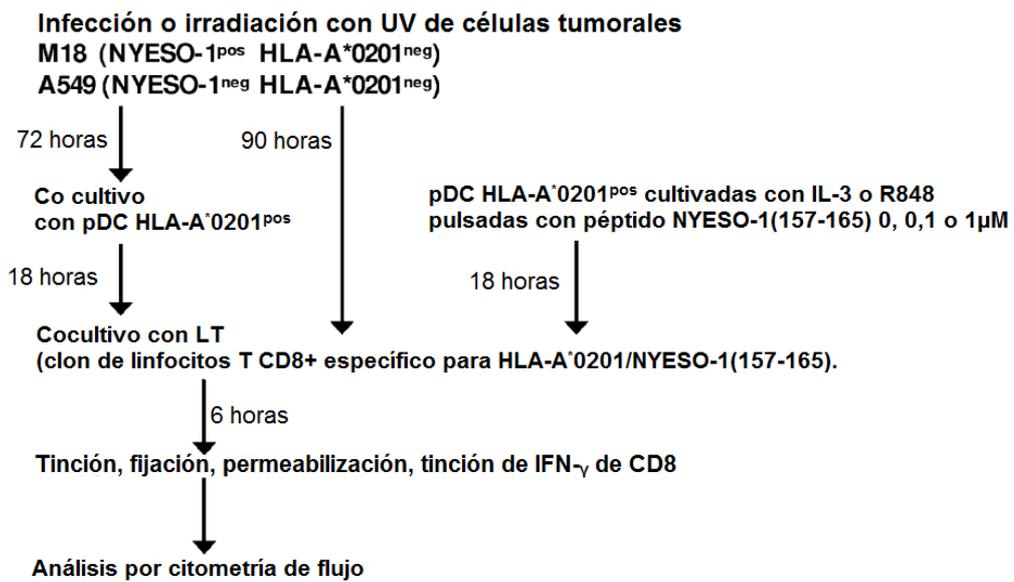


Figura 18

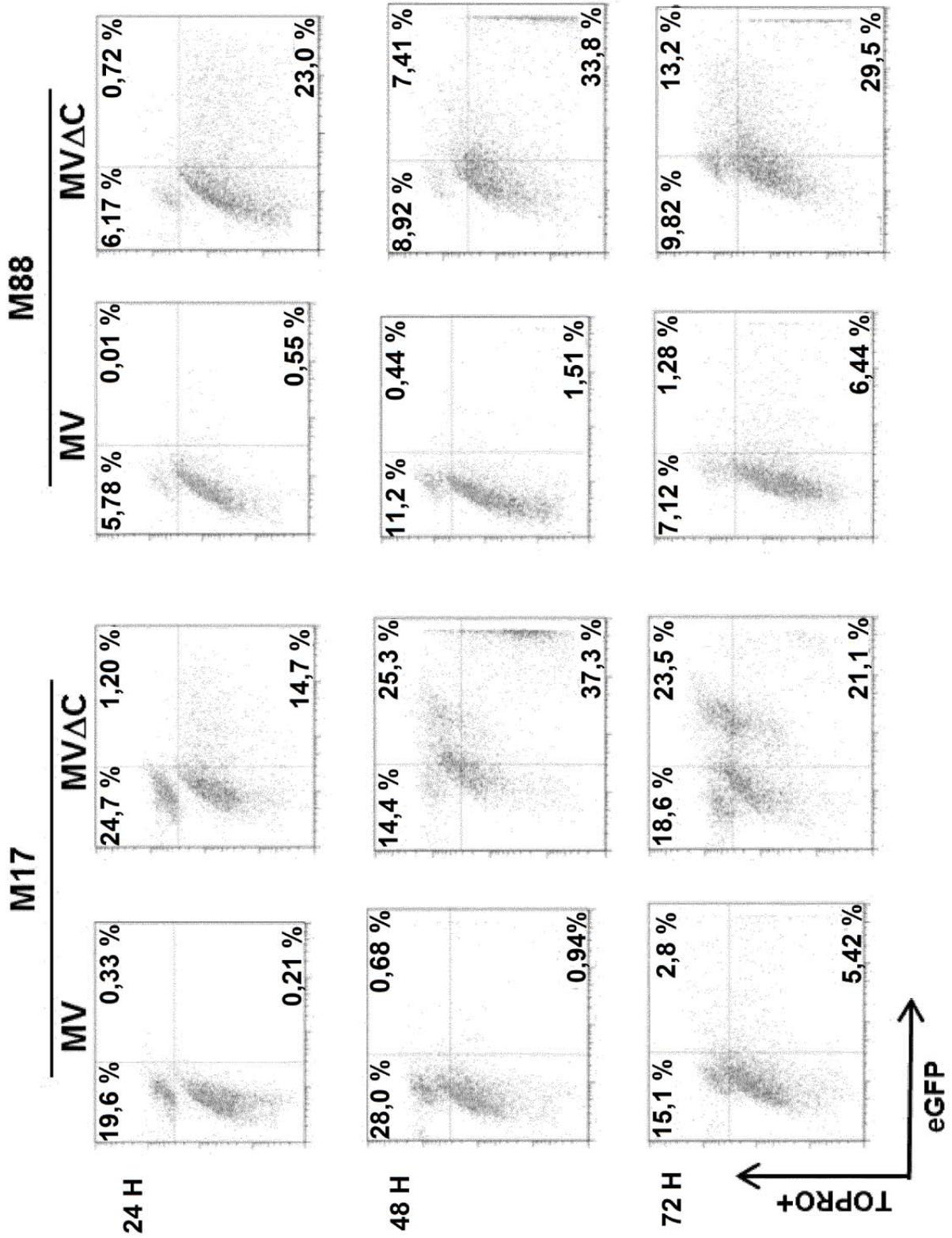


Figura 19A

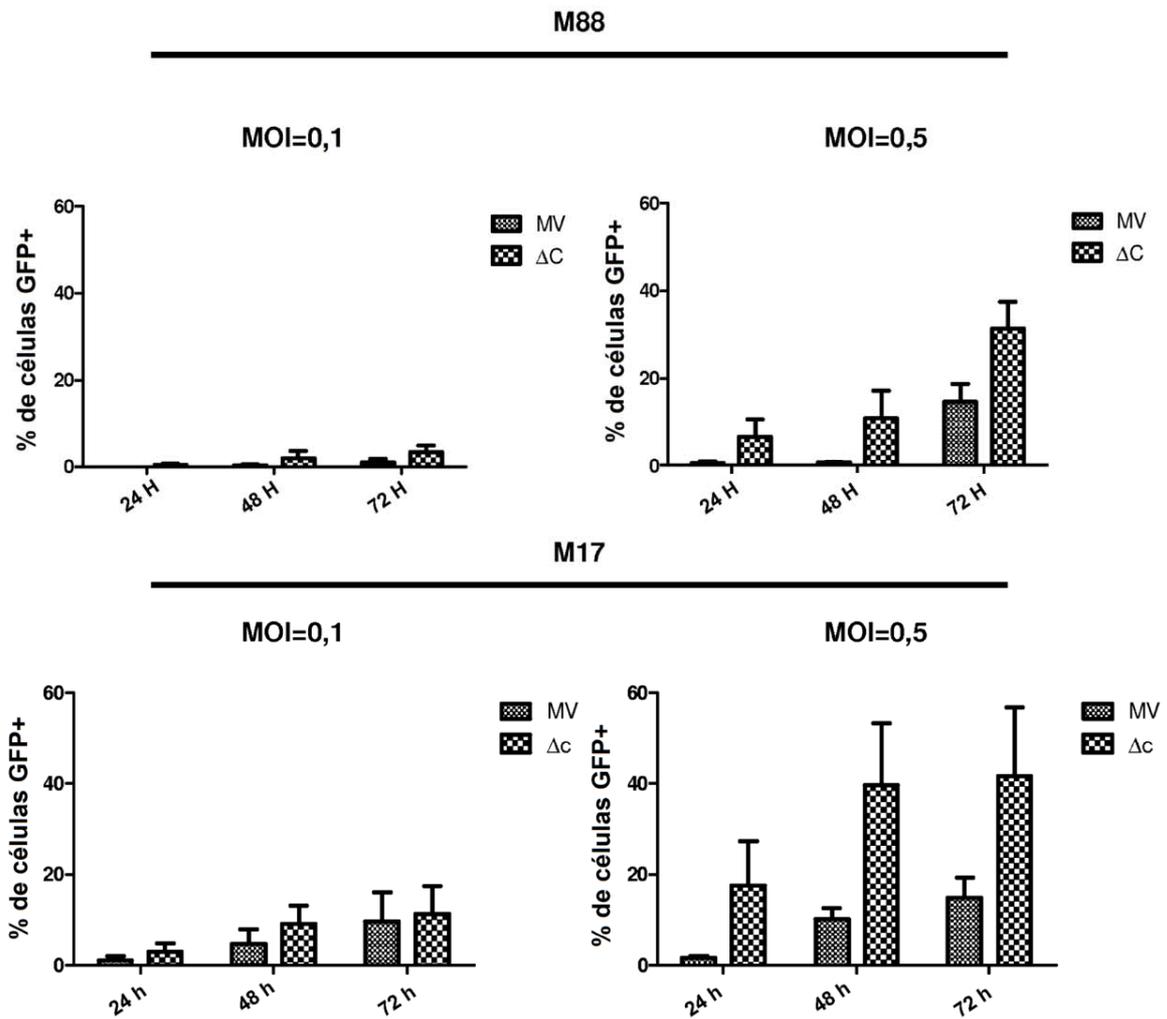


Figura 19B

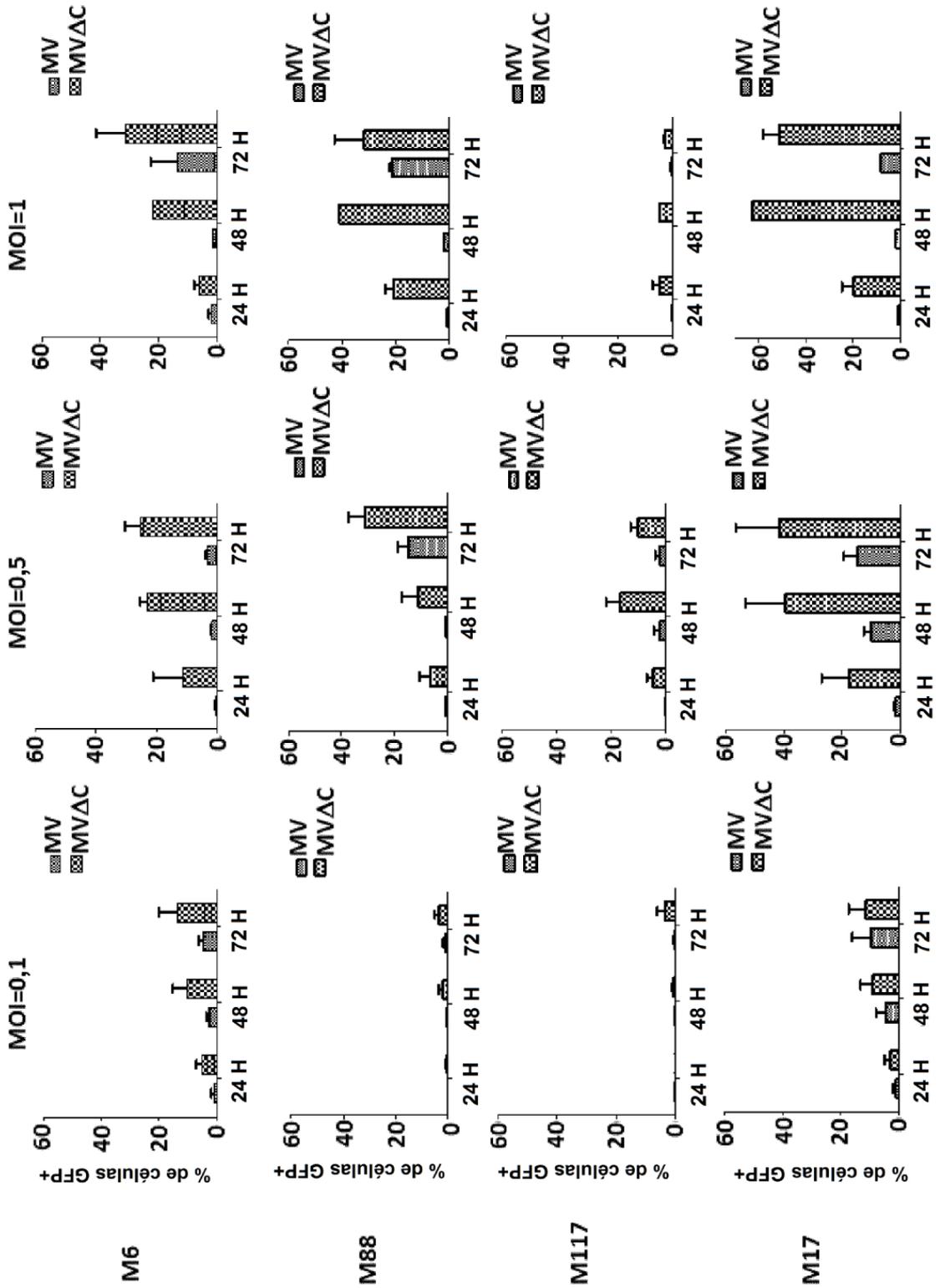


Figura 20

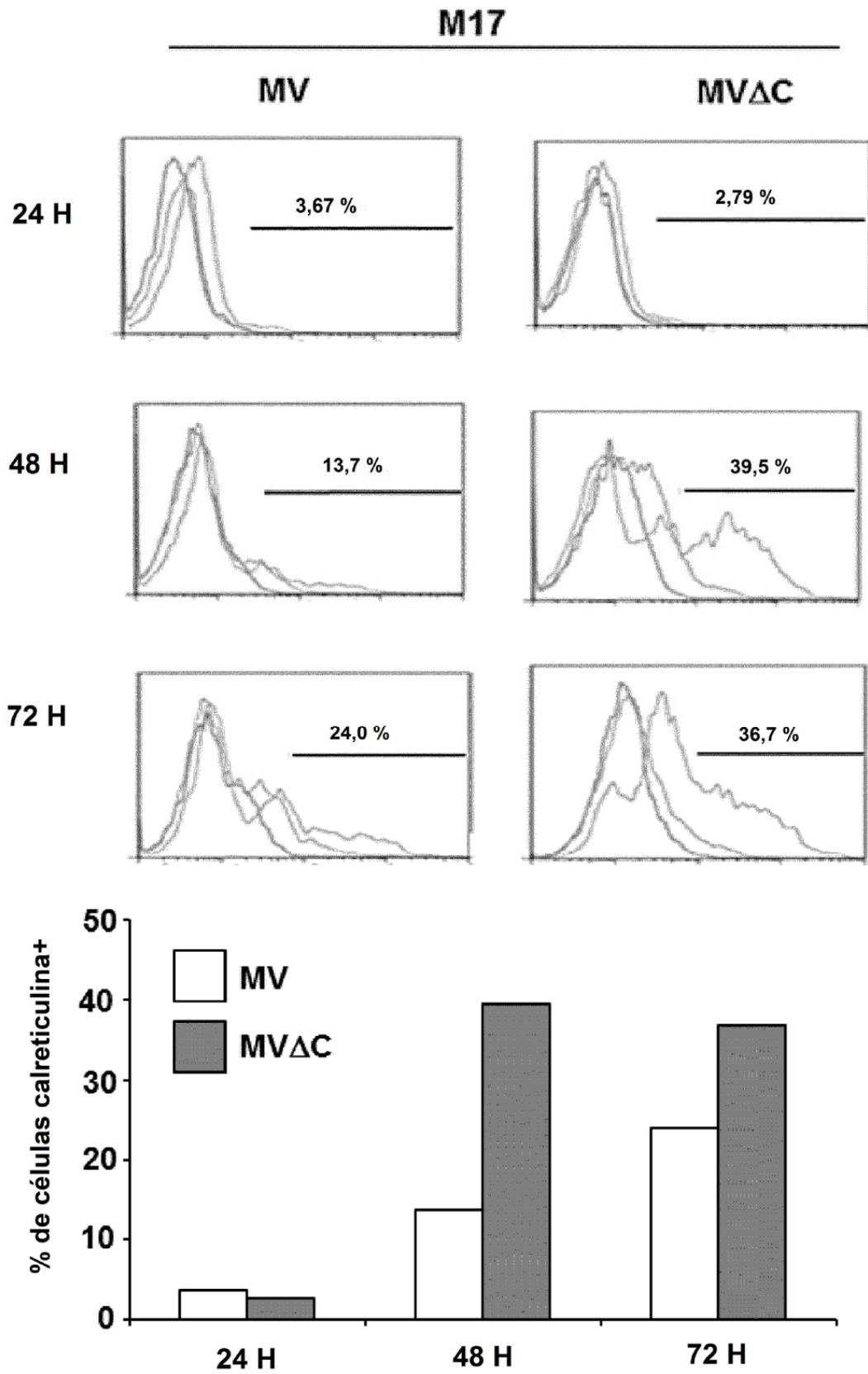


Figura 21A

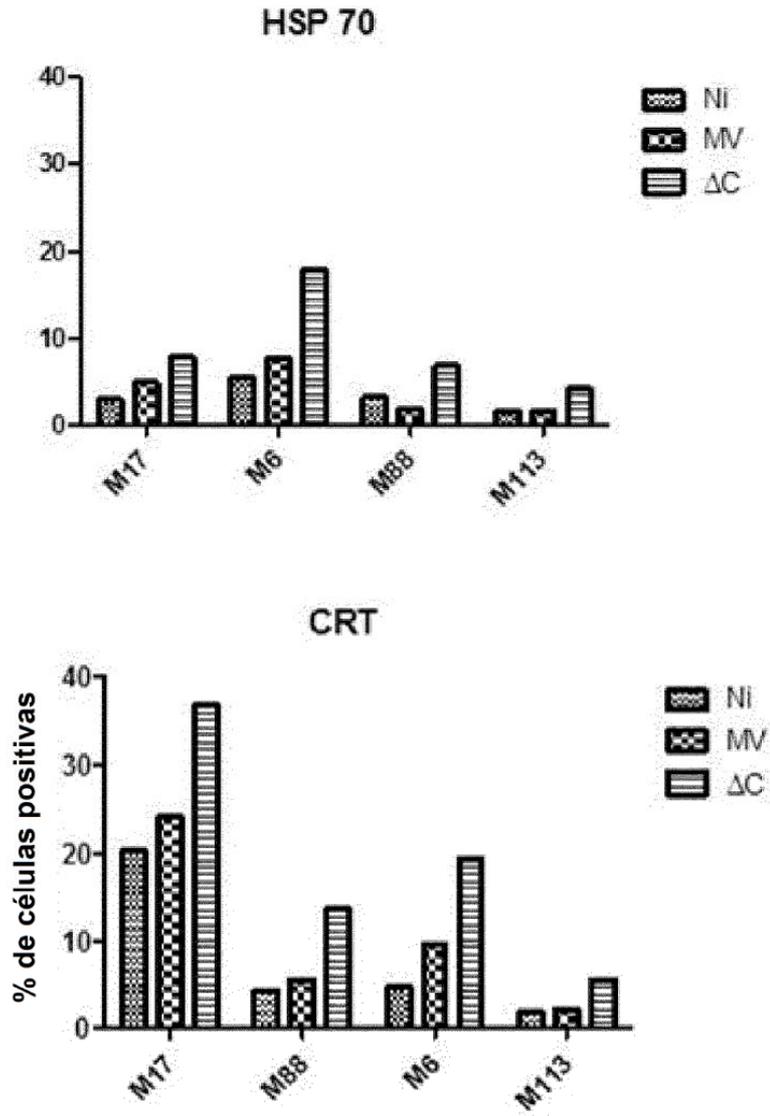


Figura 21B

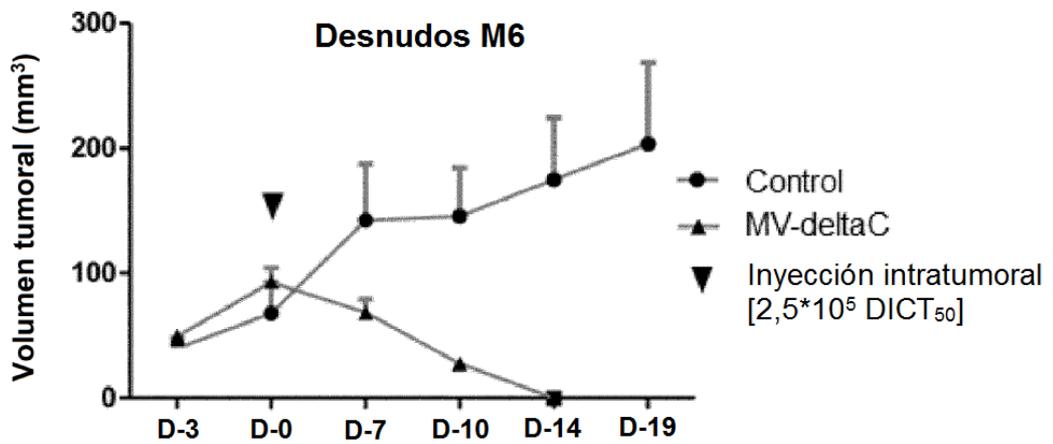


Figura 22

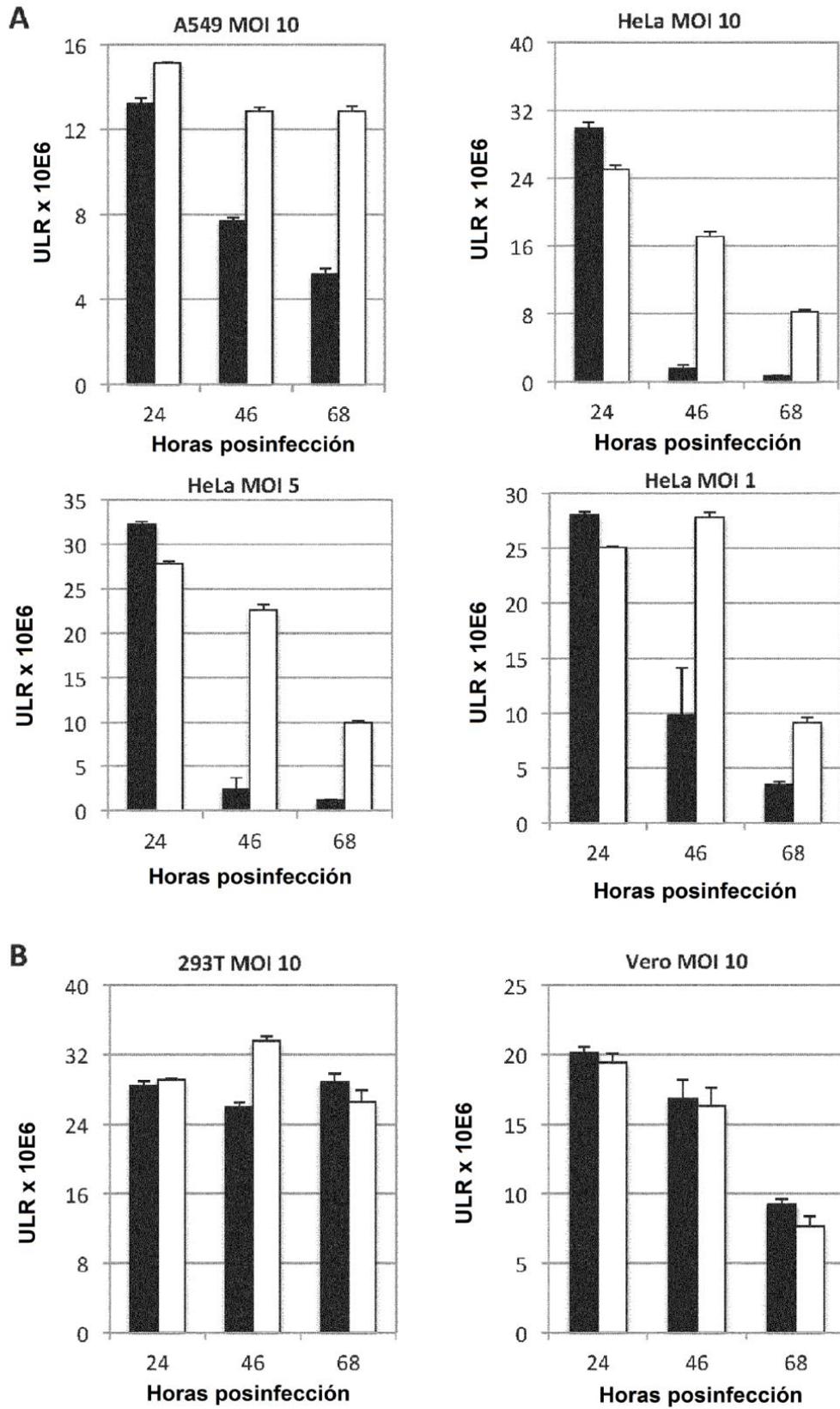


Figura 23

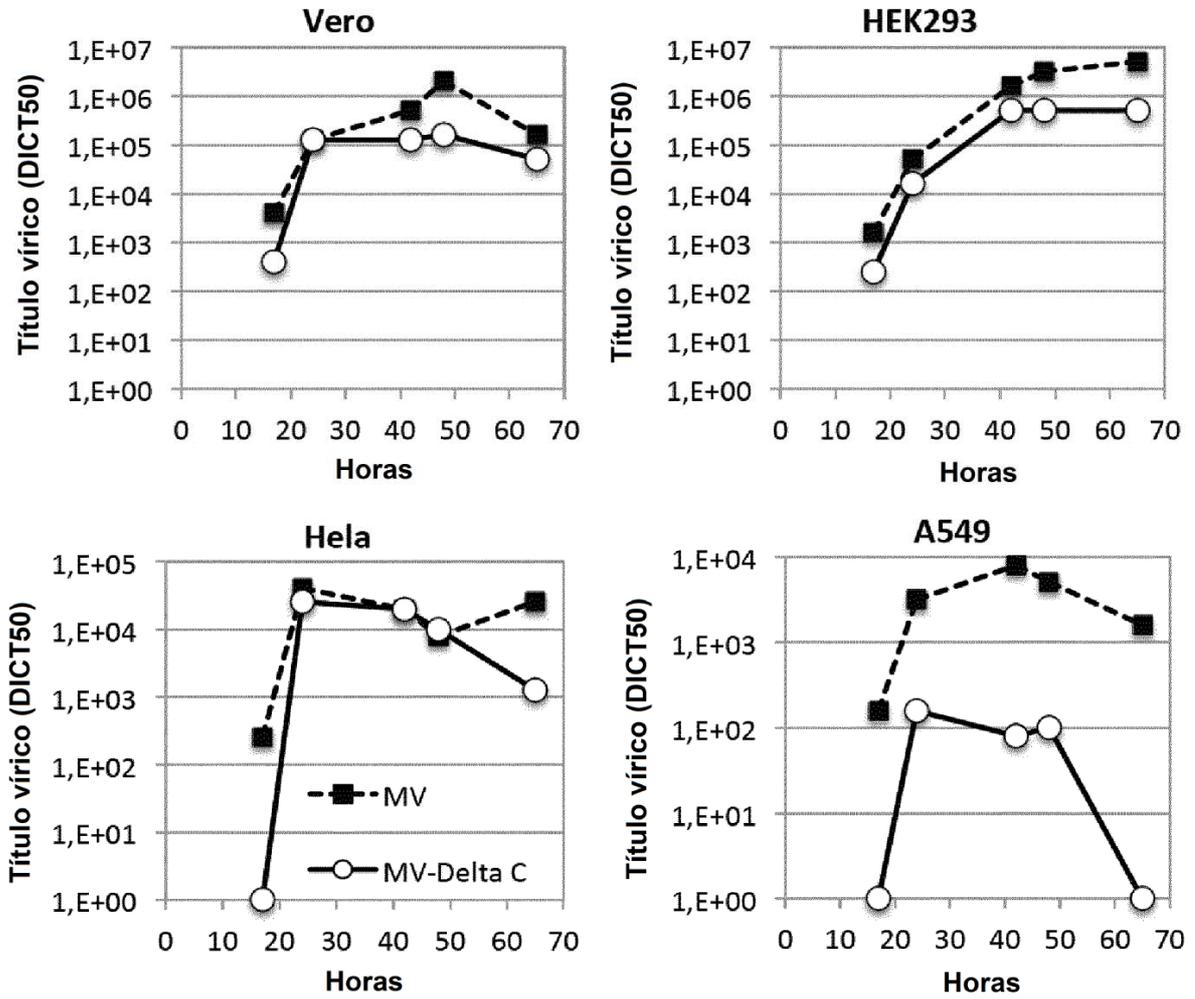


Figura 24