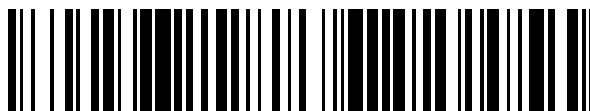


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 708 755**

51 Int. Cl.:

A61K 35/76 (2015.01)
A61K 35/768 (2015.01)
C07K 14/005 (2006.01)
C07K 14/535 (2006.01)
C12N 15/86 (2006.01)
C12N 7/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.09.2014** **PCT/EP2014/068619**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.03.2015** **WO15032755**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.09.2014** **E 14761317 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.11.2018** **EP 3041490**

54 Título: **Composiciones que presentan un virus de la enfermedad de Newcastle atenuado y métodos de uso para el tratamiento de la neoplasia**

30 Prioridad:

03.09.2013 US 201361873039 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.04.2019

73 Titular/es:

MEDIMMUNE LIMITED (100.0%)
Milstein Building Granta Park
Cambridge, Cambridgeshire CB21 6GH, GB

72 Inventor/es:

CHENG, XING;
CARROLL, DANIELLE;
MCCOURT, MATTHEW;
GALINSKI, MARK y
JIN, HONG

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 708 755 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

Composiciones que presentan un virus de la enfermedad de Newcastle atenuado y métodos de uso para el tratamiento de la neoplasia

Antecedentes

- 5 El virus de la enfermedad de Newcastle (NDV) es un virus aviar que causa una enfermedad contagiosa de las aves que afecta a muchas especies de aves domésticas y silvestres. La exposición de humanos a aves infectadas (por ejemplo, en plantas procesadoras de aves de corral) puede causar conjuntivitis leve y síntomas similares a la influenza, pero el NDV no representa ningún riesgo para la salud humana y la mayoría de las personas son seronegativas para el NDV. Según la patogenicidad viral en pollos, la patogenicidad del NDV se clasifica como alta (velogénica), media (mesogénica) o baja (lentógena) según lo determinado por el índice de patogenicidad intracerebral (ICPI). Debido a preocupaciones agrícolas, el USDA ha clasificado a los VNP mesogénicos y velogénicos con virulencia en el pollo (ICPI > 0.7) como "agentes selectos" desde 2008. La lista de toxinas y agentes selectos incluye agentes biológicos que tienen el potencial de representar una amenaza grave para la salud humana y animal, la salud de las plantas o los productos animales y vegetales.
- 10
- 15 Las formas de origen natural de NDV se han usado en estudios clínicos como un agente biológico inmunoterapéutico y viroterapéutico. El NDV se muestra prometedor como agente anticancerígeno debido a la capacidad del virus para matar selectivamente células tumorales humanas con toxicidad limitada para las células normales. Sin embargo, debido a la reclasificación de NDV como un agente selecto, el desarrollo de NDV como agente anticáncer no ha progresado. Otros virus oncolíticos han mostrado una promesa considerable en los ensayos clínicos. Para facilitar el desarrollo del NDV como terapia del cáncer, se requieren nuevas formas del virus. Idealmente, estas nuevas formas retendrían su capacidad de atacar a las células tumorales, pero ya no causarían enfermedades en las aves.
- 20

Resumen

- 25 Como se describe a continuación, la presente divulgación proporciona composiciones y métodos para el tratamiento de la neoplasia.

La presente divulgación proporciona en general un virus de la enfermedad de Newcastle atenuado (NDV) que tiene un sitio de escisión de la proteína F de la cepa NDV LaSota o la glucoproteína B (gB) del citomegalovirus (CMV) (S 116). La presente divulgación proporciona una secuencia de escisión de la proteína F modificada (FPCS) con una de las siguientes modificaciones de secuencia S116: ¹¹¹H-N- R-T-K-S/F¹¹⁷; S116K: ¹¹¹H-N-K-T-K-S/F¹¹⁷; S116M: ¹¹¹H-N-R-M-K-S/F¹¹⁷; S116KM: ¹¹¹H-N-K-M-K-S/F-I¹¹⁸; o R116: ¹¹¹H-N-R-T-K-R/F-I¹¹⁸. También se describe en este documento, cuando la cepa de virus atenuado es una cepa 73T modificada. También se describe en este documento, cuando el virus NDV atenuado es el virus r73T-R116. También se describe en este documento, cuando el virus tiene una región intergénica HN-L aumentada. También se describe en este documento, cuando la región intergénica HN-L es una secuencia no codificante entre al menos aproximadamente 50-300 amino nucleótidos de longitud. También se describe en este documento, cuando la secuencia no codificante se deriva de un paramixovirus tipo -1 (APMV-1), un virus sincitial respiratorio (RSV) o una secuencia aleatoria. También se describe en este documento, cuando la secuencia no codificante intergénica de HN y L tiene una longitud de 60, 102, 144, 198 o 318 nt. También se describe en este documento, cuando el virus tiene una o más secuencias de polinucleótidos heterólogas insertadas en la unión P-M y/o la unión HN-L. También se describe en este documento, cuando el virus tiene dos o más secuencias de polinucleótidos heterólogas, en las que al menos una secuencia de polinucleótidos heterólogo se inserta en la unión P-M y al menos una se inserta en la unión HN-L. También se describe en este documento, cuando la secuencia de polinucleótidos heteróloga es un transgén que codifica un polipéptido que mejora las propiedades oncolíticas del virus. También se describe en este documento, cuando el transgén codifica una citoquina, un ligando de la superficie celular y/o una quimiocina. También se describe en este documento, cuando la citoquina se selecciona del grupo que consiste en GM-CSF, IL-2, IL-21, IL-15, IL-12, y IL-12p70. También se describe en este documento, cuando la citoquina es GM-CSF humano. También se describe en este documento, cuando la secuencia de polinucleótidos heteróloga es un transgén que codifica una unidad estructural detectable. También se describe en este documento, cuando el nivel de expresión de la unidad estructural detectable se correlaciona con el virus. También se describe en este documento, cuando los genes F y HN de NDV se reemplazan por los correspondientes dominios extracelulares del virus 5 de parainfluenza de canino (PIV 5) o paramixovirus de paloma tipo 1 (PPMV-1). También se describe en este documento, cuando el virus es 73T-R116i-hGM-CSF. También se describe en este documento, cuando el virus atenuado tiene un tiempo de muerte medio en huevos (MDT) de más de 90 horas o aproximadamente 90-156 horas. También se describe en este documento, cuando el virus atenuado tiene un índice de patogenicidad intracerebral entre aproximadamente 0-0.7. También se describe en este documento, cuando el virus atenuado tiene un índice de patogenicidad intracerebral de aproximadamente 0. También se describe en este documento, cuando el virus atenuado tiene menos de aproximadamente 15% de citotoxicidad en células HT1080. También se describe en este documento, cuando el virus atenuado mata selectivamente las células tumorales con una eficiencia de muerte de al menos el 10 o el 15%. También se describe en este documento, cuando la eficacia de muerte de células tumorales está entre aproximadamente 75% -100%.

La presente divulgación incluye un método para matar selectivamente células tumorales, que implica poner en contacto una célula tumoral con el virus de la enfermedad de Newcastle atenuado descrito en este documento. La presente divulgación también proporciona una célula tumoral que es una célula de un cáncer de vejiga, ovario, cerebro, páncreas, próstata, sarcoma, pulmón, mama, cuello uterino, hígado, cabeza y cuello, gástrico, riñón, melanoma, linfoma, leucemia, tiroides, colon, y células de cáncer de melanoma. También se describe en este documento, cuando el método implica administrar al sujeto una cantidad eficaz de un virus de la enfermedad de Newcastle atenuado descrito en este documento. También se describe en este documento, cuando el virus de la enfermedad de Newcastle atenuado se administra de forma sistémica, intraperitoneal o intratumoral. También se describe en este documento, cuando el virus se administra a una dosis de aproximadamente 10^7 pfu a aproximadamente 10^9 pfu. También se describe en este documento, cuando el virus se administra por vía intravenosa a una dosis de aproximadamente 10^9 pfu a aproximadamente 10^{11} pfu. También se describe en este documento, cuando el sujeto tiene un cáncer seleccionado del grupo que consiste en cáncer de vejiga, ovario, cerebro, páncreas, próstata, sarcoma, pulmón, mama, cuello uterino, hígado, cabeza y cuello, gástrico, riñón, melanoma, linfoma, leucemia, tiroides, colon y melanoma.

La presente divulgación también proporciona un método de tratamiento de una neoplasia en un sujeto que ha desarrollado una respuesta inmune anti-NDV, el método que implica administrar al sujeto una cantidad eficaz de un virus de la enfermedad de Newcastle quimérico atenuado descrito en este documento, en el que el virus es un virus quimérico que comprende un gen F y/o HN de virus de parainfluenza de canino 5 (PIV 5) o paramixovirus de paloma tipo 1 (PPMV-1), en el que el virus de la enfermedad de Newcastle quimérico es antigénicamente distinto del NDV. La presente divulgación también proporciona un método que aumenta el nivel de virus oncolíticos presentes en el sujeto en relación con el nivel de virus oncolíticos presentes en un sujeto control que ha desarrollado una respuesta inmune anti-NDV, pero que no está recibiendo un virus de la enfermedad de Newcastle quimérico.

Definiciones

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen el significado comúnmente entendido por un experto en el arte a la que pertenece esta divulgación. Las siguientes referencias proporcionan a los expertos una definición general de muchos de los términos usados en esta divulgación: Singleton et al., Dictionary of Microbiology and Molecular Biology (2nd ed. 1994); The Cambridge Dictionary of Science and Technology (Walker ed., 1988); The Glossary of Genetics, 5th Ed., R. Rieger et al. (eds.), Springer Verlag (1991); y Hale & Marham, The Harper Collins Dictionary of Biology (1991). Como se usa en este documento, los siguientes términos tienen los significados que se les atribuyen a continuación, a menos que se especifique lo contrario.

Por "virus de la enfermedad de Newcastle atenuado" se entiende un virus de la enfermedad de Newcastle que mata selectivamente las células tumorales pero que no representa una amenaza para las aves de corral. También se describe en este documento, cuando el virus de la enfermedad de Newcastle atenuado tiene un ICPI inferior a aproximadamente 0.4 o 0.7. También se describe en este documento, cuando el virus de la enfermedad de Newcastle atenuado tiene un ICPI entre aproximadamente 0 y 0.1.

Por "secuencia de polinucleótidos heteróloga" se entiende un polinucleótido recombinante que no está presente en la condición de tipo salvaje.

Por "etiqueta detectable" se entiende una composición que cuando está unida a una molécula de interés hace que esta última sea detectable, por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos o químicos. Por ejemplo, las etiquetas útiles incluyen isótopos radiactivos, perlas magnéticas, perlas metálicas, partículas coloidales, colorantes fluorescentes, reactivos densos en electrones, enzimas (por ejemplo, como se usan comúnmente en un ELISA), biotina, digoxigenina o haptenos.

Por "agente" se entiende cualquier compuesto químico de molécula pequeña, anticuerpo, molécula de ácido nucleico o polipéptido, o fragmentos de los mismos.

Por "alteración" o "cambio" se entiende un aumento o una disminución. Una alteración puede ser tan pequeña como 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 20%, 30%, o como 40%, 50%, 60%, o incluso hasta 70%, 75%, 80%, 90%, o 100%.

Como se usa en este documento, el término "anticuerpo" se refiere a un polipéptido o grupo de polipéptidos que comprende al menos un dominio de unión que se forma a partir del plegamiento de cadenas polipeptídicas que tienen espacios de unión tridimensionales con formas de superficie internas y distribuciones de carga complementarias a las características de un determinante antigénico de un antígeno. Un anticuerpo por lo general tiene una forma tetramérica, que comprende dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, cada par tiene una cadena "ligera" y una "pesada". Las regiones variables, o polipéptidos de cadena variable, de cada par de cadenas ligeras/pesadas forman un sitio de unión de anticuerpo.

El término "mAb" se refiere a anticuerpo monoclonal. Los anticuerpos de la divulgación comprenden, sin limitación, anticuerpos nativos completos, anticuerpos biespecíficos; anticuerpos quiméricos; Fab, Fab', fragmentos de la región V de una sola cadena (scFv), polipéptidos de fusión y anticuerpos no convencionales.

5 Por "muestra biológica" se entiende una muestra obtenida de un sujeto que incluye una muestra de tejido biológico u origen de fluido, obtenida o recolectada in vivo o in situ. Una muestra biológica puede incluir cualquier célula, tejido, fluido u otro material derivado de un organismo.

Por "reactivo de captura" se entiende un reactivo que se une específicamente a una molécula de ácido nucleico o polipéptido para seleccionar o aislar la molécula de ácido nucleico o polipéptido.

10 Por "agresividad clínica" se entiende la gravedad de la neoplasia. Las neoplasias agresivas son más propensas a convertirse en metástasis que las neoplasias menos agresivas. Si bien los métodos de tratamiento conservadores son apropiados para las neoplasias menos agresivas, las neoplasias más agresivas requieren regímenes terapéuticos más agresivos.

15 Como se usa en este documento, los términos "determinar", "evaluar", "ensayar", "medir" y "detectar" se refieren a determinaciones tanto cuantitativas como cualitativas, y como tal, el término "determinar" se usa indistintamente en este documento con "ensayar", "medir" y similares. Cuando se pretende una determinación cuantitativa, se usa la frase "determinar una cantidad" de un analito y similares. Cuando se pretende una determinación cualitativa y/o cuantitativa, se usa la frase "determinar un nivel" de un analito o "detectar" un analito.

20 El término "sujeto" o "paciente" se refiere a un animal que es objeto de tratamiento, observación o experimento. Solo a modo de ejemplo, un sujeto incluye, pero no se limita a, un mamífero, que incluye, pero no se limita a, un mamífero humano o no humano, tal como un primate no humano, murino, bovino, equino, canino, ovino, o felino.

El término "reducir" o "aumentar" pretende alterar de manera negativa o positiva, respectivamente. Una alteración puede ser del 5%, 10%, 25%, 30%, 50%, 75%, o incluso del 100%.

Por "referencia" se entiende un estándar de comparación.

25 Por "periódico" se entiende a intervalos regulares. El monitoreo periódico del paciente incluye, por ejemplo, un programa de pruebas que se administran diariamente, cada dos semanas, cada dos meses, mensualmente, cada dos años o anualmente.

Por "gravedad de la neoplasia" se entiende el grado de patología. La gravedad de una neoplasia aumenta, por ejemplo, a medida que aumenta la etapa o el grado de la neoplasia.

30 Las moléculas de ácido nucleico útiles en los métodos descritos en este documento incluyen cualquier molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido descrito en este documento o un fragmento del mismo. Tales moléculas de ácido nucleico no necesitan ser 100% idénticas a una secuencia de ácido nucleico endógena, pero por lo general exhibirán una identidad sustancial. Los polinucleótidos que tienen una "identidad sustancial" con una secuencia endógena son por lo general capaces de hibridar con al menos una cadena de una molécula de ácido nucleico bicatenario. Por "hibridación" se entiende un par para formar una molécula bicatenaria entre secuencias de polinucleótidos complementarias (por ejemplo, un gen descrito en este documento), o porciones de las mismas, en diversas condiciones de rigurosidad. (Véase, por ejemplo, Wahl, G. M. y S. L. Berger (1987) Methods Enzymol. 152:399; Kimmel, A. R. (1987) Methods Enzymol. 152:507).

40 Por ejemplo, la concentración rigurosa de sal generalmente será menor que aproximadamente NaCl 750 mM y citrato trisódico 75 mM, preferiblemente menor de aproximadamente NaCl 500 mM y citrato trisódico 50 mM, y más preferiblemente menor de aproximadamente NaCl 250 mM y citrato trisódico 25 mM. Se puede obtener una hibridación de baja rigurosidad en ausencia de solvente orgánico, por ejemplo, formamida, mientras que se puede obtener una hibridación de alta rigurosidad en presencia de al menos aproximadamente 35% de formamida, y más preferiblemente al menos aproximadamente 50% de formamida. Las condiciones de temperatura rigurosas normalmente incluirán temperaturas de al menos aproximadamente 30 °C, más preferiblemente de al menos aproximadamente 37 °C, y más preferiblemente de al menos aproximadamente 42 °C. Variar parámetros adicionales, tal como el tiempo de hibridación, la concentración de detergente, por ejemplo, el dodecil sulfato de sodio (SDS), y la inclusión o exclusión del ADN portador, son bien conocidos para los expertos en el arte. Se logran diversos niveles de rigurosidad combinando estas diversas condiciones según sea necesario. También se describe en este documento, cuando se producirá la hibridación a 30 °C en NaCl 750 mM, citrato trisódico 75 mM y SDS al 1%. También se describe en este documento, cuando se producirá la hibridación a 37 °C en NaCl 500 mM, citrato trisódico 50 mM, SDS al 1%, formamida al 35% y ADN de esperma de salmón desnaturalizado a 100 µg/ml (ssADN). También se describe en este documento, cuando se producirá la hibridación a 42 °C en NaCl 250 mM, citrato trisódico 25 mM, SDS al 1%, formamida al 50% y 200 m.µg/ml de ssADN. Las variaciones útiles en estas condiciones serán fácilmente evidentes para los expertos en el arte.

En la mayoría de las aplicaciones, las etapas de lavado que siguen a la hibridación también variarán en el rigor. Las condiciones de rigurosidad de lavado se pueden definir por la concentración de sal y por la temperatura. Como se indicó anteriormente, la rigurosidad del lavado se puede aumentar al disminuir la concentración de sal o al aumentar la temperatura. Por ejemplo, la concentración de sal rigurosa para las etapas de lavado será preferiblemente menor que aproximadamente NaCl 30 mM y citrato trisódico 3 mM, y más preferiblemente menor de aproximadamente NaCl 15 mM y citrato trisódico 1.5 mM. Las condiciones de temperatura rigurosas para las etapas de lavado generalmente incluirán una temperatura de al menos aproximadamente 25 °C, más preferiblemente de al menos aproximadamente 42 °C, e incluso más preferiblemente de al menos aproximadamente 68 °C. También se describe en este documento, cuando las etapas de lavado aparecen a 25 °C en NaCl 30 mM, citrato trisódico 3 mM y SDS al 0.1%. También se describe en este documento, cuando se producirán las etapas de lavado a 42 °C en

NaCl 15 mM, citrato trisódico 1.5 mM y SDS al 0.1%. También se describe en este documento, cuando ocurrirán las etapas de lavado a 68 °C en NaCl 15 mM, citrato trisódico 1.5 mM y SDS al 0.1%. Las variaciones adicionales en estas condiciones serán fácilmente evidentes para los expertos en el arte. Los expertos en el arte conocen bien las técnicas de hibridación y se describen, por ejemplo, en Benton and Davis (Science 196:180, 1977); Grunstein and Hogness (Proc. Natl. Acad. Sci., USA 72:3961, 1975); Ausubel et al. (Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience, New York, 2001); Berger and Kimmel (Guide to Molecular Cloning Techniques, 1987, Academic Press, New York); y Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Por "sustancialmente idéntico" se entiende un polipéptido o molécula de ácido nucleico que muestra al menos un 50% de identidad con una secuencia de aminoácidos de referencia (por ejemplo, una cualquiera de las secuencias de aminoácidos descritas en este documento) o una secuencia de ácido nucleico (por ejemplo, una cualquiera de las secuencias de ácido nucleico descritas en este documento). Preferiblemente, dicha secuencia es al menos 60%, más preferiblemente 80% o 85%, y más preferiblemente 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o incluso 99% o más idéntica a nivel de aminoácidos o ácido nucleico a la secuencia usada para la comparación.

La identidad de la secuencia se mide normalmente usando un software de análisis de secuencia (por ejemplo, el paquete de software de análisis de secuencia del Genetics Computer Group, University of Wisconsin Biotechnology Center, 1710 University Avenue, Madison, Wis. 53705, programas BLAST, BESTFIT, GAP, o PILEUP/PRETTYBOX). Tal software empareja secuencias idénticas o similares asignando grados de homología a diversas sustituciones, eliminaciones y/u otras modificaciones. Las sustituciones conservadoras incluyen por lo general sustituciones dentro de los siguientes grupos: glicina, alanina; valina, isoleucina, leucina; ácido aspártico, ácido glutámico, asparagina, glutamina; serina, treonina; lisina, arginina; y fenilalanina, tirosina. En un enfoque de ejemplo para determinar el grado de identidad, se puede usar un programa BLAST, con una puntuación de probabilidad entre e^{-3} y e^{-100} que indica una secuencia estrechamente relacionada.

Como se usa en este documento, "sustancialmente pura" significa que una especie de interés es la especie predominante presente (esto es, en una base molar es más abundante que cualquier otra especie individual en la composición), y preferiblemente una fracción sustancialmente purificada es una composición en la que la especie objeto comprende al menos aproximadamente el 50 por ciento (sobre una base molar) de todas las especies macromoleculares presentes. En general, una composición sustancialmente pura comprenderá más de aproximadamente el 80 por ciento de todas las especies macromoleculares presentes en la composición, más preferiblemente más de aproximadamente el 85%, 90%, 95% y 99%. Más preferiblemente, la especie de interés se purifica hasta homogeneidad esencial (las especies contaminantes no se pueden detectar en la composición mediante métodos de detección convencionales) en el que la composición consiste esencialmente en una sola especie macromolecular.

Como se usa en este documento, los términos "tratar", "que trata", "tratamiento" y similares se refieren a reducir o mejorar un trastorno y/o síntomas asociados con el mismo. Se apreciará que, aunque no se excluye, tratar un trastorno o afección no requiere que el trastorno, la afección o los síntomas asociados con estas se eliminen por completo. De este modo, un tratamiento exitoso puede prolongar la supervivencia de un paciente o aliviar un síntoma no deseado.

Como se usa en este documento, los términos "prevenir", "prevenir", "prevención", "tratamiento profiláctico" y similares se refieren a reducir la probabilidad de desarrollar un trastorno o afección en un sujeto, que no tiene, pero es en riesgo de o ser susceptible de desarrollar un trastorno o afección.

Una dosis se refiere a una administración única de una composición terapéutica. La dosificación se refiere a la cantidad de una molécula terapéuticamente activa en una dosis. Un régimen de tratamiento se refiere a la dosis, el horario y el modo de administración de una o más dosis. Un ciclo se refiere a una unidad repetible de una o más dosis dentro de un régimen de tratamiento. En algunos regímenes de tratamiento las dosis son uniformes para cada dosis. En otros regímenes de tratamiento, las dosis pueden no ser uniformes.

Por ejemplo, se pueden usar una o más dosis de carga para elevar la concentración de una molécula terapéutica a un nivel deseado en un paciente. Las dosis de carga pueden ir seguidas de una o más dosis de mantenimiento, que

generalmente comprenden dosis más bajas (por ejemplo, la mitad o menos de una dosis de carga) que son suficientes para mantener una concentración deseada de una molécula terapéutica en un paciente. Se puede usar una o más dosis reducidas para reducir gradualmente la concentración de una molécula terapéutica en un paciente.

- 5 Por "se une específicamente" se entiende un compuesto (por ejemplo, un anticuerpo) que reconoce y se une a una molécula (por ejemplo, un polipéptido), pero que no reconoce y se une sustancialmente a otras moléculas.

- 10 A menos que se indique específicamente o sea obvio en el contexto, como se usa en este documento, el término "aproximadamente" se entiende dentro de un intervalo de tolerancia normal en la técnica, por ejemplo, dentro de 2 desviaciones estándar de la media. Aproximadamente se puede entender dentro del 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0.5%, 0.1%, 0.05% o 0.01% del valor establecido. A menos que se indique lo contrario en el contexto, todos los valores numéricos proporcionados en este documento están modificados por el término acerca de.

- 15 Se entiende que los intervalos proporcionados en este documento son abreviados para todos los valores dentro del intervalo. Por ejemplo, se entiende que un intervalo de 1 a 50 incluye cualquier número, combinación de números o subintervalo del grupo que consiste en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, o 50.

Cualquier compuesto, composición o método proporcionado en este documento se puede combinar con uno o más de cualquiera de las otras composiciones y métodos proporcionados en este documento.

- 20 Como se usa en este documento, las formas singulares "un", "una" y "el" incluyen formas plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. De este modo, por ejemplo, la referencia a "un biomarcador" incluye la referencia a más de un biomarcador.

A menos que se indique específicamente o sea obvio a partir del contexto, como se usa en este documento, el término "o" se entiende que es inclusivo.

El término "que incluye" se usa en este documento para significar, y se usa de manera intercambiable con, la frase "que incluye pero no se limita a".

- 25 Como se usa en este documento, los términos "comprenden", "que comprende", "que contiene", "que tiene" y similares pueden tener el significado que se les atribuye en la ley de Patentes de los Estados Unidos y pueden significar "incluye", "que incluye" y similares; "que consiste esencialmente en" o "consiste esencialmente" también tiene el significado que se le atribuye en la Ley de Patentes de EE. UU. y el término es abierto, permitiendo la presencia de más de lo que se recita siempre que las características básicas o novedosas de lo que se recita no se modifica por la presencia de más de lo que se recita, pero excluye las realizaciones de la técnica anterior.
- 30

Secuencias

Una secuencia de nucleótidos de ejemplo del virus 73V de NDV de longitud completa es:

```
tacgtataatacgaactcactatagggaccaaacagagaatccgtaggttacgataaaaggcgaaggagca
attgaagttggacgggtagaaggtgtgaatctcgagtcgagcccgaaagcacaaactcgagaagccttc
tgccaacatgtctccgtatttgacgagtagaacagctcctcgcgtctcagactcgcccaatggagct
catggaggaggggaaaagggagtagcctaaaagtagacgtcccggtattcactcttaacagtgtatgacc
cagaagataggtggaactttgcggtattctgcctccggattgctgttagcgaagatgccaaacaaccact
caggcaaggtgctctcatalctcttltatgctcccaactcacaagtgtaggaaccatgttgccttgca
gggaacagagaatgaagccacattggccgtgcttgagattgatggtttgccaacgggtatgccccagtca
acaataggagtgagtgctctgaagagagagcacagagattcgcgatgacagggtctctcctcgggc
atgcagtaattggcaccctgtcgtcacacggggccgaagatgatgcaccagaagacatcaccgatacc
ctggagaggatcctctatccaggcccaagtaggggtacagtagcaaaagccatgactgcgtatgaga
ctgcagatgagtcagaaacaagacgaatcaataagtatatgcagcaaggcagggtccaaaagaatacat
cctctaccccgtagtcaggagcacaatccaactcacgatcagacagctcttgcagtcgcctcttttg
gttagcgagctcaagagaggccgcaacacggcagggtgtacctctactattataacctagtaggggacg
tagactcatatatacgaataaccgggcttactgcattctcctgacactcaagtacggaatcaacaccaa
gacatcagcccttgacttagtagcctctcaggcgacatccagaagatgaagcagctcatgcgtttgtat
cggatgaaggagataatgcgccgtacatgacattgcttggtgatagtgaccagatgagctttgcgcctg
ccgagtagtcacaacttactccttcgccatgggtatggcatcagtcctagataaaggtaccgggaaata
```

ccaatttgcaggacitfatgagcacatattctggagacttggagtagtagtacgctcaggctcagggg
 agtagcattaacgaggatagctgcccagctaaagctaacccagcagcaaggagaggcctggcagctg
 ctgcccacgagctccgaggagaccagcagcatagacatgctactcaacaagtcggagctcctactgg
 gctcagcgagggggggtcccagccctacaaggcggatcgaatagatcgaaggcgaaccagaagccgg
 gatggggagaccatcctggtatctgatgagcggtagcaaatagcatgagggaagcggcaaacctg
 cacagggcactccccaatcggggcctcccccaactcctgggcatcccaagataacgacaccgactgggg
 gtattgattgacaaaaccagcttgcctccacaaaatcatcccaataccctcaccctgtagtcgacccctc
 gatttgcggccctacatgaccacaccccaacaaacatccccctcttctcctccccctgctgtaca
 actccgcacgcccctaggtaccacaggcacatgcggctcactaacaatcaaacagagccgaggaaatta
 gaaaaagtagcgggtagaagaggatattcagagaccaggcgaagtcctccgagctctctctcctc
 tacctgtagattagacaaaatagccacctttacagatgcggagatcgacgagctatttgagacaagt
 ggaactgtcattgacaataattacagcccagggtaaaccagcagagacttgggaaggaagtgcacatcc
 cacatggcaaaccaaggcgtgagcgagcatgggagaagcatgggagcatccaccagccaccagccagtc
 agacacccctgtagcagaggacagatctgacaaacaaccatccacaccgagcaagcgaccccgcatgac
 agccccggggccacatccggcaccagccccaccagggccacagacgaagccgtcgacacacagctc
 ggaccggagcaagcaactctctgttgccttgcagaagctcagcaataaatcatccaatgataaaaa
 ggccccatggctgagcccccaagggggaaccaccaacgtccgactcaacagcagggaagtcaaccag
 cgcggaacagtcaggaagaccacagaaccaagtcgaagggcccccctggaaaccaggggcagagacgc
 acacagcatatcatgacaatgggaggagtcacaactatcagctggtgcaacccctcatgctctccgac
 aaggcagagccaagacaatacccttgcctctgcggatcatgtccagccacctgtagacttgtgcaagcg
 atgatgtctatgatggaggcaatacacagagagtaagtaagggtgactatcagctagatcttcttga
 aacagacatccctccatccctatgatcggtccgaaatccaacagctgaaaacatctgttcagtcattgga
 agccaatttgggaatgatgaagattctggatcccggtgtgccaacgtttcatctctgagtgatctacgg
 gcagttgcccgatctcaccgggttttagttcaggccctggagaccatctccctatgtgactcaaggag
 gcgaatggcacttaataaactttcgaaccagtgccacatccatctgaattgattaaaccggcactgc
 atgcgggctgatagagtggaaggaagacactgtccgtgcatgcatgtcacgcccattgcacccg
 agttcttcagccaagctcctaagcaagctagatgcagccgggtcgtcaggaagcaggaataaagc
 gccttgcactaaatggctaattaccactgccacagtagcgggtccccgtccactcggcatcacaggaa
 tctgcaccgagtccccccccgagacctaaggtccaactctcaagtggcaatcctctctcgttctca
 gccccactgaatgacgcgaaccgttaattaatctagctacatgaaggattagaaaaataacgggtaga
 attggaatgccccaatgtgccaagatggactcataggaacaattgggtgactttgattctgccc
 tctttagcaacctgttagcatttccgacgtcctacaagacacaggagatgggaagaagcaaatcgcc
 cgcaatagatccagcgccctgactcgtggactgataagaaagactcagttatcaccacctta
 tggattcatctttaggttgggaatgaagaagccactgtcggcatgatcaatgataatcccaagcgag
 ttactttccgctgcatgctctgcctaggaagcgtcccaataaccggagaccttgtgagctggcaagg
 cctgtcactatgtagtcacatgcaagaagatgcaactaactgagagaatggtttctcagtagt
 gcaggcaccccgagtgctgcaaaagctgtagggctgtggcagacaataactatcagcgaatgcagtaag
 cacgtgaaagcgccagagaagatccccgggagtggaacctagaatacaagtgaaacttctctctga
 ctgtgtaccgaagaaggtgtacaaagatcccaactgcagtttgaagggttctggtcagctctga
 caatctgcgctcaatgtcactattaatgtggaggtagaccggaggagtccttgggttaaatctctgt
 aagctgacagcggatactatgctgacctcttctgcatattggacttatgaccaccgtagataggaagg
 ggaagaaagtacttttacaagctagaaaagaagataaggagacttgatctatctctcgggctcagtg
 tgtgctcggaccttcgtgctgtaaaagcaagaggtgcacggaccaagcttttggacaccttctctct
 agcagtgggacagcctgctatccatagcaaatgcctctccccagggtggcaagatactctggagtcaaa
 ccgctgctcggagcgttaaaatcattatcaagcaggtagcccaacgcgctgctcagtgaccgctga
 ccacgaggttacctctactaagctggagaaggggcacacccttgccaatacaatccttttaagaaataa
 gctgcgttctgagattgcgctccgcccactcaccagagcatcatgacacaaaaactaatctgtcttg
 attattacagttagttacctgtctatcaaatagaaaaaacacgggtagaagattctggatcccggtt
 ggccgcttctaggtgcaagatgggccccagaccttctaccaagaaccagcacctatgatgctgactgc

cgggtcgcgctggactgagttgcatctgtcggcgaactccattgatggcaggcctcttggcggtgcag
 gaattgtggtaacaggagacaaagcagtcacatatacctcatcccagacaggatcaatcatagttaa
 gtcctcccaaacctgcccaggataaggagggcatgtgcgaaagcccccttggatgcatacaacaggaca
 ttgaccactttgtcaccccccttggtagctctatccgtaggatacaagagctgttaactacatctggag
 ggaggagacagaaacgctttataggcgccattattggcggtgtggctcttggagttgcaactgctgcaca
 aataacagcggccgagctctgatacaagccaacaaaatgtgccacatcctccgacttaagagagc
 attgccgcaaccaatgagggcggtcatgaggtcactgacggattatcgcaactagcagtgccagttggga
 agatgcagcagttgtcaatgaccaatttaaaaaacaactcaggaattaggctgcatcagaattgcaca
 gcaagttggcgtagagctaacctgtatctaaccgaattgactacagtattcggaccacaaatcacttca
 cctgccttaaacaggctgactattcaggcactttacaatctagctgggtgggaatatggatcacttgtga
 ctaagttaggtgtagggaacaatcaactcagctcattatcggtagcggcttaatcaccggcaacctat
 tctgtacgactcacagactcaactcttgggtatacaggtaaactctacctcagtcgggaacctaaataat
 atgcgtgccacctacttggaaaccttatccgtaagcacaaccaggggattgctcggcacttgcctcaa
 aagtgtgtacacaggtcgggtctgtgtagaagaacttgacacctcatattgtatagaaccgacttggga
 ttatattgtacaagaatagtaacattccctatgtccccctgggtatttctctgcttgagcggcaataca
 tcggcctgtatgtactcaagaccgaaggcgactcactacgccatacatgactatcaaaaggctcagtica
 tcgtaactgcagatgacaacatgtagatgtgtaaaccctccgggtatcatatgcacaaactatggga
 agcctgtctctaatagataagcaatcatgcaatgtttatcttagacgggataactttaaggctcagt
 ggggaattcgatgcaacttatcagaagaatatctcaatacaagattctcaagtaataataacaggcaatc
 ttgatatctcaactgagcttgggaatgtcaacaactcgtacgtaatgctttgaataagttagaggaaag
 caacagcaaaactagacaagtaaatgtcaaaactgaccagcacatctgctctcattacatatactgtttg
 actatcatatcttctgttttgggtatacttagcctgggtctagcatgtacctaattgacaagcaaaagg
 cgcaacaaaaagaccttattatggcttgggaataatacctagatcagatgagagccactacaaaaatgtg
 aacacagatgagggaacgaagggtatccctaatagttaattgtgtgaaagttctggtagtctgtcagttcgg
 agagtttagaaaaaactaccgggtgtgtagtgacaaaaggacgatatacgggtagaacggtaaggagggcc
 gccccctaattgcgagccgggcttcacaactccgtttctaccgcttcaccgacagcagtcctcagtcag
 gaccgcgcagttagccaagtgcggttagagaatgatgaaagagaggcaaaaaatcatggcgcttgatat
 tccggattgcaatcttactcttaacagtagtgaccttagctacatctgtagcctccctgtatatagcatt
 gggggctagcacacctagcgaccttgtaggcataccgaccaggattccagggcagaagaaaaattaca
 tctgcacttgggtccaatcaagatgtagtagataggatataagcaagtgcccttgagctccgttgg
 cattgttaaacactgagatcacaattatgaacgcaataacatctctcttalcagaltaatggagctgc
 gaacaacagcgggtggggggcacctatccatgaccagattttatcgggggataggcaagaactcatt
 gtagatgatgctagtgtacatcattctatccctctgcattcaagaacatctgaattttatccgg
 cgcctactacaggtcaggtgcactcgggtaccttcatttgacatgagtgctaccattactgtacac
 tcataatgtaattgtctggatgcagagatcactcacactcacatcagtttagcacttgggtgtctc
 cggacatctgcaacaggaggatattcttttactctgcttccatcaatctggatgacacccaaaatc
 ggaagtcttcagtgtagtgcaactcccttaggtgtgatalgctgtgctcgaagtcacggagacaga
 ggaagaagattataactcagctgtccctacgctgatggtacatgggaggttaggggtcagcgccaatc
 cagcaaaaggacctagacgtcacaacattattgaggactgggtggccaactaccaaggagtaggggtg
 gatctttattgacagccggtatggttctcagttcagggagggctgaacccaactcaccagtgacac
 gtacagggaagagaatatgtaatafacaagcgatacaatgacacatgcccagatgagcaagactaccag
 atccgaatggccaagtctctgtataagcccggtgtgtgggaacgcatacagcaggctatcttat
 ctataaggtgtcaacatcttggcggaagaccagtagtactgtaccgccaacacagtcacactcat
 gggggccggaaggcagaattctcacagtagggacatctcatttctgtatcagcgagggtcatcatacttc
 tctcccggttattatctctatgacagtcagcaaaaaacagccactcttcatagtccctatacattca
 atgcttactcggccaggtagtatcccttgcaggcttcagcaagatgccccaaactcgtgttactgg
 agtctatacagatccatatccctaattctctataggaaccacacttgcgaggggtattcgggacaatg
 ctgtaggtgtacaagcaagactcaatctctgctgtcagtatcagacacatcccgagtcgcacaa
 cccgagtgagttcaagcagcaccaaagcagcatacacaacatcaacctgttttaagttgtcaagaccaa

taagacatttctcagcattgctgaaatatctaatactctcttggagaattcagaatcgctccgtta
 ctagttagatcctcaaaaatgatgggttagagaagccaggtctggttagtgagtcactatgaaaga
 gctggaaagatggcattgtatcacctatcttccgcgacaccaagaatcaactgaatgccggtgtgagct
 cgaattccatgtcggcagtgactacaatcagccagtgctcatgcgacagatcaagcttctgcaatagt
 cctcgtatgaagaaaaatgaagtggcaatgagatacaggcaaacagctcatggtaaatgtagcggg
 taggacatggcgagctctggctctgaaagggcagagcagcattatcctaccagagtcacacgtctt
 caccattggtcaagcacaaactacttattactggaaatfaactgggttacccgttctgatgaatgtga
 ctccaccacctcattctcagcagacaatggaaaaaatactgaatcggcctctcctgatactgagaga
 atgataaaactcggaggcgaglacacaaactctcaaccacaattctagaataaccggagctaccacc
 ccaggtgtttagaagaactggctagattgaggtccctgattcaaccaacaatttcgggaagttagaa
 gaagatccaaatcacacacagagataggaagaatgttcacaaggctgtgtacgcatatagagaagaaa
 ctgctgggtcatcctgtctaaatgtccccgggtcagaggagttcaacagcatccgtacggatccgg
 cattctgtttcactcaaaatgggtccacagccaaagtgtcatggctccatataaacagatccagaggca
 tctgattgtggcagctaggacaagggtcgtcgccaaacaattggtgatgtaaccataaggtagggcaa
 gctttgtcactcctgaactgtcattgtgacgcatagcaatgagaacaagttcacatgtcttaccagg
 aactgtattgatgtatgcagatatgatggaggcagagatatgtcaacataatatcaaccaggcggt
 gcatctcagaagcttatcagagaaaatgatgacatttgcagttaatagacgctctggcaaaagacttg
 ggtaatcaagctacgatgtgtatcactaatggagggtattgcatagcggagctgtccagctctcagc
 cgtcagggtacattgcaggagatttctcgcattcaacctgcaggagcttaagacatttaacggcct
 cctcccaatgatatagcagaatccgtgactcatgcaatagctactgtattctctgggttagaacagaat
 caagcagctgagatgtgtgctgtgtcgtctgtgggtcaccactgcttgagtcctgtattgcagcaa
 aggcagtcaggagccaaacgtcgcaccgaaatgggtggactttgatatgaccttcaggtactgtctt
 ctcaagggaacaatcatcaacggatcacagaaagaagaatgcaggtgtgtggccgcgagtcgaagtgtat
 acaatataagggaaggtcattgggcaactacatgcagaltcagcagagatttcacacgatatcatgtga
 gagagtataagagtttatctgcaattgagccatgtatagaatacgaacctgtcactaacctgag
 catgttcttaaaagacaaggcaatgcacacctaacgataattgcttgcctcgtttaggcggacctt
 ctctccgaagaccagaagaacaatgtaaaagaagcaacttcgactaatcgcctcttgatagagttttag
 agtcaaatgattttgatcatataaagagatggaatatctgacgacctggagtagcttagagatgacga
 tgtggcagtatcactcgtcgaagagaaggaggtgaaagttaattggacggatcttcgctaaagctgaca
 aagaagttaaggaaactgtcaggtgatggcggaaggatcctagccgaccagattgcacctttcttcagg
 gaaatggagtcattcaggatagcatatctttgaccaagagtatgctagcgtgagtcactgtcttttaa
 cagcaataagaacgtatcactgactgtaaaagaagagtatcttcaaacggcaatcatgacgaagagc
 aagaacctcggagagttgcaacctataacgactgacctgcaaaagtactgtcttaattggagatc
 agacaatcaaaactgttcgctcatgccatcaaccagttgatggcctacctcacttctcagtgatgca
 cctaagactgatggacactacaatgttcgtaggagacctttcaatcctcaagtgacctactgactgt
 gacctctcaaggtccctaatgatgacatatattgtcagtgccagagggglatcgaaggattatgtc
 agaagctatggacaatgatctctattgtcgaatccaactgtcgcagctagatgcattgtcgcgttgc
 ctgtatgttacagggtgataatcaagtaatagcagtaacgagagaggttaagatcagacgactctccggag
 atggtgttgacacagttgcatcaagccagtgataatttctcaaggaaatattcatgtcaatcattga
 ttggccataatttgaaggatcgtgaaacctcaggtcagacacattctcatatacagcaaacgaatctt
 caaagatggagcaatcctcagtcagtcctcaaaaattcatctaaattagtagtatacaggtgatctc
 agtgaacacaccgtaattgtcctgtgccaaacttgcctctactgtacacggctatgcgagaacgggcttc
 ccaaggacttctgttactatttaactatataatgagttgctgcagacatactttagctctgagttctc
 catcaccaacaattcgcaccccgatcttaaccagtcgtggattgaggacatcttttgcactcatat
 gttctgactcctgcccaattaggggacttagtaaccttcaatactcaaggctctacactagaataatcg
 gtgacccggggactactgcttttcagagatcaagcgactagaagcagtgaggattactgagtcctaacat
 tatgactaataatcttaactaggccgctgggaatggagattggccagcttttgaacgacccatactct
 ttcaattttgagactgttgcaagcccaacattgttcttaagaacatacgcgaagagctctatttga
 ctgttcaaatcccttattgtctggagtgacacagaggataatgaggcagaagagaaggcattggctga

attcttgcctaatcaagggtgattcatccccgcgttgcgcgtatcatatggaggcaagctctgtagg
 agggagaaagcaaatcaagggtgtgtgacacacacaccgtaattagattgcactactaggaggc
 cactaggcatcaagggtgatgcgtagatcaattattctagcatgcatgcaatgctgttttagagacga
 tgtttttctccaatcgaaccaaccaccttagtctcttctaataatgttctctgacactggcagac
 tatgcacggaaatagaagctggcacccttgacgggaggcaggaaaaactcgggtgtatctaactgata
 cgatagaactcgtagagggtgagattcttagtgaagcggagggtgcacaagatgtgacagcggagatga
 acagtttacttgggtccatctccaagcaatatagaattgaccgatgacaccagcaagaatcctccgatg
 agagtaccatattctgggtcaagacacaggagaggagagctgacctacttgcgaaaatagctcatatgt
 cggccatgtgaaggctgcccgaaggcatcatccgtgtgtatctgggttatgggataatgaagtaaa
 ttggactgctgctttagcattgcaaatctcgggtgaatataaacttagagtatctcgggtattgtcc
 cctttaccacggctgggaatctcaacatagactagatgacgggtataactcagatgacattcaccctg
 catctctacagggtgtcaccttacattcacatatccaatgattctcaaggctattcactgaagaagg
 agtcaaaaggagggaatgtgtgtatcaacagatcatgctcttgggttatcttaactgaatcgaatcgtctt
 ccaatgatgacaaccaggacatatgatgacacattgcatctacatagtaaafttagttgctgtatca
 gggagcaccctgttgcgggtcttctgagctacttgggtggcaccggagcgaaggacagtacacacaaa
 taagtttatgtatgacctagccctgctcggaggagacttggcagacttgaacttagctatcttcaag
 agttatgagcttaactcggagctatcccacgatagagctaatgaacattcttcaatatccagcggga
 agttgattggcagctgtgtgttcttatgatgaagatacctccataaagaatgacgccataatagtgtga
 tgacaataccggaattggtacgtgaagctcagaatcagatgtgtccgctatttgaatatgcagca
 ctggaagtgtcctcgtactgttctaccaactctattatctgagagtaaggcctagacaatatgtct
 tatatatgggtgatttatacaagaatatgccaggaattctacttccaacattgcagccacaatatctca
 tcccgctattcattcaagggttaccatgcagtggtggtcgaacctgacggatcacaccaacttgcagat
 acggattttatcgaatgtctgcaaaactgttagtatttgcactcagctgtgtatctcggcttatatt
 cagggaataagtatgtctgtgttccatctgtcttagatgataacctgaatgagaagatgcttcagct
 gatatcccggttatgtctgtgtacacgggtacttctgctacaacaagagaaatccgaaaataaggaggc
 ttatctgcagaagagaaatgttcagctacttactgagatctactgtcggatgctgtgaaccattactta
 gccctgatcagggtgagctctatcatgtctcctaacaattacattccagctaatctgtactacatgtc
 tcgggaagagcctcaatttgcagggaaaggaggacagggatactatcctggcgtgtgttccccca
 gagccattattagagttccctctgtgcaagatattggtgtcgcagtgaaagatccattcaccgcacaac
 ctgcggcatttttgaagagttagatttgcagtgctccagcaagggtatgacgcattcacacttagtcagat
 tcatctgagctcacatcaccaatccggagggaagactacttagtgcgatactgttcagaggaaatagg
 gctgcatcctcctctgtgtataaggcatccatctccttctgtacccgaggtaagatgtgcaagacag
 ggaactccttacttagctgaaggaaaggcggccatcatgagcttctcgaactgcatataccacatga
 aactatctattacaatacgtcttccaatgagatgaacccccgcagcgacatttggggcgacccca
 acccagtttttgaattcgggtgtttataggaacctacaggcggaggtaacatgcaaggatgatttgc
 aagagttccgtccactatggagagaaaatcacagggaagcgacctgacctcagataaagcagtggggta
 tattacatctgcagtgccctacagatctgtatcattgctgcatgtgacattgaaatccctccagggtcc
 aatcaaaagcttactagatcaactagctatcaattatctctgattgccatgcattccttaaggaggggc
 gggtagtgatcatcaaaagtgtgtatgcaatgggatactacttcatctactcatgaactgttgcctcc
 gtgttccacaaaaggatcattctcttaattggttatgcatgtagagggaatgagtggttacctggtat
 ttgtctatgggttacctggggggcctacatttgcacagagggtgtgaggatggcaaaactctggtgc
 agcggcacgggtacgttttgcacaatcagatgagatcacactgaccagggtattcacctcacagcggca
 gcgtgtgacagacatcctaccagctcttaccagattaataaagtacttgagaaagaatattgacact
 gcgctgattgaagctgggggacagccgctccgtccattctgtgcagagagtttggtagcacgctagcgg
 acataactcagataaccagatcattgctagtcacattgacacagtcacccgtctgtgatatatatgga
 agctgaggggtgatctgcgtgacacagtttttctatttacccttacaatctctactgacgggaaaaag
 agaacatcacttaaacagtgacagagacagatcctagagggttacaatactgggtcttagagtcgaagatc
 tcaataaaaataggcgatgtaacagcctagtgcttaaggcatgatctccatggaggacattatccact
 aaggacatactgaagcatagttacctgccctaataattgaaggctgtcctaggtattaccaaacftaaa

gaaatgtttacagacacctctgtattgtacttgactgtgctcaacaaaaattctacatgaaaactatag
gcaatgcagtcgaaagatattacagtaactgtgactcttaacgaaaatcacatataataggctctttt
ctggccaattgtatccttgggtatataactatgttagaaaaaagtgaactctgactccttagag
ctcgaatcgaactcaataaattgtcttaaaaaaagggtgcccacaaatcttctgagtgtagctgtg
attcaccaaatcttctgttgggtgcccggcagtggtcccagcctctcgtggtgcccggctgggcaacattc
cgaggggaccgtcccctcggtaatggcgaatgggacgtcgacagctaacaaagcccgaaggagtgagtt
gctgctgccaccgtgagcaataactagcataaccccttggggcctctaacgggtcttgaggggtttt
tgctgaaaggagtcgtggagacgtgtttaaac

Una secuencia de nucleótidos de ejemplo de la proteína F de wt es, en la que la secuencia subrayada indica la secuencia de nucleótidos del sitio de escisión de la proteína F:

atgggccccagacctctaccagaaccagcacctatgatgctgactgtcgggtcgcgctggactgagttgcatctgtccggcaa
actccattgatggcaggcctcttgcggctgcagggaattgtggaacaggagacaaagcagtcacatatacacctcatccagacagg
atcaatcatagtaagctctcccaaacctgcccaaggataaggagggcagtgcgaaagcccccttggatgcatacaacaggacattg
accactttgctcaccctctgtgactctatccgtaggatagaagagctgtgaactacatctggagggagagacagaaacgctttat
aggcgccattattggcgggtggtcttggagttgcaactgctgcacaaataacagcggccgcagctctgatacaagccaacaaaat
gctccaacatctccgacttaagagagcattgccgcaaccaatgagggcgtgcatgaggtcactgacggattatgcacactagca
gtggcagttgggaagatgcagcagttgtcaatgaccaatttaataaaacaactcagggaattaggctgcatcagaattgcacagcaagtt
ggcgtagagctcaacctgtatctaaccgaattgactacagttatccggaccacaaatcacttcacctgccttaacaagctgactattcag
gcactttacaatctagctgtgggaatattgacactgtgtgactaagttagggttaggggaacaataactcagctcattaatcggtagcg
gcttaatcaccggcaacctattctgtacgactcacagactcaactcttgggtatagagtaactctacctcagtcgggaacctaaataa
tatgctgccacctacttggaaaccttatccgtaagcacaaccaggggatllgcctcggcacttgcctcaaaagtgggtgacacaggtcg
gttctgtgatagaagaacttgacacctcatattgtatagaaccgacttggatttatattgacaagaatgtaaacctccatgtccctg
gtatttattcctgcttgagcggcaatacatcggcctgtatgtactcaagaccgaaaggcgcactcactacgccatcatgactatcaag
gctcagtcacgctaactgcaagatgacaacatgtagatgtgtaaacccccgggtatcatatcgcaaaactatggggaagcgtgtct
ctaatagataagcaatcatgcaatgtttatccttagacgggataacttaaggctcagtggggaattcgatgcaacttatcagaagaatat
ctcaatacaagattctcaagtaataataacaggcaacttctgatatctcaactgagcttgggaatgtcaacaactcgaatcgaatgctttga
ataagtttagaggaaagcaacgcaaaactagacaaagtcattgcaactgaccagcacatctgctctcattacatatcgttttgactat
catatctctgttttggatattagcctgtgtctagcatgctacctaattgtacaagcaaaaggcgaacaaaagaccttattatggcttg
gaataataacctagatcagatgagagccactacaaaaatgtga

- 5 Una secuencia de aminoácidos de ejemplo de la proteína F de tipo salvaje en la que la secuencia subrayada indica la secuencia de aminoácidos del sitio de escisión de la proteína F:

mgprpstknppmmmlttrvalvlscicpansidgrplaaagivvtgdkavniytssqtsiivklpnlpkdkeacapakldaynr
tltltlplgdsirriqesvttsggrrqkrfgaiigvalgvataaqitaaaliqakqnaaniirkesiaatneavhevtglsqlavav
gkmqqfvdqfnktqelgciriaqqvgvelnlylteltvfgpqtspalnklitqalynlaggnmdhlltklvgvnnqlssligsgli
tgnpilydsqtqllgiqvtlpsvgnlnnmratyletlsvstrgfasalvpkvvtqvgsvieeldtsycietldldlyctrivtfpmspgiy
sclsgntsacmysktegaltpymtikgsviaackmmttcrcvnpngiisqnygeavslidkqscnvlslldgltlrlsgfedatyqkni
siqdsqviitgnldistelnvnnsisnalnklesnksldkvnvkltsalivltiislvfgilslvlaclylmykqkaqqkllwlg
nntldqmrattkm

Una secuencia de nucleótidos de ejemplo de GM-CSF de ratón es:

Atgtgctgcagaacctgctgttctgggcatcgtggtgtacagcctgagcggccctaccagatccccatcaccgtgaccagacct
ggaaacatgtggaagccatcaagaggccctgaatctgctggacgacatcccgtagccctgaacgaagaggtggaagtggtgctc

aacgagttcagctcaagaaactgacctgctgacagaccggctgaagatctttgagcagggcctgagaggcaacttcaccaagctg
aaggcgctctgaacatgaccgccagctactaccagacctactgccccccaccccgagacagattgcgagacacaagtgaccac
ctacgccgactcatcgacagcctgaaaaccttctgaccgacatcccttcgagtgcaagaaacccggccagaagtga

- 10 Una secuencia de aminoácidos de ejemplo de GM-CSF de ratón es:

mwlqnlflgivvyslaptspitvtrpwkhveaikalnlddmpvltneevvvsnefsfklktcvqtrikifeqglrgnftklkg
alnmtasyyyqtpptpetdctqvttyadfidslktfldipfeckkpgqk

Una secuencia de nucleótidos de ejemplo de GM-CSF humano es:

Atgtggctgcagagcctgctgctgctgggcacagtggcctgtacatctctgcccctgccagaagccctagccctagcacacagccc
tgggagcatgtgaacgccatccaggaagccagacggctgctgaacctgagcagagacacagccgccgagatgaacgagacagt
gaagtgatctccgagatgttcgatctgcaagagcctacctgctgcagaccggctggaactgtacaagcaggccctgagaggcag
cctgaccaagctgaagggacccctgacctgatggccagccactacaagcagcactgccccccacacccgagacaagctgtgcc
accgatcatcaccttcgagagcttcaagagaacctgaaggacttctgctgctgaccccttcgactgctgggagccctgctcagg
aatga

Una secuencia de aminoácidos de ejemplo de GM-CSF humano es:

mwlqslillgtvacsisaparspsstqpwhehvnaiquearrllnlsrdtaamnetveisemfdlqptclqtrlelykqglrgslkl
kgpltmashykqhepptsctatqiitfeskenlkdflvipfdewepvqe

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 representa la construcción de la cepa 73T de ADNc antigenómico NDV 73T. Las secuencias de NDV en GenBank se alinearon para obtener secuencias de consenso para diseñar oligonucleótidos de ADN para RT-PCR del ARN viral. Seis fragmentos de ADNc subgenómicos generados por RT-PCR de alta fidelidad se ensamblaron en el vector pUC19. El ADNc de longitud completa de NDV 73T se designó como p73T. La secuencia de nucleótidos y de aminoácidos deducida del sitio de escisión de la proteína F (FPCS) en la 73T se modificó como la de la cepa LaSota del NDV (lentogénica, lenta) y gB de citomegalovirus (CMV) (S116). La doble barra indica el sitio de escisión de la proteína F. Además, el plásmido de ADNc de la cepa 73T (p73T) contiene un promotor de la ARN polimerasa T7 de 27 nucleótidos (nt) en el extremo 5' y una secuencia de ribozima antígenoma HDV que contiene 189 nt y una señal de terminación de la transcripción de la ARN polimerasa T7 en el extremo 3'. Para generar NDV no virulento, la secuencia que codifica el sitio de escisión de la proteasa de la proteína de fusión se modificó por mutagénesis de sitio dirigida como las de la cepa NDV LaSota no virulenta (lentogénica, lenta) o la glucoproteína B (gB) del citomegalovirus (S116).

Las figuras 2A y 2B representan la inserción de casete (s) de transgenes en el genoma del NDV 73T. La figura 2A muestra la inserción de un transgén en la unión P-M. Se introdujo un sitio de restricción Afel en nt 3148 en el plásmido subclon que contiene el fragmento SacII-PmII. ADNc que codifican el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos de granulocitos humano o de ratón (GM-CSF) o interleucina 2 (IL-2). El casete del gen insertado contiene el extremo del gen (GE; 5'-TTAAGAAAAA -3'), el nucleótido intergénico (T), la secuencia de inicio del gen (GS; 5'-ACGGGTAGA -3') y el marco de lectura abierto (ORF) del transgén. Además, se insertaron diez nucleótidos (5'-cgccgccacc-3') corriente arriba del sitio de inicio para introducir una secuencia Kozak. El fragmento SacII-PmII del plásmido resultante se barajó en el plásmido r73T y se nombró como p73T-P1. Adicionalmente, la figura 2A muestra la inserción de un transgén en la unión HN-L entre el ORF de HN y la secuencia de la señal de terminación de gen (GE) de HN, se introdujo un sitio de restricción Afel en nt 8231 en el plásmido que contiene el fragmento Agel-XbaI. El casete del gen se generó por PCR usando un par de cebadores antisentido y de sentido de fosfato (Tabla 3) y se insertó en el sitio Afel. El fragmento AgI-XbaI del plásmido resultante se barajó en el plásmido p73T, produciendo p73T-HN1. El ADNc 73T de longitud completa (FL) que contiene el transgén en la unión P-M o HN-L se designó como p73T-P1 o p73T-HN1, respectivamente. La figura 2B muestra la inserción de dos casetes de transcripción en la unión P-M. Se introdujo un sitio Afel al final del ORF de GM-CSF (nt 3619). El ORF de IL-2 se amplificó usando un par de cebadores antisentido y de sentido de fosfato que contenían las secuencias GE y GS y se insertó en el sitio Afel. El fragmento SacII-PmII del plásmido resultante, incluidos los casetes transcripcionales GM-CSF e IL-2, se intercambió de nuevo en el plásmido r73T, produciendo p73T-P2.

Las figuras 3A-3C muestran la recuperación de la cepa 73T de NDV recombinante infecciosa (r73T) con FPCS modificado y representan la escisión de la proteína F y la actividad de fusión in vitro. La figura 3A muestra cómo se clonaron NDV 73T NP, P, L y ADNc antigénico (p73Tlento o p73T-S116) bajo el control del promotor y terminador de la polimerasa de ARN T7. Los cuatro plásmidos se cotransfectaron en una línea celular que expresa la ARN polimerasa. Los virus recuperados se designaron como r73T-lento o r73T-S116. El r73T-lento y el r73T-S116 se pasaron en células Vero con medios con y sin suplemento de tripsina. El crecimiento de r73T-lento depende de la tripsina, mientras que r73T-S116 puede crecer en un medio sin el suplemento de tripsina. Para evaluar la estabilidad genética de FPCS en r73T-S116 y transgén, r73T-S116 con y sin hGM-CSF en la unión P-M se pasaron adicionalmente por 10 pasajes en células Vero y fibrosarcoma humano HT1080 en MOI 0.01 en medio sin suplemento de tripsina. Las mutaciones (R113K y/o Q114M) en el FPCS aparecieron en el pasaje 7 y la mutación

S116R se detectó en los pasajes 9. En el pasaje 10, se secuenciaron F, HN y el transgén y no se encontraron mutaciones adicionales. Las figuras 3B y 3C muestran el efecto de la mutación del sitio de escisión de la proteína F (FPCS) sobre la fusión celular y la escisión de la proteína F in vitro. Para la construcción del plásmido que coexpresa dos transgenes, GFP y NDV F o genes HN, los marcos de lectura abiertos de la proteína del NDV F o el gen HN se amplificaron por PCR y se clonaron en el plásmido pVito2-neo-MCS (Invitrogen) bajo el control del promotor del citomegalovirus (CMV). Las células 293T se sembraron a 5×10^5 células/pocillo en una placa de 6 pocillos para la transfección al día siguiente. La figura 3B representa células transfectadas con 2 µg de ADN plasmídico de NDV F durante un día y recogidas en solución reguladora de lisis de proteínas para análisis de transferencia de Western usando un antisuero policlonal específico anti-NDV F. La proteína NDV F con el sitio de escisión lentogénico y S116 no se escindieron, solo se detectó F0. Las proteínas F de R116 y S116-KM se escindieron parcialmente según lo indicado por la aparición de la banda de proteína F1. La figura 3C muestra las células que se cotransfectaron con un plásmido F diferente con el plásmido HN wt y que se examinaron para determinar la formación de fusión con un microscopio fluorescente. La proteína F wt fue más eficiente en la formación de fusión

La figura 4 es una tabla que resume las características de los derivados de r73T-lento y r73T-S116. ^aTodos los virus contienen hGMCSF en la unión P-M. ^bLos aminoácidos en el FPCS que son diferentes de FPCS-S116 están subrayados. ^cFormación de placa en células Vero sin tripsina en el revestimiento después de 36 horas de incubación y se visualiza con un aumento de x10. ^dTiempo de muerte medio en huevos (MDT). ^ePatogenicidad de NDV en pollos libres de patógenos de 1 día por el índice de patogenicidad intracerebral (ICPI). El ensayo ICPI se realizó en National Veterinary Service Laboratories (NVSL) (Ames, Iowa). ^fEfecto de la citotoxicidad de los virus en células de fibrosarcoma humano HT1080 posteriores a la infección en multiplicidades de infección (MOI) de 0.01 a las 72 horas posteriores a la infección. El porcentaje relativo de células supervivientes se determina comparando cada muestra con células no tratadas que se consideraron 100% viables. Los datos presentados en la tabla son porcentajes relativos de células muertas. ^gEl virus creció en células Vero posteriores a la infección con MOI de 0.01 y se cultivó en OPTI-MEM sin suplemento de tripsina durante 3-5 días a 37 °C. ^hVirus cultivados en huevos embrionados de pollo. Los huevos embrionados de 10-11 días se infectaron con 1,000 pfu de r73T. El líquido amniótico se recogió después de la incubación a 37 °C, durante 72 horas. El título de virus infeccioso se determinó en células Vero mediante ensayo de placa.

Las figuras 5A y 5B representan estrategias para atenuar la virulencia del virus r73T-R116 en pollos. La figura 5A muestra la inserción de transgenes en la unión P-M (1) y la unión HN-L (2), y la extensión de la región intergénica HN-L mediante la inserción de una secuencia no codificante (3). La inserción del casete de transgenes en la unión P-M es la misma que se muestra en la figura 2A. El segundo casete de transgén contiene la secuencia de inicio del gen L (GS; 5'-ACGGGTAGA-3'), el marco de lectura abierto (ORF) del transgén, las secuencias de la región 3' no traducida del gen L (en cursiva) y la secuencia final del gen L (GE; 5'-TTAAGAAAAA-3'). Las secuencias no codificantes usadas para extender la unión HN-L se tomaron de paramixovirus tipo -1 (APMV-1), virus sincitial respiratorio (RSV) o secuencia aleatoria que no tiene identidad de secuencia u homología con secuencias conocidas. La secuencia de inserción puede estar en el intervalo de 60-318 nt. La inserción de un segundo transgén en HN-L permite que el virus exprese dos transgenes (por ejemplo, hGM-CSF y GFP). La figura 5B representa las secuencias que se insertaron en la unión HN-L.

La figura 6A es una tabla que resume las características de los derivados de r73T-R116. ^aTodos los virus contienen hGM-CSF en la unión P-M. ^bSecuencias insertadas en la unión HN-L como se muestra en la figura 5B. ^cFormación de placa en células Vero sin tripsina en el revestimiento después de 36 horas de incubación y se visualiza con un aumento de x10. ^dTiempo de muerte medio en huevos (MDT). ^ePatogenicidad del NDV en pollos libres de patógenos de 1 día con el índice de patogenicidad intracerebral (ICPI). El ensayo ICPI se realizó en National Veterinary Service Laboratories (NVSL) (Ames, Iowa). ^fEfecto de la citotoxicidad de los virus en células de fibrosarcoma humano HT1080 posteriores a la infección en multiplicidades de infección (MOI) de 0.01 a las 72 horas posteriores a la infección. El porcentaje relativo de células supervivientes se determina comparando cada muestra con células no tratadas que se consideraron 100% viables. Los datos presentados en la tabla son porcentajes relativos de células muertas. ^gEl virus creció en células Vero posteriores a la infección con MOI de 0.01 y se cultivó en OPTI-MEM sin suplemento de tripsina durante 3-5 días a 37 °C. ^hVirus cultivados en huevos embrionados de pollo. Los huevos embrionados de 10-11 días se infectaron con 1000 pfu de r73T. El líquido amniótico se recogió después de la incubación a 37 °C, durante 72 horas. El título infeccioso se determinó en células Vero mediante ensayo de placa.

Las figuras 6B-6E son gráficos que muestran la cinética de crecimiento de NDV recombinante en células DF-1 y Vero. Se infectaron células DF-1 y Vero en placas de seis pocillos con cada virus indicado en una multiplicidad de infección (m.o.i.) de 5.0 (ciclo único, Figuras 6B y 6C) o 0.001 (multiciclo, Figuras 6C y 6D). Los sobrenadantes de cultivo de células infectadas se recogieron a intervalos de 10 horas hasta 50 horas posteriores a la infección, y los títulos de virus se determinaron mediante un ensayo en placa.

Las figuras 6F y 6G muestran la síntesis de ARN y proteínas en las células DF-1. Las células DF-1 se infectaron con cada virus como se indica en un moi de 5.0, se incubaron durante 20 h, se extrajeron los ARN intracelulares totales para el análisis de transferencia Northern (Figura 6F) y se examinó un segundo conjunto de células infectadas para la síntesis de proteínas mediante transferencia Western (Figura 6G). Los ARN se separaron mediante electroforesis en un gel de agarosa formaldehído, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y se hibridaron con sondas de

ARN marcadas con biotina específicas para los genes HN, NP, P y L. Se usó una sonda de ARN positiva en el gen L para detectar ARN genómico viral. Las proteínas totales se separaron en SDS-PAGE y se transfirieron con suero anti-NP, F, HN y L. Las proteínas totales cargadas en el gel fueron detectadas por un anticuerpo específico de actina. El NDV R116i recombinante con 198 nt de inserción entre la secuencia intergénica HN y L tuvo una síntesis global reducida de ARN y proteínas en las células DF-1.

Las figuras 6H y 6I representan la síntesis viral de ARN y proteínas en células Vero. La figura 6H muestra el análisis de transferencia Northern de la síntesis de ARN. Las células Vero se infectaron con los virus a m.o.i de 5.0, se incubaron durante 20 h, se extrajeron los ARN intracelulares totales. Los ARN se separaron por electroforesis en un gel de agarosa formaldehído, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y se hibridaron con sondas de ARN marcadas con biotina específicas de los genes NP y L o un ARN del gen L de sentido positivo para detectar el ARN genómico. La figura 6I muestra el análisis de transferencia Western de la síntesis de proteínas virales en células Vero infectadas. Las proteínas totales se separaron en SDS-PAGE, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se transfirieron con suero anti-NP, F, HN y L. Las proteínas totales cargadas en el gel fueron detectadas por un anticuerpo específico de actina. Los virus R116i con inserción de 198 nt tenían un ARN genómico reducido, pero aumentaron considerablemente el ARNm de NP en comparación con S116 y NDV wt. El nivel de ARNm L era demasiado bajo para indicar la diferencia. Las proteínas corriente arriba del gen L tenían regulada la expresión, pero el nivel de proteína L se redujo en las células Vero.

Las figuras 6J y 6K muestran la comparación de la síntesis de proteínas en células DF-1 y Vero infectadas con una baja multiplicidad de infección por análisis de transferencia Western. Las células DF-1 y Vero se infectaron con cada virus como se indica a m.o.i de 0.001, se incubaron durante 72 h y se recogieron en solución reguladora de lisis de proteínas. Las proteínas totales se separaron en SDS-PAGE, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se transfirieron con suero anti-NP, F, HN y L. Las proteínas cargadas en el gel fueron detectadas por un anticuerpo contra la actina. El nivel de proteína L se redujo en ambas líneas celulares, sin embargo, las proteínas que se encuentran corriente arriba del gen L inhibida la expresión en las células DF-1, pero regulada la expresión en las células Vero.

Las figuras 6L muestran la síntesis de proteínas virales en células humanas infectadas en comparación con las células DF-1. HT1080 humano, células Hela y células DF-1 se infectaron con cada virus como se indica en m.o.i de 5.0, se incubaron durante 20 h y se recogieron en solución reguladora de lisis de proteínas. Las proteínas se separaron en SDS-PAGE, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se transfirieron con suero anti-HN y anti-L. La expresión de la proteína HN de R116i con 198nt de inserción entre la unión HN y L aumenta en las células HT1080 y Hela, pero disminuye en las células DF-1. La proteína L disminuyó en las tres líneas celulares infectadas con R116i-198 o 198RSV.

La figura 7 son gráficos que muestran la cinética de crecimiento de los virus r73T en huevos de pollo embrionados. Para determinar las condiciones de crecimiento de los virus r73T, se realizaron estudios de cinética de crecimiento en huevos. Los huevos embrionados de pollo se infectaron con 100, 1000, 10,000 o 100,000 PFU/huevo de los virus indicados y se incubaron durante 2, 3 o 4 días (73T wt, arriba a la izquierda; R116, arriba a la derecha; R116i-318, centro a la izquierda; R116i-198 -RSV, centro a la derecha; R116i-198-aleatorio, abajo a la izquierda; S116-KM, abajo a la derecha). Se recogió el fluido alantoico y se determinaron los títulos víricos mediante FFA. La inoculación de 100 FFU/huevo tuvo un título bajo en el día 1, pero alcanzó el nivel máximo en el día 2. En general, la mayoría de los virus alcanzaron títulos máximos de ~ 8 logs/mL en el día 2, independientemente de la dosis de inoculación usada. R116i-198 tiene el título más bajo, la dosis de inóculo baja generó el mayor rendimiento en el día 2, lo que indica que podría haber acumulación de partículas defectuosas. La inserción de R116i-318-APMV también tuvo un título máximo más bajo de ~7 logs. R116i-198-RSV alcanzó el título máximo de 7.5 logs. El S116 rederivado por la genética inversa no tuvo reducción en la producción de virus en los huevos. Por lo tanto, entre los derivados de R116, el virus con inserción de RSV-198nt fue un candidato a virus oncolítico superior en términos de propiedades de crecimiento en huevos.

La figura 8 son gráficos que muestran la cinética de crecimiento de los virus r73T en células Vero. Los virus también se evaluaron en el clon 51D11 de células Vero libre de suero, una línea celular patentada generada por MedImmune. Todos los virus se replicaron de manera similar en ambas condiciones moi (0.001, arriba; 0.0001, abajo). La modificación de 73T FPCS y la inserción intergénica en la unión HN-L de R116 no afectaron el crecimiento del virus en las células Vero.

Las figuras 9A-9D muestran que los virus r73T se replican selectivamente en células tumorales y tienen citotoxicidad para células tumorales, en comparación con células no neoplásicas. Los datos se obtuvieron posteriores a la infección con derivados de r73T a diferentes dosis que oscilaron entre 1 y 100,000 PFU durante 72 horas. La figura 9A es un gráfico que muestra la evaluación de r73T y sus derivados para la muerte de células en el fibrosarcoma humano HT1080 en relación con las células de control no tratadas. En las células cancerosas HT1080, el virus con FPCS lentogénico tuvo la menor muerte, el S116 en el FPCS fue intermedio y los virus con R116 en el FPCS tuvieron una muerte celular tan eficiente como el virus r73T wt. La figura 9B es un gráfico que muestra la evaluación de r73T y sus derivados para la muerte de células en células CCD1122Sk de fibroblastos de piel humana normal en relación con células de control no tratadas. En las células CCD1122SK normales, todos los virus no mataron a las

células tan eficientemente como las células cancerosas, con una reducción de la eficiencia de muerte de ~ 100 veces. Independientemente de las secuencias de FPCS, todos los virus tuvieron una muerte similar en las células normales, probablemente debido a un solo ciclo de replicación (sin propagación del virus). La figura 9C es una tabla que muestra la eficiencia de muerte de células en el cáncer y en las células normales, expresada como una concentración eficaz del 50% (EC₅₀) interpolada desde la curva de respuesta de dosis usando Prism 6.0. El derivado de R116 tenía un valor de EC₅₀ similar a r73T wt con un EC₅₀ de 10 PFU, lo que indica que la modificación de FPCS no afectó la replicación del virus en células cancerosas y la eficiencia de muerte de células. La figura 9D es un gráfico que muestra la replicación de los virus en las células HT1080 y CCD1122SK en MOI 0.01 en el día 3 posteriores a la infección. Todos los virus se replicaron preferentemente en las células cancerosas que en las células normales, con una diferencia de aproximadamente 1.5-2.0 logs.

Las figuras 10A y 10B son gráficos que muestran que los derivados de r73T son efectivos en la regresión del tumor en la administración local y sistémica. Para evaluar la actividad oncolítica in vivo, se estableció un modelo de xenoinjerto HT1080 inyectando células HT1080 a una concentración de 5×10^6 células/0.1 ml por vía subcutánea en ratones desnudos atímicos Balb/C de 5 a 6 semanas. La figura 10A es un gráfico que muestra el efecto de R116i-318-hGM-CSF administrado por vía intratumoral (i.t.) o intravenosa (i.v.). Los datos muestran que los derivados de R116i-318-hGM-CSF tenían actividad antitumoral in vivo cuando se administraron ya sea sistémica o intratumoralmente a ratones inmunodeficientes que portan xenoinjertos de tumores humanos. La tasa de crecimiento del tumor se comparó entre el tratamiento y los grupos de control. Las regresiones tumorales inducidas por las dos vías de administración fueron ambas significativamente diferentes del grupo de control. Los ratones se asignaron al azar en grupos (n = 10) como se indicó cuando el volumen del tumor alcanzó aproximadamente 65 mm³. Los ratones recibieron una dosis única de PBS o 2×10^7 Pfu de r73T-hGM-CSF-R116i-198 administrada por vía intratumoral (IT) o 1×10^8 PFU administrados por vía intravenosa (IV) mediante inyección en la vena de la cola. * P < 0.05, prueba T de Student no emparejada. La figura 10B es un gráfico que compara las actividades oncolíticas de los derivados de r73T en los xenoinjertos HT1080 mediante inyección IV de 1×10^8 PFU. Dos dosis de derivados de r73T fueron capaces de inducir una regresión significativa del tumor con diversos grados de efectividad. r73T-lento fue el menos efectivo en la regresión del tumor, mientras que r73T wt fue el más efectivo en la regresión del tumor. r73T-lento tuvo un efecto similar al del virus S116, aunque el virus S116 tiene una EC₅₀ 10 veces menor en la muerte de células in vitro (véase la figura 9A). r73T-R116i-318 fue tan potente como 73T wt en la inhibición del crecimiento tumoral hasta 9 días después de la 2ª dosis (día 19 después de la implantación del tumor), el tumor volvió a crecer en ratones tratados con R116i pero no en el grupo tratado con 73T wt. Los ratones se asignaron al azar en grupos (n = 7) cuando el volumen del tumor alcanzó aproximadamente 180 mm³. Los ratones recibieron ya sea PBS o 1×10^8 PFU de r73T-hGM-CSF-lento (lento) o r73T-hGM-CSF-S116K113M114 (S116 KM) o r73T-hGM-CSF-R116i-318 nt APMV-N (R116i) o r73T-hGM-CSF (r73T wt) administrado por IV. El tamaño del tumor se midió cada 3-4 días. * P < 0.05, prueba T de Student no emparejada. Los datos muestran que los derivados de r73T tenían actividad antitumoral in vivo cuando se administraron sistémica o intratumoralmente a ratones inmunodeficientes que portan xenoinjertos de tumores humanos. La escisión eficaz de la proteína F es importante para la replicación del virus in vitro e in vivo. Los virus con el R116 en el FPCS fueron más potentes en la muerte de células in vitro e in vivo.

Las figuras 11A-G representan la biodistribución tisular de los derivados de r73T después de la administración intravenosa y el efecto del GM-CSF de ratón frente al humano en la inhibición del crecimiento tumoral. Para determinar si el virus NDV oncolítico se replica selectivamente en los tejidos tumorales y la eliminación viral, se determinó la distribución del virus en diferentes órganos. Ratones desnudos atímicos que portaban tumores HT1080 subcutáneos con un tamaño de ~ 250 mm³ se trataron con R116i (r73T-hGM-CSF-R116i-318 nt APMV-N) a una dosis de 1×10^8 PFU por vía intravenosa y se sacrificaron el día 1, 4 o 8 (n = 3 por punto de tiempo). Se recogieron suero, pulmones, bazo, ovarios y tumor y se cuantificó la presencia de virus. La replicación viral en el tumor y los órganos se evaluó en los días 1, 4 y 8 posteriores a la infección. La figura 11A es un gráfico que representa la cuantificación del virus en tejidos mediante el ensayo de placa en células Vero. El virus en los órganos solo se detectó el día 1 (el virus no se detectó en el ovario en todos los puntos de tiempo, no se muestran los datos) y la carga de virus en los tejidos tumorales fue de ~ 100 veces mayor que en los pulmones y bazo. La presencia del virus en el tumor persistió durante al menos 8 días, lo que indica que el virus se replicó selectivamente en los tejidos tumorales. La figura 11B es un gráfico que representa la cuantificación de GM-CSF expresado por virus en tejidos mediante el ensayo ELISA de la expresión del transgén de hGMCSF. De acuerdo con los datos de replicación viral obtenidos mediante el análisis de placa, el nivel de hGMCSF fue el más alto y duró más de 8 días en el tejido tumoral. Estos datos demostraron que el virus NDV se replicó de manera eficaz en el tejido tumoral y que el transgén se administró de manera eficaz al tejido tumoral local.

La figura 11C representa gráficos que muestran el efecto de la expresión de mGM-CSF en la inhibición del crecimiento tumoral en el modelo de tumor de ratón con xenoinjerto HT1080. Ratones desnudos atímicos de 5-6 semanas en grupos de siete se implantaron subcutáneamente (s.c.) con 5×10^6 células HT1080 en el flanco derecho. Cuando los tumores alcanzaron un volumen de 110 mm³ (día 6), el tumor se inyectó con una dosis única de 1×10^8 pfu rNDV, R116i-198RSV con mGM-CSF o hGM-CSF. El tamaño del tumor se midió cada 3-4 días. R116i-198RSV con mGM-CSF fue menos potente en la inhibición del crecimiento tumoral que el transgén hGMCSF. Sin embargo, no se observó diferencia en la inhibición del crecimiento tumoral para S116 con hGM-CSF o mGM-CSF.

La figura 11D muestra gráficas que muestran el efecto de mGM-CSF en la eliminación del virus de los tumores en el modelo de tumor de ratón con xenoinjerto HT1080. Los ratones atímicos desnudos en grupos de tres se implantaron por vía subcutánea (s.c.) con 5×10^6 células HT1080 en el flanco derecho. Cuando los tumores alcanzaron un volumen de 180 mm^3 (día 10), los ratones se trataron por vía intravenosa con una dosis de 1×10^8 pfu de R116i-198RSV o S116KM. Los tumores se recogieron el día 4 o 7 y los títulos víricos en el tejido tumoral se determinaron mediante un ensayo de placa. Tanto R116i-198RSV como S116KM con ya sea mGM-CSF o hGM-CSF tuvieron un título comparable en el día 4. En el día 7, R116i-198RSV con mGM-CSF se redujo considerablemente en comparación con R116i-198RSV con hGM-CSF. En comparación, los títulos de S116 mGM-CSF y hGM-CSF fueron comparables.

La figura 11E muestra un gráfico que muestra el efecto de la infección por R116i-198RSV o S116KM en la infiltración de células inmunes en tumores en el modelo de tumor de ratón con xenoinjerto HT1080. Los ratones atímicos desnudos en grupos de tres se implantaron por vía subcutánea (s.c.) con 5×10^6 células HT1080 en el flanco derecho. Cuando los tumores alcanzaron un volumen de 180 mm^3 (día 10), los ratones se trataron por vía intravenosa con una dosis de 1×10^8 pfu de virus según lo indicado. Los tumores se recolectaron el día 4 y los tejidos se procesaron para determinar la tinción de neutrófilos, células NK y macrófagos mediante análisis FACS. R: R116i-198-RSV, S: S116-KM. R116i-198RSV con mGM-CSF tuvo más infiltración de células inmunes.

La figura 11F muestra una tabla que muestra que las citoquinas y las quimioquinas tenían regulada la expresión en el modelo de tumor de ratón con xenoinjerto HT1080. Los ratones atímicos desnudos en grupos de tres se implantaron por vía subcutánea (s.c.) con 5×10^6 células HT1080 en el flanco derecho. Cuando los tumores alcanzaron un volumen de 180 mm^3 (día 10), los ratones se trataron por vía intravenosa con una dosis de 1×10^8 pfu de R116i-198RSV o S116KM con hGM-CSF o mGM-CSF. Los tumores se recolectaron el día 4 y los tejidos se procesaron para determinar los niveles de citoquinas y quimioquinas mediante análisis Luminex. La infección por virus indujo la producción de citoquinas y quimioquinas en los tejidos tumorales locales, sus niveles variaron según la columna vertebral del virus y el GM-CSF humano o de ratón.

La figura 11G representa un gráfico que muestra que R116i-198RSV-hGM-CSF y R116i-318APMV-hGM-CSF fueron comparables en la inhibición del crecimiento tumoral en el modelo de tumor de ratón con xenoinjerto HT1080. Ratones desnudos atímicos en grupos de siete se implantaron subcutáneamente (s.c.) con 5×10^6 células HT1080 en el flanco derecho. Cuando los tumores alcanzaron un volumen de aproximadamente 110 mm^3 (día 6), se inyectó por vía intratumoral una dosis única de virus a 1×10^8 pfu. El tamaño del tumor se midió cada 3-4 días y se graficó. La longitud de inserción de 198 y 318nt no afectó la actividad oncolítica de R116i.

Las figuras 12A y la figura 12B representan la construcción del ADNc del antigenoma de 73T que contiene los genes F y/o HN quiméricos y su caracterización, y la figura 12C compara la función de la actividad del complejo de la ARN polimerasa. Las glucoproteínas de la superficie viral son antígenos importantes para la inmunogenicidad y la virulencia en los pollos. Los genes F y/o HN de NDV fueron reemplazados por los correspondientes dominios extracelulares (ecto) de otros paramixovirus que no son virulentos en pollos individualmente o en combinación. El virus de la parainfluenza 5 (PIV 5) es un paramixovirus canino y no causa enfermedades en humanos, y se ha demostrado que el paramixovirus de paloma tipo 1 (PPMV-1) no es virulento en los pollos. La figura 12A muestra que los ectodominios de las glucoproteínas F y/o HN de los ADNc antigenómicos de NDV 73T de longitud completa se reemplazaron con los de PPMV-1 y/o PIV5. Las secuencias NDV, PIV5 y PPMV-1 se indican con recuadros de colores como azul, púrpura o verde, respectivamente. Se indican las longitudes de aminoácidos de proteínas individuales o dominios de proteínas. La figura 12B es una tabla que muestra la caracterización de derivados 73T que contienen genes F y/o HN quiméricos. La formación de placa en Vero, la muerte de células HT1080 relativa y MDT se realizaron como se describió anteriormente. Los virus quiméricos, excepto para PVI-5 F-HN, se recuperaron y crecieron en las células en ausencia de tripsina exógena. Los tres virus formaron placas de buen tamaño y mostraron una propagación eficiente de célula a célula. Los virus quiméricos PPMV-1 F-HN o F tuvieron un valor de MDT de 79 y 84 h, respectivamente, lo que indica una posible virulencia en los pollos. El virus quimérico PPML-1 destruyó las células HT1080 de manera eficiente a niveles de 71 y 61%. La quimera PIV5-F no creció en los huevos y no fue virulenta en los pollos, pero mató las células HT1080 al 47%. La reactividad cruzada del suero entre las quimeras NDV y PPMV-1 o PIV5 se examinó mediante un ensayo de neutralización usando el suero recogido de ratones que se administraron por vía intravenosa con 2 dosis de 1×10^8 PFU de r73T-R116i. El virus r73T puede ser neutralizado por el suero infectado con NDV (título 960) mientras que las quimeras PPMV-1 y PIV5 no se neutralizaron (título < 4), lo que confirma que no hay reactividad cruzada entre NDV y PPMV-1 o PIV5. Los virus quiméricos con antigenicidad distinta podrían ser para estimular los virus oncolíticos en pacientes para los cuales se han desarrollado respuestas inmunes anti-NDV durante el tratamiento previo de NDV.

La figura 12C muestra la comparación de la actividad de la ARN polimerasa del NDV con otros paramixovirus mediante un ensayo minigenoma. Las células que expresan T7 se transfectaron con los tres plásmidos que expresan las proteínas NP, P, L del NDV y el plásmido que codifica el ADNc antiminogenómico del NDV que codifica el gen GFP usando Lipofectamine 2000, o los plásmidos que codifican los genes N, P, L del virus del sarampión (MV) o virus sincitial respiratorio (RSV) y el respectivo plásmido de ADNc anti-minigenoma de RSV o MV GFP. Dos o tres días después de la transfección, la replicación del minigenoma como se indica mediante la expresión de

proteínas GFP se examinó bajo un microscopio fluorescente. El NDV tuvo la actividad de polimerasa más fuerte en comparación con el virus del sarampión y el RSV.

Las figuras 13A y B muestran la sensibilidad de la línea celular del cáncer a las variantes de rNDV. Las líneas celulares de cáncer de diversos tejidos de origen se infectaron con NDV S116 o NDV R116i a una MOI de 0.1 y la viabilidad celular se evaluó 72 horas posteriores a la infección usando Cell Titre Glo. La sensibilidad al NDV se define como una muerte de células superior al 30% a las 72 horas después a la infección. La figura 13A representa un gráfico del porcentaje de líneas celulares de cáncer humano sensibles al NDV en un mínimo de 16 indicaciones generales. Los números de líneas celulares dentro de cada grupo se indican numéricamente y en la tabla. La figura 13B representa un gráfico de la sensibilidad de 22 líneas celulares de cáncer a variantes de NDV. El % de muerte celular se determina como un porcentaje de células de control no tratadas.

La figura 14 son gráficos que muestran la permisividad de las líneas celulares de cáncer a recNDV^{GM-CSF}. La muerte celular de R116i-GM-CSF en líneas celulares tumorales representativas se presenta en la figura 14. El % máximo de muerte se determinó 3 días posteriores a la infección de líneas celulares tumorales con respecto al control no infectado a MOI de 0.1. Aunque ciertas líneas celulares se derivaron de los mismos tipos de tumores, tal como los cánceres de vejiga, gástricos, próstata, melanoma, mama, ovario, páncreas y pulmón, mostraron una sensibilidad diferente a la muerte del virus. Los números de líneas celulares de cada indicación de tumor que se pueden eliminar por R116i-GM-CSF a una tasa de > 50% se resumen en la tabla 1.

Las figuras 15A-F son gráficas que muestran que los derivados del NDV inhiben el crecimiento del tumor en diferentes modelos de cáncer de ratón.

Las figuras 15A y 15B son gráficos que muestran que las cepas recNDV^{GM-CSF} inhiben el crecimiento tumoral en el modelo de melanoma de ratón singénico (B16F10 AP3). 73T-R116i-hGM-CSF (Figura 15A a la izquierda) y R116i-mGM-CSF (Figura 15A a la derecha) fueron evaluados por su efecto oncolítico en el modelo de melanoma B16 en un estudio piloto. Como se evaluó la tolerabilidad del virus en el ratón B16, el tamaño del grupo fue pequeño (n = 3). Cada virus se administró por vía intravenosa (i.v) a 2×10^7 pfu dos veces en los días 11 y 14; por vía intraperitoneal (i.p.) a 2×10^7 pfu dos veces en los días 11 y 14; o por vía intratumoral (i.t.) una vez a 1.1×10^7 pfu el día 11. Los grupos tratados con R116-hGM-SCF o mGM-SCF por las tres vías de administración tuvieron una tasa de crecimiento tumoral más lenta en comparación con el grupo sin tratar. Las tasas de inhibición del tumor fueron estadísticamente significativas en el grupo control.

La figura 15B muestra un estudio de eficacia en el modelo de melanoma murino singénico B16F10 con administración intratumoral de 1×10^8 pfu de variantes de S116 NDV. La inhibición del crecimiento tumoral se muestra en el panel izquierdo y las mediciones individuales de los animales se muestran en el panel central y el gráfico de supervivencia se muestra a la derecha.

La figura 15C muestra que el NDV tiene una potente actividad antitumoral en el modelo de tumor colorrectal CT26 de ratón inmunocompetente. En particular, la figura 15C proporciona un estudio de eficacia en el modelo colorrectal murino singénico CT26 con administración intratumoral de 1×10^8 pfu de la variante de R116 NDV que codifica GM-CSF humano. La inhibición del crecimiento tumoral se muestra en el panel derecho y el análisis de IHC del tumor restante se muestra en el lado derecho con tinción de H&E y NDV. Se indican áreas necróticas, evidencia de sincitios multinucleados y áreas viables de tumores.

Las figuras 15D-F representan la inhibición del crecimiento tumoral en el modelo de xenoinjerto ovárico. Los ratones atímicos desnudos se implantaron subcutáneamente (s.c.) con células Ovar4 en el flanco derecho. Cuando los tumores alcanzaron un volumen de 100 mm^3 , los ratones se asignaron al azar a grupos de tratamiento. Los tumores establecidos se inyectaron una vez a la semana con 2.5×10^7 pfu rNDV, R116i-318 con mGM-CSF o hGM-CSF. Se muestran las curvas de crecimiento tumoral (Figura 15D) y los análisis histológicos de los tumores (Figura 15E y Figura 15F).

La figura 16 es una tabla que resume las características de las construcciones de NDV. Formación de placa en células Vero sin tripsina en el revestimiento después de 36 horas de incubación y visualizada con un aumento de $\times 10$. Efecto de la citotoxicidad de los virus en células de fibrosarcoma humano HT1080 posteriores a la infección en multiplicidades de infección (MOI) de 0.01 a las 72 horas posteriores a la infección. El porcentaje relativo de células supervivientes se determina comparando cada muestra con células no tratadas que se consideraron 100% viables. Los datos presentados en la tabla son porcentajes relativos de células muertas. Patogenicidad de NDV en pollos libres de patógenos de 1 día por el índice de patogenicidad intracerebral (ICPI). El ensayo ICPI se realizó en National Veterinary Service Laboratories (NVSL) (Ames, Iowa).

La figura 17 es un gráfico que muestra que el NDV producido a partir de huevos y líneas celulares humanas presentó una sensibilidad diferente para complementar la inactivación mediada. El suero humano con actividad de complemento (C') confirmada (Sigma, St. Louis, MO) se diluyó en serie con PBS y se incubó con 100 pfu de NDV durante 1 hora a 37°C antes de infectar las células Vero para el ensayo de placa. Tras la incubación a 37°C , durante 6 días, las placas se visualizaron mediante tinción con cristal violeta y se puntuaron. El virus cultivado en

huevos de pollo embrionados se desactivó principalmente con suero diluido de 1:10 a 1:40. El virus crecido 293 fue más resistente a C' que el virus cultivado en huevos, se mantuvo aproximadamente el 40% de la infectividad a una concentración sérica de 1:40. Sin embargo, el virus crecido en Hela fue más resistente a la inactivación viral mediada por C'. Aproximadamente el 90% del virus vivo fue infeccioso a una concentración sérica de 1:40.

- 5 Las figuras 18A y 18B son transferencias de Western que muestran comparaciones de los niveles de proteína RCA en células 293 y Hela y en virus producidos a partir de estas dos líneas celulares. Para la figura 18A, una cantidad igual de células 293 y Hela S3 se cargaron en la SDS-PAGE para transferencia de Western. Las células Hela contenían niveles más altos de proteínas hCD46, hCD55 y hCD59 que las células 293. La figura 18B muestra una transferencia Western que se realizó para examinar las cantidades de proteína en el virus de las células 293 o Hela infectadas. Las células no infectadas (simulacros) se sirvieron como controles. Las tres moléculas de CD se detectaron en virus de las células Hela infectadas a niveles más altos que los de las células 293.

- 10 La figura 19 muestra la evaluación de las proteínas reguladoras de C unidas a membrana (RCA) en la inactivación viral mediada por C'. El ADNc que codifica hCD55, hCD59 y hCD46 fue sintetizado por Origene (Rockville, MD) o Genscript (Piscataway, NJ). Cada casete génico se insertó en la región intergénica P-N del ADNc antígeno del NDV y los virus recombinantes se generaron mediante genética inversa. Los virus recombinantes se amplificaron en huevos y se purificaron con un gradiente de sacarosa del 15-60% y la banda viral se sedimentó mediante ultracentrifugación. La expresión de cada proteína RCA por NDV recombinante se confirmó mediante transferencia de Western.

- 15 La figura 20 es una gráfica que muestra que CD55 es una proteína RCA importante para prevenir la inactivación de NDV por C'. El NDV con hCD46, hCD55 o hCD59 se amplificó en huevos, se purificó por gradiente de sacarosa, se incubó con plasma humano diluido de 1:10 a 1:40 durante 1 hora y se examinó la infectividad viral mediante ensayo de placa en células Vero. El NDV con hCD55 producido en huevos tuvo una resistencia similar a la de C' en comparación con el NDV producido en células Hela, aproximadamente un 65% de virus viables a una concentración plasmática de 1:20 y -80% de virus viables a una concentración plasmática de 1:40. El hCD46 pareció mejorar ligeramente o marginalmente la resistencia viral a la inactivación mediada por C', aproximadamente un 20% más de virus viables cuando se incubó con plasma humano diluido 1:40 en comparación con el control del NDV. No se detectó ninguna diferencia con una dilución más baja del plasma.

Descripción detallada

- 20 La presente divulgación presenta composiciones que comprenden un virus de la enfermedad de Newcastle atenuado y métodos para usar ese virus para el tratamiento de la neoplasia.

- 25 La presente divulgación se basa, al menos en parte, en el descubrimiento de un NDV oncolítico con una virulencia reducida en pollos. Como se describe con más detalle a continuación, la cepa NDV 73T se derivó de NDV MK-107, que es una vacuna comercial para aves (mesogénica) comercializada por primera vez en 1948. La cepa NDV MK-107 se mantuvo a través de 73 pasajes en células de tumor de ascitis de Ehrlich (Cassel et al., Cancer. 1965 Jul; 18:863-8). NDV MK-107 se usó en una serie de estudios clínicos de Ph I y Ph II en la década de 1970. NDV MK-107 también se usó en la década de 1980 como un tratamiento inmunoterapéutico para tratar pacientes con melanoma en etapa tardía (Cassel et al., Cancer. 1983 1;52:856-860; Murray et al., Cancer. 1977. 40:680-686).

- 30 Para generar un NDV oncolítico con virulencia en el pollo reducida, la cepa NDV 73T recombinante incluye ciertas modificaciones genéticas. En particular, se alteró la secuencia de escisión de la proteína F y se aumentó la longitud de la secuencia intergénica HN-L. Ventajosamente, el virus modificado se puede usar para expresar un(os) transgén(es) de interés. También se describe en este documento, cuando la cepa NDV 73T incluye un transgén que codifica un polipéptido que mejora las propiedades oncolíticas de NDV recombinante. También se describe en este documento, cuando la cepa NDV 73T incluye un transgén que codifica un biomarcador que proporciona una lectura útil para controlar la replicación del virus. Si se desea, la cepa NDV 73T se puede modificar para incorporar información genética adicional que interrumpa la polaridad transcripcional normal del genoma estándar y se espera que reduzca aún más la virulencia viral en pollos. De acuerdo con lo anterior, la presente divulgación proporciona un virus de la enfermedad de Newcastle recombinante (NDV) generado mediante el uso de genética inversa para reducir su patogénesis en pollos mientras mantiene su capacidad selectiva de muerte de células cancerosas y los métodos de producción de dicho virus. La presente divulgación también proporciona la construcción y el uso de NDV como un vector viral para administrar y expresar productos genéticos heterólogos para un tratamiento mejorado del cáncer. Los transgenes que codifican agentes terapéuticos de ejemplo que pueden ser administrados por NDV se describen a continuación en este documento. En los ejemplos de trabajo descritos a continuación en este documento, las construcciones virales de NDV nuevas que expresan el factor estimulante de colonias de macrófagos de granulocitos (GM-CSF) mataron selectivamente las células cancerosas, pero no mataron las células normales. Este efecto selectivo de muerte de células cancerosas se observó en una serie de líneas celulares de cáncer, así como in vivo cuando se probó en el modelo de tumor xerograft HT1080. La eficacia y selectividad del virus de la enfermedad de Newcastle atenuado recombinante (NDV) también se demostró en un modelo de melanoma en el que se observó regresión del tumor. En resumen, la presente divulgación proporciona la inserción

de un(os) transgén (es) específico (s) en un vector NDV atenuado recombinante y la expresión eficaz de la proteína codificada en un entorno tumoral.

Virus de la enfermedad de Newcastle

El virus de la enfermedad de Newcastle (NDV) es un virus envuelto que contiene un genoma de ARN de sentido negativo lineal, monocatenario, no segmentado. El genoma de NDV monocatenario de sentido negativo codifica una ARN polimerasa dirigida por ARN, una proteína de fusión (F), una proteína hemaglutinina-neuraminidasa (HN), una proteína de matriz, una fosfoproteína y una nucleoproteína. El ARN genómico contiene genes en el siguiente orden: 3'-NP-P-M-F-HN-L.

La organización del genoma de ARN de NDV se describe con mayor detalle en este documento a continuación. El ARN genómico también contiene una secuencia líder en el extremo 3'.

Los elementos estructurales del virión incluyen la envoltura del virus que es una bicapa lipídica derivada de la membrana plasmática celular. La glucoproteína, hemaglutinina-neuraminidasa (HN), sobresale de la envoltura y permite que el virus contenga actividades tanto de hemaglutinina como de neuraminidasa. La glucoproteína de fusión (F), que es una proteína de membrana integral, se produce primero como un precursor inactivo y luego se escinde después de la traducción para producir dos polipéptidos unidos por disulfuro. La proteína F activa participa en la penetración de NDV en las células huésped al facilitar la fusión de la envoltura viral con la membrana plasmática de la célula huésped. La proteína de la matriz (M) está implicada con el ensamblaje viral e interactúa tanto con la membrana viral así como con las proteínas de la nucleocápsida.

La subunidad de la proteína principal de la nucleocápsida es la proteína de la nucleocápsida (NP) que confiere simetría helicoidal a la cápside. En asociación con la nucleocápsida están las proteínas P y L. Se cree que la fosfoproteína (P), que está sujeta a la fosforilación, desempeña un papel regulador en la transcripción, y también puede estar implicada en la metilación, la fosforilación y la poliadenilación. El gen L, que codifica una ARN polimerasa dependiente de ARN, se requiere para la síntesis de ARN viral junto con la proteína P. La proteína L, que ocupa casi la mitad de la capacidad de codificación del genoma viral, es la más grande de las proteínas virales y desempeña un papel importante tanto en la transcripción como en la replicación.

La replicación de todos los virus de ARN de cadena negativa, incluido el NDV, se complica por la ausencia de maquinaria celular requerida para replicar el ARN. Adicionalmente, el genoma de la cadena negativa no se puede traducir directamente a la proteína, pero primero se debe transcribir en una copia de la cadena positiva (ARNm). Por lo tanto, tras la entrada en una célula huésped, el ARN genómico solo no puede sintetizar la ARN polimerasa dependiente de ARN requerida. Las proteínas L, P y NP deben ingresar a la célula junto con el genoma en el momento de la infección.

Sin estar ligado a la teoría, se plantea la hipótesis de que la mayoría o la totalidad de las proteínas virales que transcriben el ARNm de NDV también llevan a cabo la replicación. El mecanismo que regula los usos alternativos (esto es, la transcripción o la replicación) del mismo complemento de proteínas no se ha identificado claramente. Directamente después de la penetración del virus, la transcripción es iniciada por la proteína L usando el ARN de sentido negativo en la nucleocápsida como plantilla. La síntesis de ARN viral se regula de manera tal que produce ARNm monocistronicos durante la transcripción. Después de la transcripción, la replicación del genoma del virus es el segundo evento que ocurre posteriores a la infección de una célula por virus de ARN de cadena negativa. Al igual que con otros virus de ARN de cadena negativa, la replicación del genoma viral del virus de la enfermedad de Newcastle (NDV) está mediada por proteínas específicas del virus. Los primeros productos de la síntesis de ARN replicativo son copias complementarias (esto es, polaridad positiva) de ARN del genoma de NDV (ARNc). Estas copias de cadena positiva (antigenomas) difieren de los transcritos de ARNm de cadena positiva en la estructura de sus extremos. A diferencia de los transcritos de ARNm, los ARNc antigenómicos no están limitados y metilados en los extremos 5', y no están truncados y poliadenilados en los extremos 3'. Los ARNc son coterminales con sus plantillas de cadena negativa y contienen toda la información genética en cada segmento de ARN genómico en forma complementaria. Los ARNc sirven como plantillas para la síntesis de genomas virales de cadena negativa de NDV (ARNv).

Tanto los genomas de cadena negativa de NDV (ARNv) como los antigenomas (ARNc) están encapsidados por proteínas de nucleocápsida; Las únicas especies de ARN no encapsidadas son los ARNm de virus. Para el NDV, el citoplasma es el sitio de la replicación del ARN del virus, al igual que el sitio para la transcripción. El ensamblaje de los componentes virales probablemente tenga lugar en la membrana plasmática de la célula huésped. Luego el virus maduro es liberado de la célula por germinación.

Virus oncolíticos

Se sabe que los virus ejercen efectos oncolíticos sobre células tumorales y se ha informado el uso de virus oncolíticos como agentes terapéuticos. Se han realizado algunos esfuerzos para usar virus no humanos que presentan una patogenicidad media a alta para sus huéspedes naturales en el tratamiento de pacientes con cáncer.

La presente divulgación proporciona métodos para inducir la regresión de tumores en sujetos humanos, los métodos usan una cepa mesogénica modificada del virus de la enfermedad de Newcastle (NDV) con un sitio modificado de escisión de la proteína F, que no es patógeno para las aves de corral (lentogénico), pero presenta propiedades oncolíticas. Los métodos descritos proporcionan medios seguros, eficaces y fiables para inducir la regresión de un tumor en un individuo que lo necesite. Estos métodos superan los inconvenientes del uso de cepas patógenas de virus para la terapia humana.

Las presentes descripciones también proporcionan un método para inducir la regresión de un tumor en un sujeto, el método comprende la etapa de administrar al sujeto una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de una cepa oncolítica lentogénica de NDV. También se describe en este documento, cuando la cepa oncolítica lentogénica de NDV es NDV r73T-R116.

Los virus oncolíticos son capaces de ejercer un efecto citotóxico o letal in vitro e in vivo sobre células tumorales con poco o ningún efecto sobre las células normales. El término "actividad oncolítica" se refiere a la actividad citotóxica o letal de un virus que se dirige a las células tumorales. Sin desear estar unido a cualquier mecanismo de acción,

la actividad oncolítica ejercida por una cepa lentogénica de NDV (por ejemplo, r73T-R116), probablemente se deba principalmente a la apoptosis celular y, en menor medida, a la lisis de la membrana plasmática, esta última se acompaña de la liberación de la progenie viable en el medio celular que posteriormente infecta las células adyacentes. Sin desear estar ligado a una teoría particular, se cree que el NDV tiene una actividad citolítica directa sobre las células cancerosas. También se cree que el NDV es capaz de diferenciar específicamente las células cancerosas de las células normales y sanas. Los resultados han indicado que varios oncogenes (H-ras, N-ras, y N-myc) que se sabe que confieren un comportamiento maligno a las células cancerosas, aumentan la susceptibilidad de las células a la muerte por el NDV. Véase Lorence, R. M., Reichard, K. W., Cascino, C. J. et al. (1992) Proc. Am. Assoc. Cancer Res., 33, 398; Reichard, K. W., Lorence, R. M., Cascino, C. J., et al. (1992) Surg. Forum, 43, 603-606. Además, se ha observado que el tratamiento de las células con ácido retinoico (vitamina A) también mejora la lisis de las células cancerosas por el NDV. Reichard, K. W., Lorence, R. M., Katubig, B. B., et al. (1993) J. Pediatr. Surg., 28, 1221.

Los efectos citotóxicos en condiciones in vitro o in vivo se pueden detectar por diversos medios conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante la inhibición de la proliferación celular, detectando el tamaño del tumor usando la exploración con MRI realizada con gadolinio, mediante la radiomarcación de un tumor, y similares.

Para estudios clínicos, es deseable obtener un virus clonal para asegurar la homogeneidad del virus. El virus clonal se puede producir según cualquier método disponible para el experto en el arte. Por ejemplo, el virus clonal se puede producir limitando la dilución o mediante la purificación de la placa.

Cultivo de NDV

El virus descrito en este documento se puede preparar mediante una variedad de métodos. Por ejemplo, el NDV se puede preparar en huevos de pollo fertilizados de 8 a 10 días (obtenidos de SPAFAS, Inc., Roanoke, 111.). Los métodos para aislar el virus son conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, por Weiss, S. R. & Bratt, M. A. (1974) J. Virol, 13, 1220-1230. Este método se describe con más detalle en el Ejemplo # 1 a continuación. Usando este método de aislamiento, se puede obtener NDV que tiene es una pureza aproximada del 90-95%.

Como alternativa, el virus se puede preparar en un cultivo celular in vitro. Preferiblemente, el cultivo celular comprende células de mamífero, y más preferiblemente, las células se pueden usar para la fabricación de virus tales como células Vero. Los virus serán purificados por cromatografía u otros métodos apropiados. Las células pueden ser dependientes del anclaje o independientes del anclaje.

Las técnicas de cultivo celular que se pueden emplear en la preparación de virus son conocidas en la técnica y pueden incluir el uso de matraces de cultivo estacionarios con grandes áreas de superficie o matraces de tipo cilindro. Preferiblemente, el tipo de sistema de cultivo seleccionado puede soportar un número relativamente grande de células. Para producir una gran cantidad de virus, se implementará un procedimiento de biorreactor mientras que las células se cultivan en perlas de microportador para la infección y producción del virus.

Los medios de cultivo celular que se pueden emplear en la producción de virus son conocidos para los expertos en el arte. El medio por lo general incluye una fuente de nutrientes, antibiótico (s) y albúmina o una fuente de suero que contiene factor (es) de crecimiento. Está dentro de la experiencia en la técnica seleccionar medios particulares y constituyentes medios apropiados para las células empleadas en el cultivo. La tripsina puede o no estar incluida en los medios de crecimiento. Las condiciones de cultivo por lo general incluyen la incubación a una temperatura deseada (tal como 37 °C), así como concentraciones seleccionadas de oxígeno y dióxido de carbono. Las condiciones de cultivo particulares seleccionadas se pueden determinar de acuerdo con las células empleadas en el cultivo, y la determinación de tales condiciones está dentro de la experiencia en la técnica.

Las células se colocan en el recipiente de cultivo y se dejan incubar y crecer en las condiciones de cultivo seleccionadas. Preferiblemente, se permite que las células dependientes de anclaje crezcan hasta confluencia o crecimiento máximo. El tiempo requerido para el crecimiento variará dependiendo del tamaño del inóculo celular inicial añadido al recipiente de cultivo y del tiempo de duplicación de la línea celular que se está empleando.

- 5 Preferiblemente, aproximadamente 3×10^3 a aproximadamente 3×10^5 células se siembran por cm^2 y se cultivan durante uno a cinco días. Para la inoculación de virus del cultivo celular, el medio se elimina de las células (para las células adherentes, por aspiración del medio de cultivo; para las células cultivadas en suspensión, por centrifugación de la suspensión celular y la aspiración del sobrenadante celular) y el virus (después de la reconstitución) se añade a las células en un volumen mínimo de medio o solución salina (tal como la solución salina equilibrada de Hank, Gibco) para prevenir la deshidratación. Preferiblemente, este volumen varía desde aproximadamente 10 a aproximadamente 2500 microlitros por cm^2 de superficie de vaso de cultivo o 10^5 células. La dilución preferida del inóculo del virus varía desde aproximadamente 0.001 a aproximadamente 10 unidades infecciosas por célula, dependiendo de la proporción óptima del virus y la línea celular particular. El virus se cultiva luego de desde aproximadamente 1 a 7 días, el tiempo se determina principalmente por la supervivencia residual de la línea celular.
- 15 Para el NDV, el tiempo óptimo de recolección es de 1 a 5 días después de la inoculación del virus.

El virus se puede recoger luego mediante cualquiera la eliminación del sobrenadante y reemplazándolo con medio fresco o medio fresco con células frescas a intervalos de 12 a 48 horas o congelando y descongelando las células para liberar el virus en el sobrenadante. El sobrenadante se puede entonces centrifugar.

- 20 y ultracentrifugar para recuperar el virus en forma relativamente pura o por métodos de cromatografía. La pureza de la preparación viral se puede probar por determinación de proteínas y/o por electroforesis. Luego, el virus se puede añadir a un portador farmacéuticamente aceptable, descrito más adelante.

Terapia

- 25 La terapia se puede proporcionar dondequiera que se realice la terapia contra el cáncer: en casa, en el consultorio del médico, en una clínica, en el departamento de pacientes ambulatorios de un hospital o en un hospital. La presente divulgación también proporciona el uso de un virus de la enfermedad de Newcastle (NDV) (por ejemplo, r73T-R116).

- 30 El tratamiento generalmente comienza en un hospital para que el médico pueda observar de cerca los efectos de la terapia y hacer los ajustes necesarios. La duración de la terapia depende del tipo de cáncer que se está tratando, la edad y el estado del paciente, la etapa y el tipo de enfermedad del paciente y la forma en que el cuerpo del paciente responde al tratamiento. La administración del fármaco se puede realizar a diferentes intervalos (por ejemplo, diaria, semanal o mensualmente). La terapia se puede administrar en ciclos de encendido y apagado que incluyen períodos de descanso para que el cuerpo del paciente tenga la oportunidad de desarrollar nuevas células sanas y recuperar su fuerza.

- 35 Según el tipo de cáncer y su etapa de desarrollo, la terapia se puede usar para retardar la propagación del cáncer, para retardar el crecimiento del cáncer, para matar o detener las células cancerosas que pueden haberse propagado a otras partes del cuerpo desde el tumor original, para aliviar los síntomas causados por el cáncer, o para prevenir el cáncer en primer lugar. El crecimiento del cáncer es incontrolado y progresivo, y se produce en condiciones que no provocan, o causan el cese de, la multiplicación de células normales.

- 40 Como se describió anteriormente, si se desea, el tratamiento con una composición descrita en este documento se puede combinar con terapias para el tratamiento de enfermedades proliferativas (por ejemplo, radioterapia, cirugía o quimioterapia).

Formulación de composiciones farmacéuticas

- 45 La administración de un virus descrito en este documento (por ejemplo, NDV r73T-R116) para el tratamiento de tumores puede ser por cualquier medio apropiado que resulte en una concentración del agente terapéutico que, combinado con otros componentes, sea eficaz para prevenir, mejorar, o reducir tumores. El agente puede estar contenido en cualquier cantidad apropiada en cualquier sustancia portadora apropiada, y generalmente está presente en una cantidad de 1-95% en peso del peso total de la composición. La composición se puede proporcionar en una forma de dosificación que es

- 50 apropiado para la vía de administración parenteral (por ejemplo, subcutánea, intravenosa, intramuscular o intraperitoneal). Las composiciones farmacéuticas se pueden formular según la práctica farmacéutica convencional (véase, por ejemplo, Remington: The Science and Practice of Pharmacy (20th ed.), ed. A. R. Gennaro, Lippincott Williams & Wilkins, 2000 y Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, eds. J. Swarbrick and J. C. Boylan, 1988-1999, Marcel Dekker, New York).

- 55 Las composiciones farmacéuticas descritas en este documento se pueden formular para liberar el compuesto activo sustancialmente inmediatamente después de la administración o en cualquier momento predeterminado o período

de tiempo después de la administración. Los últimos tipos de composiciones se conocen generalmente como formulaciones de liberación controlada, que incluyen (i) formulaciones que crean una concentración sustancialmente constante del fármaco dentro del cuerpo durante un período prolongado de tiempo; (ii) formulaciones que después de un tiempo de retraso predeterminado crean una concentración sustancialmente constante del fármaco dentro del cuerpo durante un período prolongado de tiempo; (iii) formulaciones que mantienen la acción durante un período de tiempo predeterminado al mantener un nivel relativamente constante y efectivo en el cuerpo con una minimización concomitante de efectos secundarios no deseados asociados con las fluctuaciones en el nivel plasmático de la sustancia activa (patrón cinético del diente de sierra); (iv) formulaciones que localizan la acción mediante, por ejemplo, la colocación espacial de una composición de liberación controlada adyacente a o en un sarcoma (v) formulaciones que permiten una dosis conveniente, de modo que las dosis se administran, por ejemplo, una vez cada una o dos semanas; y (vi) formulaciones que se dirigen a células neoplásicas en proliferación usando portadores o derivados químicos para administrar el agente terapéutico a una célula de sarcoma. Para algunas aplicaciones, las formulaciones de liberación controlada evitan la necesidad de una dosificación frecuente durante el día para mantener el nivel de plasma a un nivel terapéutico.

Se puede seguir cualquiera de una serie de estrategias para obtener una liberación controlada en la que la tasa de liberación sea mayor que la tasa de metabolismo del compuesto en cuestión. En un ejemplo, la liberación controlada se obtiene mediante la selección apropiada de diversos parámetros e ingredientes de formulación, que incluyen, por ejemplo, diversos tipos de composiciones y recubrimientos de liberación controlada. De este modo, el agente terapéutico se formula con excipientes apropiados en una composición farmacéutica que, al administrarse, libera el agente terapéutico de manera controlada. Los ejemplos incluyen composiciones de comprimidos o cápsulas de unidad única o múltiple, soluciones de aceite, suspensiones, emulsiones, microcápsulas, microesferas, complejos moleculares, nanopartículas, parches y liposomas.

Una composición descrita en este documento se puede administrar dentro de un diluyente, portador o excipiente farmacéuticamente aceptable, en forma de dosificación unitaria. Se puede emplear la práctica farmacéutica convencional para proporcionar formulaciones o composiciones apropiadas para administrar los compuestos a pacientes que padecen una enfermedad causada por una proliferación celular excesiva. La administración puede comenzar antes de que el paciente sea sintomático.

Se puede emplear cualquier vía de administración apropiada, por ejemplo, la administración puede ser parenteral, intravenosa, intraarterial, subcutánea, intratumoral, intramuscular, intracraneal, intraorbital, oftálmica, intraventricular, intrahepática, intracapsular, intratecal, intracisternal, intraperitoneal, intranasal, aerosol, supositorio, o administración oral. Por ejemplo, las formulaciones terapéuticas pueden estar en forma de soluciones o suspensiones líquidas; para administración oral, las formulaciones pueden estar en forma de comprimidos o cápsulas; y para formulaciones intranasales, en forma de polvos, gotas nasales o aerosoles. Para cualquiera de los métodos de aplicación descritos anteriormente, una composición descrita en este documento se administra de forma deseable por vía intravenosa o se aplica al sitio del evento de apoptosis necesario (por ejemplo, mediante inyección).

Los métodos bien conocidos en la técnica para hacer formulaciones se encuentran, por ejemplo, en "Remington: The Science and Practice of Pharmacy" Ed. A. R. Gennaro, Lippincourt Williams & Wilkins, Philadelphia, Pa., 2000. Las formulaciones para administración parenteral pueden, por ejemplo, contener excipientes, agua estéril o solución salina, polialquilenglicoles tal como polietilenglicol, aceites de origen vegetal o naftalenos hidrogenados. Se pueden usar polímeros de lactida biocompatibles y biodegradables, copolímeros de lactida/glicolida o copolímeros de polioxietileno-polioxipropileno para controlar la liberación de los compuestos. Otros sistemas de administración parenteral potencialmente útiles para administrar agentes incluyen partículas de copolímero de etileno-acetato de vinilo, bombas osmóticas, sistemas de infusión implantables y liposomas. Las formulaciones para inhalación pueden contener excipientes, por ejemplo, lactosa, o pueden ser soluciones acuosas que contienen, por ejemplo, polioxietilén-9-lauril éter, glicocolato y desoxicocolato, o pueden ser soluciones oleosas para administración en forma de gotas nasales, o como gel.

Las formulaciones se pueden administrar a pacientes humanos en cantidades terapéuticamente eficaces (por ejemplo, cantidades que previenen, eliminan o reducen una afección patológica) para proporcionar terapia para una enfermedad o afección. La dosis preferida de una composición descrita en este documento es probable que dependa de variables tales como el tipo y el alcance del trastorno, el estado general de salud del paciente en particular, la formulación de los excipientes de los compuestos y su vía de administración.

Las cantidades de dosificación humana para cualquier terapia descrita en este documento se pueden determinar inicialmente extrapolando la cantidad de compuesto usado en ratones, como un experto en el arte reconoce que es habitual en la técnica modificar la dosis para humanos en comparación con los modelos animales. También se describe en este documento, cuando la dosis puede variar entre aproximadamente 10^7 pfu y aproximadamente 10^{11} pfu; o de aproximadamente 10^8 pfu a aproximadamente 10^{10} pfu o de aproximadamente 10^9 pfu a aproximadamente 10^{11} pfu. También se describe en este documento, cuando esta dosis puede ser de aproximadamente 10^7 pfu, 10^8 pfu, 10^9 pfu, 10^{10} pfu, 10^{11} pfu. Por supuesto, una cantidad de dosis se puede ajustar hacia arriba o hacia abajo, como se hace rutinariamente en dichos protocolos de tratamiento, dependiendo de los resultados de los ensayos clínicos iniciales y las necesidades de un paciente en particular.

Selección de un método de tratamiento.

Después de que se diagnostica que un sujeto tiene neoplasia, se selecciona un método de tratamiento. En la neoplasia, por ejemplo, una serie de regímenes de tratamiento estándar están disponibles. El perfil del marcador de la neoplasia se usa para seleccionar un método de tratamiento. En este documento también se describen células de neoplasia que responden a la muerte celular por NDV (por ejemplo, r73T-R116).

Es probable que una neoplasia menos agresiva sea susceptible a métodos de tratamiento conservadores. Las neoplasias más agresivas (por ejemplo, neoplasias metastásicas) son menos susceptibles a los métodos de tratamiento conservadores y es probable que se repitan. Cuando los métodos descritos en este documento indican que una neoplasia es muy agresiva, se debe seleccionar un método de tratamiento agresivo. Los regímenes terapéuticos agresivos por lo general incluyen una o más de las siguientes terapias: resección quirúrgica, radioterapia o quimioterapia.

Ensayos para medir la viabilidad celular.

Los agentes (por ejemplo, NDV) útiles en los métodos descritos en este documento incluyen aquellos que inducen la muerte celular neoplásica y/o reducen la supervivencia de las células neoplásicas, esto es, la viabilidad.

Los ensayos para medir la viabilidad celular son conocidos en la técnica, y se describen, por ejemplo, por Crouch et al. (J. Immunol. Meth. 160, 81-8); Kangas et al. (Med. Biol. 62, 338-43, 1984); Lundin et al., (Meth. Enzymol. 133, 27-42, 1986); Petty et al. (Comparison of J. Biol. Chem. 266, 29-34, 1991); y Cree et al. (AntiCancer Drugs 6: 398-404, 1995). La viabilidad celular se puede analizar usando una variedad de métodos, incluyendo MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazolil)-2,5-difeniltetrazolio) (Bartrop, Bioorg. & Med. Chem. Lett. 1: 611, 1991; Cory et al., Cancer Comm. 3, 207-12, 1991; Paull J. Heterocyclic Chem. 25, 911, 1988). Los ensayos para la viabilidad celular también están disponibles comercialmente. Estos ensayos incluyen, pero no se limitan al ensayo de viabilidad celular luminiscente CELLTITER-GLO® (Promega), que usa tecnología de luciferasa para detectar ATP y cuantificar la salud o el número de células en cultivo, y el ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo®, que es un ensayo de citotoxicidad de la lactato deshidrogenasa (LDH) (Promega).

Los compuestos candidatos que inducen o aumentan la muerte celular neoplásica (por ejemplo, aumentan la apoptosis, reducen la supervivencia celular) también son útiles como agentes terapéuticos antineoplásicos. Los ensayos para medir la apoptosis celular son conocidos para los expertos en el arte. Las células apoptóticas se caracterizan por cambios morfológicos característicos, que incluyen la condensación de la cromatina, el encogimiento celular y el sangrado de la membrana, que se pueden observar claramente mediante microscopía óptica. Las características bioquímicas de la apoptosis incluyen la fragmentación del ADN, la escisión de proteínas en ubicaciones específicas, el aumento de la permeabilidad de la membrana mitocondrial y la aparición de fosfatidilserina en la superficie de la membrana celular. Los ensayos para la apoptosis son conocidos en la técnica. Los ensayos de ejemplo incluyen los ensayos TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl Transferase Biotin-dUTP Nick End Labeling), los ensayos de actividad de caspasa (específicamente caspasa-3) y los ensayos de fas-ligando y anexina V. Los productos disponibles comercialmente para detectar apoptosis incluyen, por ejemplo, Apo-ONE® Homogeneous Caspase-3/7 Assay, FragEL TUNEL kit (ONCOGENE RESEARCH PRODUCTS, San Diego, CA), the ApoBrdU DNA Fragmentation Assay (BIOVISION, Mountain View, CA), y the Quick Apoptotic DNA Ladder Detection Kit (BIOVISION, Mountain View, CA).

Las células neoplásicas tienen una propensión a hacer metástasis, o propagarse, desde su lugar de origen hasta puntos distantes en todo el cuerpo. Los ensayos para el potencial de metástasis o la invasividad son conocidos para los expertos en el arte. Tales ensayos incluyen ensayos in vitro para la pérdida de la inhibición por contacto (Kim et al., Proc Natl Acad Sci USA. 101:16251-6, 2004), aumento de la formación de colonias de agar suave in vitro (Zhong et al., Int J Oncol. 24(6):1573-9, 2004), modelos de metástasis pulmonares (Datta et al., In vivo, 16:451-7, 2002) y ensayos de invasión celular basados en Matrigel (Hagemann et al. Carcinogenesis. 25: 1543-1549, 2004). Los métodos de cribado in vivo para la invasión celular también son conocidos en la técnica, e incluyen, por ejemplo, el cribado de tumorigenicidad en ratones atímicos desnudos. Un ensayo in vitro comúnmente usado para evaluar la metástasis es el ensayo de invasión celular basado en Matrigel (BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ).

Si se desea, los compuestos candidatos seleccionados usando cualquiera de los métodos de cribado descritos en este documento se analizan para determinar su eficacia usando modelos animales de neoplasia. También se describe en este documento, cuando

los ratones son inyectados con células humanas neoplásicas. Los ratones que contienen las células neoplásicas se inyectan a continuación (por ejemplo, por vía intraperitoneal) con vehículo (PBS) o compuesto candidato diariamente durante un período de tiempo que se determinará empíricamente. Luego los ratones se someten a eutanasia y los tejidos neoplásicos se recogen y se analizan para determinar los niveles de NDV, polipéptidos de NDV y/o marcadores de NDV (por ejemplo, un transgén que codifica una unidad estructural detectable) usando los métodos descritos en este documento. Se espera que los compuestos que disminuyen el NDV, los polipéptidos del NDV o ARNm de los niveles del marcador del NDV o la expresión de la proteína en relación con los niveles de control sean

eficaces para el tratamiento de una neoplasia en un sujeto (por ejemplo, un paciente humano). También se describe en este documento, cuando se analiza el efecto de un compuesto candidato sobre la carga tumoral en ratones inyectados con una célula neoplásica humana. La célula neoplásica se deja crecer para formar una masa. Los ratones se tratan luego con un compuesto candidato o vehículo (PBS) diariamente durante un período de tiempo que se determinará empíricamente. Los ratones se someten a eutanasia y los tejidos neoplásicos se recogen. La masa del tejido neoplásico en ratones tratados con los compuestos candidatos seleccionados se compara con la masa de tejido neoplásico presente en los ratones de control correspondientes.

Kits

En este documento se describen kits para el tratamiento o la prevención del sarcoma. También se describe en este documento, cuando el kit incluye una composición terapéutica o profiláctica que contiene una cantidad eficaz de un NDV (por ejemplo, r73T-R116) en forma de dosis unitaria. También se describe en este documento, cuando el kit incluye una composición terapéutica o profiláctica que contiene una cantidad eficaz de NDV (por ejemplo, r73T-R116) en forma de dosis unitaria.

También se describe en este documento, cuando el kit comprende un recipiente estéril que contiene una composición terapéutica o profiláctica; tales recipientes pueden ser cajas, ampollas, botellas, viales, tubos, bolsas, bolsas pequeñas, envases tipo blíster u otras formas de recipientes apropiadas conocidas en la técnica. Tales recipientes pueden estar hechos de plástico, vidrio, papel laminado, lámina metálica u otros materiales apropiados para contener medicamentos.

Si se desea, se proporciona un anticuerpo descrito en este documento junto con instrucciones para administrar un NDV (por ejemplo, r73T-R116) a un sujeto que tiene o tiene riesgo de desarrollar una neoplasia. Las instrucciones generalmente incluirán información sobre el uso de la composición para el tratamiento o la prevención de la neoplasia. También se describe en este documento, cuando las instrucciones incluyen al menos uno de los siguientes: descripción del agente terapéutico; esquema de dosificación y administración para el tratamiento o prevención de neoplasia o síntomas de la misma; precauciones advertencias; indicaciones; contraindicaciones; información de sobredosis; reacciones

adversas; farmacología animal; estudios clínicos; y/o referencias. Las instrucciones pueden imprimirse directamente en el recipiente (cuando esté presente), o como una etiqueta aplicada al recipiente, o como una hoja, folleto, tarjeta o carpeta por separado suministrada en o con el recipiente.

La práctica de la presente divulgación emplea, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de biología molecular (incluyendo técnicas recombinantes), microbiología, biología celular, bioquímica e inmunología, que están dentro del alcance del experto en el arte. Tales técnicas se explican completamente en la literatura, tal como "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", second edition (Sambrook, 1989); "Oligonucleotide Synthesis" (Gait, 1984); "Animal Cell Culture" (Freshney, 1987); "Methods in Enzymology" "Handbook of Experimental Immunology" (Weir, 1996); "Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells" (Miller and Calos, 1987); "Current Protocols in Molecular Biology" (Ausubel, 1987); "PCR: The Polymerase Chain Reaction", (Mullis, 1994); "Current Protocols in Immunology" (Coligan, 1991). Estas técnicas son aplicables a la producción de los polinucleótidos y polipéptidos descritos en este documento, y, como tales, pueden considerarse al hacer y practicar la divulgación.

Los siguientes ejemplos se presentan para proporcionar a los expertos en el arte una divulgación y descripción completas de cómo hacer y usar el ensayo, el cribado y los métodos terapéuticos descritos en este documento, y no pretenden limitar el alcance de la divulgación.

EJEMPLOS

Ejemplo 1. Ensamblaje del ADNc del antigenoma de la cepa 73T de NDV.

Seis fragmentos de ADNc subgenómicos generados por RT-PCR de alta fidelidad se ensamblaron en el vector pUC19. El ADNc de longitud completa de NDV 73T se designó como p73T. Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos deducidas del sitio de escisión de la proteína F (FPCS) en 73T se modificaron a la de la cepa LaSota del NDV (lentogénica, lenta) o glucoproteína B (gB) del citomegalovirus (CMV) (S116) (Figura 1; doble barra indica el sitio de escisión de la proteína F). El ADNc se secuenció completamente para confirmar la secuencia viral. Sitio de escisión de la proteína F: Wt: ggg agg aga cag aaa cgc ttt; Lento: ggg ggg aga cag gaa cgc ctt; S116: cat aat aga acg aaa tcc ttt; S116KM: cat aat aaa atg aaa tcc ttt; R116: cat aat aga acg aaa cgc ttt.

Ejemplo 2. Inserción de transgén en el genoma de NDV 73T.

Los transgenes se insertaron en p73T en dos ubicaciones: en las secuencias intergénicas entre P y M o en las secuencias intergénicas entre las uniones HN y L (Figura 2A). Para insertar un casete transgénico único en las uniones P-M o HNL, se realizó la construcción del ADNc p73T que contiene un transgén en las uniones P-M o HN-L insertando el casete transgénico en los sitios Afel creados entre los genes P y M (nt 3148) o entre los genes HN y L

(nt 8231). El casete de genes insertado contiene el extremo del gen (GE; 5'-TTAAGAAAAA -3'), el nucleótido intergénico (T), la secuencia de inicio del gen (GS; 5'-ACGGGTAGA -3') y el marco de lectura abierto (ORF) del transgén. Además, se insertaron diez nucleótidos (5'-cgccgccacc-3') corriente arriba del sitio de inicio para introducir una secuencia Kozak. El ADNc de longitud completa (FL) 73T que contiene el transgén en la unión P-M o HN-L se designó como p73T-P1 o p73T-HN1, respectivamente. Se construyó ADNc de longitud completa que contenían dos transgenes separados en las uniones P-M y HN-L en un solo genoma y se designó como p73T-P1-HN1 (Figura 2B). Para insertar dos casetes de transgén en la misma unión (por ejemplo, P-M), se introdujo un sitio Afel al final de ORF el primer transgén (# 1) (nt 3169). El 2º transgén ORF se amplificó por PCR con cebadores que contienen secuencias GE y GS y se insertó en el sitio Afel. El ADNc antigenómico que contiene dos casetes transgénicos de la unión P-M se designó como p73T-P2.

Ejemplo 3. Recuperación de la cepa infecciosa de NDV recombinante 73T (r73T) con FPCS modificado.

Las proteínas NDV 73T NP, P, L y el ADNc antigénico (p73T-lento o p73T-S116) se clonaron bajo el control del promotor y terminador de la ARN polimerasa de T7. Los cuatro plásmidos se cotransfectaron en una línea celular de ARN polimerasa (Figura 3A). Los virus recuperados se designaron como r73T-lento o r73T-S116. El r73T-lento y el r73T-S116 se pasaron en células Vero con medios con y sin suplemento de tripsina. El crecimiento de r73T-lento depende de la tripsina, mientras que r73T-S116 puede crecer en un medio sin el suplemento de tripsina. Secuencias de escisión de la proteína F (FPCS) en r73T-S116, con y sin hGM-CSF en la unión P-M, se evaluaron. Las cepas 73T-S116 se pasaron adicionalmente por 10 pasajes en células Vero y fibrosarcoma humano HT1080 a MOI 0.01 en medio sin suplemento de tripsina. Las mutaciones en el FPCS (R113K y/o Q114M) aparecieron en el pasaje 7. La mutación S116R se detectó en el pasaje 9. En el pasaje 10, F, HN y el transgén se secuenciaron y no se encontraron mutaciones adicionales.

Ejemplo 4. Caracterización de la cepa 73T recombinante con diferentes secuencias de escisión de proteínas F.

La cepa 73T recombinante con nuevas secuencias de escisión de la proteína F modificada (FPCS) incluyó las siguientes secuencias:

- Lento: ¹¹¹G-G-R-Q-E-R/L-I¹¹⁸
- S116: ¹¹¹H-N-R-T-K-S/F¹¹⁷
- S116K: ¹¹¹H-N-K-T-K-S/F¹¹⁷
- S116M: ¹¹¹H-N-R-M-K-S/F¹¹⁷
- S116KM: ¹¹¹H-N-K-M-K-S/F-I¹¹⁸
- R116: ¹¹¹H-N-R-T-K-R/F-I¹¹⁸

Las cepas 73T recombinantes con diferentes FPCS se caracterizaron con respecto a MDT, ICPI, muerte relativa de células HT1080, replicación en células Vero y replicación en huevos (Figura 4).

La virulencia aviar de NDV se determina principalmente por las secuencias de escisión de la proteína F (FPCS). r73T-lento fue diseñado para contener el FPCS de la cepa no virulenta LaSota. La replicación del virus LaSota en los cultivos de tejidos depende de la tripsina, ya que la proteína F no se puede escindir. r73T-lento forma pequeñas placas en las células Vero sin el suplemento de tripsina, lo que indica que la proteína F no se escinde y el virus no se puede propagar de manera eficiente de una célula a otra. r73-lento se replicó a un nivel bajo en células Vero (7.5×10^3 pfu/ml), pero de manera eficiente en huevos con enzima endógena tipo tripsina (5.7×10^8 pfu/ml). r73-lento no es virulento en pollos, como lo demuestra por el tiempo medio de muerte (MDT) de los embriones inoculados con el virus (MDT > 156hr) y un índice de patogenicidad intracerebral (ICPI; ICPI = 0.00), y tiene una baja citotoxicidad en las células HT1080 (13% de muerte de células).

El r73T-S116 puede formar placas relativamente grandes y alcanza un título de 4.4×10^6 pfu/ml en células Vero. Esto fue comparable a los títulos obtenidos cuando r73T-S116 creció en células Vero suplementadas con tripsina. Estos datos indicaron que el sitio de escisión de la proteína de fusión (FPCS) de r73T-S116 se puede escindir sin tripsina exógena en cultivos de tejidos. No fue virulento en pollos y mostró un 31% de muerte de células en células HT1080. Se examinó r73T-S116 para determinar su estabilidad genética mediante el pasaje de células in vitro.

Después de 10 pasajes en células Vero o HT1080, se encontraron sustituciones de aminoácidos en el FPCS: R113K, Q114M y/o S116R. Para eliminar la posibilidad de que se hubiera producido un cambio de secuencia adicional en el genoma viral, se construyeron virus mutantes r73T-S116 recombinantes mediante genética inversa y se evaluaron. Excepto por r73T-R116, r73T-S116 y sus derivados fueron similares al S116 parental en que estos

virus mutantes no eran virulentos en pollos y eran capaces de niveles similares de muerte de células HT1080. La muerte de células HT1080 fue entre 29% y 31% para la mutación única y 48% para las mutaciones dobles.

El tamaño de la placa de M114 y K113M114 fue significativamente mayor que S116. El mutante r73T-R116 adquirió un cambio de aminoácido en el residuo 116 (S116R) en el FPCS. Se sabe que el R116 junto al sitio de escisión es importante para la escisión eficaz de la proteína F. r73T-R116 formó grandes placas en células Vero, creció a títulos similares con y sin suplemento de tripsina y mató eficazmente las células HT1080 (80%). R116 aumentó la virulencia de los pollos como lo muestra el ensayo MDT (72, 80 h). Aunque el valor ICPI (0.65) fue <0.7 en una prueba, es preferible reducir aún más su virulencia en el pollo.

Ejemplo 5. Los derivados de r73T-R116 tienen una virulencia reducida en el pollo.

El virus se puede diseñar para expresar un transgén en la unión P-M (1), un 2º transgén en la unión HN-L (2) y una región intergénica HN-L aumentada que se extiende por la inserción de una secuencia no codificante (3) (Figura 5A). El mismo diseño para la inserción de un casete transgénico en la unión P-M que en la figura 2A se usa en este documento. El segundo casete de transgén contiene la secuencia de inicio del gen L (GS; 5'-ACGGGTAGA -3'), el marco de lectura abierto (ORF) del transgén, las secuencias de la región 3' no traducida del gen L (resaltada en cursiva) y la secuencia final del gen L (GE; 5'-TTAAGAAAAA -3'). La secuencia no codificante usada para aumentar la unión HN-L se tomó de los paramixovirus tipo -1 (APMV-1), el virus sincitial respiratorio (VSR) o la secuencia aleatoria que no tiene homología con ninguna secuencia conocida. La inserción puede estar en el intervalo de 60-318 nt. La inserción de un 2º transgén en HN-L permitió que el virus expresara dos transgenes, tal como hGM-CSF y GFP. Se enumeran las secuencias insertadas en la unión HN-L (Figura 5B).

Ejemplo 6. Modificación de r73T-R116 y caracterización de derivados de r73T-R116.

Para reducir la virulencia de r73T-R116 en pollos, se modificó el virus r73T-R116 para aumentar la secuencia intergénica de HN y L mediante la inserción de secuencias de diversas longitudes. Los derivados de r73T-R116 se evaluaron para determinar su infectividad mediante el examen de la formación de placa y la replicación en células y huevos; para la patogenicidad aviar mediante el examen de MDT e ICPI, y para la muerte de células tumorales (Figura 6A).

Las inserciones intergénicas de 318nt de APMV, 198nt de RSV y 198 secuencias aleatorias efectivamente redujeron la virulencia en pollos, con MDT > 156hr e ICPI de 0.27, 0.0375 y 0, respectivamente. Una inserción larga (198 nt aleatorios) tuvo un efecto mayor en la reducción de la virulencia que una inserción corta (60 nt aleatorios). La inserción de 144, 102 y 60nt tuvo algo de virulencia en los pollos, pero los tiempos MDT fueron más cortos. Los valores de ICPI para la inserción de 144, 102 y 60nt fueron 0.74, 0.51 y 0.78, respectivamente. La inserción de una secuencia no viral (198nt aleatoria) redujo más eficazmente la virulencia que la inserción de una secuencia viral (RSV-198nt). La inserción del 2º casete de transgén (EGFP) en la unión HN-L no redujo la virulencia en el pollo (MDT 86hr e ICPI de 0.82). Todas las inserciones redujeron ligeramente la replicación viral en huevos hasta 4 veces, pero no afectaron la replicación viral en células Vero (~10⁶pfu/ml). Aunque los virus mutantes fueron más atenuados en el pollo, la función de muerte de células tumorales no se vio afectada. Todos los derivados de r73T-R116 tenían una eficacia de muerte de células tumorales en el intervalo de 75% -86% en el día 3 de la infección.

Ejemplo 7. Cinética de crecimiento de virus r73T en huevos y células Vero.

Para determinar las condiciones de crecimiento para los virus r73T, se realizaron estudios de crecimiento cinético en huevos (Figura 7) y células Vero (Figura 8). Los huevos embrionados de pollo se infectaron con 100, 1000, 10,000 o 100,000 FFU/huevo de los virus indicados y se incubaron durante 2, 3 o 4 días. Se recogió el fluido alantoico y se determinaron los títulos víricos mediante FFA. Como se muestra en la figura 7, 100 FFU/huevo tuvieron un título bajo en el día 1, pero alcanzaron el título máximo en el día 2. En general, la mayoría de los virus alcanzaron títulos máximos de ~8 logs/mL en el día 2, independientemente de la dosis de inoculación usada. R116i-198 tuvo el título más bajo, la dosis baja de inóculo generó el mayor rendimiento en el día 2, lo que indica que podría haber acumulación de partículas defectuosas. La inserción R116i-318-APMV también tuvo un título máximo más bajo de ~7 logs. R116i-198-RSV alcanzó un título máximo de 7.5 logs. El S116 construido por genética inversa no tuvo reducción en la producción de virus en los huevos. Por lo tanto, entre los derivados de R116, el virus con inserción RSV-198nt fue el principal candidato del virus oncolítico en términos de propiedades de crecimiento en los huevos.

Los virus también se evaluaron en el clon 51D11 de células Vero sin suero, una línea celular patentada generada por MedImmune. Todos los virus se replicaron bien en ambas condiciones de MOI (0.001 y 0.0001) (Figura 8). La modificación de 73T FPCS y la inserción intergénica en la unión HN-L de R116 no afectaron el crecimiento del virus en las células Vero.

Ejemplo 8. Muerte celular selectiva de r73T y derivados en células cancerosas en comparación con las células normales.

r73T y sus derivados se evaluaron para determinar su muerte de células en el fibrosarcoma humano HT1080 en comparación con las células CCD1122SK de fibroblastos de piel humana normales, en relación con las células de control sin tratar (Figuras 9A y 9B). Los datos se obtuvieron posteriores a la infección con derivados de r73T a diferentes dosis que oscilaron entre 1 y 100,000 PFU durante 72 h. En las células cancerosas HT1080, el virus con FPCS lentogénico tuvo la menor muerte, el S116 en el FPCS fue intermedio, y el virus con R116 en el FPCS tuvo una muerte celular tan eficiente como el virus r73T wt. En las células CCD1122SK normales, la muerte de células de todos los virus no fue tan eficaz como la de las células cancerosas. La reducción en la eficiencia de matanza fue de ~ 100 veces. Independientemente de las secuencias FPCS, todos los virus tenían una eficacia de muerte similar en las células normales. La eficiencia de muerte de células en las células cancerosas y normales se expresó como una concentración eficaz del 50% (EC₅₀) interpolada desde la curva de respuesta a la dosis usando Prism 6.0 (Figura 9C). El derivado de R116 tenía un valor de EC₅₀ similar a r73T wt con EC₅₀ de 10 PFU, lo que indica que la modificación de FPCS no afectó la replicación del virus y la eficiencia de muerte de células en las células cancerosas. La replicación de estos virus en las células HT1080 y CCD1122SK a MOI 0.01 se determinó el día 3 posteriores a la infección (Figura 9D). Todos los virus se replicaron preferentemente en las células cancerosas sobre las células normales, con una diferencia de aproximadamente 1.5-2.0 logs.

Ejemplo 9 Los derivados de r73T tenían actividad antitumoral in vivo cuando se administraban ya sea sistémicamente o por vía intratumoral a ratones inmunodeficientes que portaban xenoinjertos de tumores humanos.

Para evaluar la actividad oncolítica in vivo, se estableció el modelo de xenoinjerto HT1080 inyectando las células HT1080 a una concentración de 5×10^6 células/0.1 ml por vía subcutánea en ratones atímicos Balb/C a la edad de 5-6 semanas. Como hGMCSF no tiene reactividad cruzada en ratones, este estudio no estaba orientado a evaluar el efecto transgénico, sino la capacidad oncolítica de diversas construcciones de r73T. R116-318i-hGM-CSF se administró por vía intratumoral (it) o intravenosa (iv) y la tasa de crecimiento del tumor se comparó entre los grupos de tratamiento y de control (Figura 10A).

Los ratones se aleatorizaron en grupos (N = 10) como se indicó cuando el volumen del tumor alcanzó aproximadamente 65 mm³. Los ratones recibieron una dosis única de PBS o 2×10^7 Pfu de r73T-hGM-CSF-R116i-198 administrados por vía intratumoral (IT) o 1×10^8 PFU administrados por vía intravenosa (IV) mediante inyección en la vena de la cola. El tamaño del tumor se midió cada 3-4 días. Como se presenta en la figura 10A, r73T-R116i podría inducir una regresión tumoral significativa cuando se administró por IV o por IT. La cantidad de regresión del tumor inducida por las dos rutas fue comparable y fue significativamente diferente del grupo de control.

Las actividades oncolíticas de los derivados de r73T se compararon en los xenoinjertos HT1080 mediante inyección IT de 1×10^8 PFU (Figura 10B). Los ratones se asignaron al azar en grupos (n = 7) cuando el volumen del tumor alcanzó aproximadamente 180 mm³. Los ratones recibieron PBS o 1×10^8 PFU de r73T-hGM-CSF-lento (lento) o r73T-hGM-CSF-S116K113M114 (S116 KM) o r73T-hGM-CSF-R116i-318 nt APMV-N (R116i) o r73T-hGM-CSF (r73T wt). El tamaño del tumor se midió cada 3-4 días (* P < 0.05, prueba T de Student no emparejada). Dos dosis de derivados de r73T fueron capaces de inducir una regresión significativa del tumor, aunque con diferencias en la efectividad. r73T-lento fue el menos efectivo, mientras que r73T wt fue el más efectivo en la regresión del tumor. r73T-lento tuvo un efecto similar al del virus S116, aunque el virus S116 tuvo una EC₅₀ más baja 10 veces para la muerte de células in vitro (Figura 9A). r73T-R116i-318 fue tan potente como 73T wt en la inhibición del crecimiento tumoral hasta 9 días después de la 2ª dosis (día 19 después de la implantación del tumor), el tumor volvió a crecer en ratones tratados con R116i, pero no en el grupo tratado con 73T wt. Estos datos mostraron que los derivados de r73T tenían actividad antitumoral in vivo cuando se administraban sistémicamente o por vía intratumoral a ratones inmunodeficientes que portaban xenoinjertos de tumores humanos. La escisión eficaz de la proteína F es importante para la replicación del virus in vitro e in vivo. Los virus con el R116 en el FPCS fueron más potentes en la muerte de células in vitro e in vivo.

Ejemplo 10. Biodistribución tisular del derivado r73T después de la administración intravenosa.

Para determinar si el virus NDV oncolítico se replica de manera selectiva en los tejidos tumorales y la eliminación viral, se determinó la distribución del virus en diferentes órganos. Se trataron ratones atímicos desnudos con tumores HT1080 subcutáneos con un tamaño de ~ 250 mm³ con R116i (r73T-hGM-CSF-R116i-318 nt APMV-N) a una dosis de 1×10^8 PFU por vía intravenosa y se sacrificaron el día 1, 4, o 8 (n = 3 por punto de tiempo). Se recogieron suero, pulmones, bazo, ovarios y tumor.

La presencia de virus se cuantificó mediante un ensayo de placa en células Vero, y la expresión del transgén hGM-CSF se midió mediante un ensayo ELISA. La replicación del virus en el tumor y los órganos se evaluó el día 1, 4 y 8 posteriores a la infección. El virus solo se detectó en los órganos el día 1 (no se detectó ningún virus en el ovario en todos los puntos de tiempo) y la carga de virus en los tejidos tumorales fue 100 veces más alta que en los pulmones y bazos (Figura 11A). La presencia del virus en el tumor persistió durante al menos 8 días, lo que indica que el virus se replicó selectivamente en los tejidos tumorales. De acuerdo con los datos de replicación viral, el nivel de hGMCSF fue el más alto y duró más de 8 días (Figura 11B). Estos datos demostraron que el virus NDV puede replicarse eficazmente en el tejido tumoral y administrar el transgén al tejido tumoral local de manera eficaz.

Ejemplo 11. ADNc de antigenoma de 73T que contiene el gen F y/o HN quimérico.

Las glucoproteínas de la superficie viral son antígenos importantes para la inmunogenicidad y la virulencia en pollos. Se exploraron estrategias para reemplazar los genes F y HN de NDV por los correspondientes dominios extracelulares (ecto) de otros paramixovirus que no son virulentos en pollos individualmente o en combinación. El virus de la parainfluenza 5 (PIV 5) es un paramixovirus canino y no causa enfermedades en humanos. Se ha demostrado que el paramixovirus de paloma tipo 1 (PPMV-1) no es virulento en pollos con un ICPI de 0.025, como se informó anteriormente, y es antigénicamente distinto del NDV (Dortmans et al, Veterinary Microbiology, 2010, vo. 143, pages 139-144.) Existen dos variantes genéticamente relacionadas del paramixovirus de paloma tipo 1 (PPMV-1) con sitios de escisión de la proteína de fusión velogénica idénticos, pero con una virulencia fuertemente contrastante (Veterinary Microbiology, 2010, 143:139-144). Se generaron ADNc antigenómicos de longitud completa de NDV 73T en los que se intercambiaron el ectodominio de glucoproteína F y/o HN con el de PPMV-1 y/o PIV5 (Figura 12A). Las secuencias de NDV, PIV5 y PPMV-1 se indican con recuadros de colores como azul, púrpura o verde, respectivamente).

Se indican las longitudes de aminoácidos de proteínas individuales o dominios de proteínas. La formación de placa en Vero, la muerte de células HT1080 relativa y MDT se realizaron como se describió anteriormente (Figura 12B). Los virus quiméricos, a excepción de PIV-5 F-HN, se recuperaron y fueron capaces de crecer en las células en ausencia de tripsina exógena. Los tres virus formaron placas de buen tamaño, que mostraron una propagación eficiente de célula a célula. Los virus quiméricos PPMV-1 F-HN o F tuvieron valores de MDT de 79 y 84 h, respectivamente, lo que indica una posible virulencia en pollos. Ambas quimeras PPMV-1 mataron las células HT1080 de manera eficiente a niveles de 71 y 61%. La quimera PIV5-F no creció en los huevos y no fue virulenta en los pollos y mató las células HT1080 al 47%. La reactividad cruzada del suero entre las quimeras NDV y PPMV-1 o PIV5 se examinó mediante un ensayo de neutralización usando el suero recogido de ratones que recibieron dos dosis intravenosas de 1×10^8 PFU de r73T-R116i. El virus r73T se neutralizó con el suero infectado con NDV (título 960) mientras que las quimeras PPMV-1 y PIV5 no se neutralizaron (título <4). Este resultado confirmó que no hubo reactividad cruzada entre NDV y PPMV-1 o PIV5. Los virus quiméricos con distintas antigenicidades tienen el potencial de servir como un refuerzo de los virus oncolíticos para los pacientes que han desarrollado respuestas inmunes anti-NDV durante el tratamiento previo de NDV.

Una comparación de la actividad de la ARN polimerasa del NDV con otros paramixovirus mediante un ensayo minigenoma (Figura 12C). Las células que expresan T7 se transfectaron con los tres plásmidos que expresan las proteínas NP, P, L del NDV y el plásmido que codifica el ADNc antiminigenómico del NDV que codifica el gen GFP usando Lipofectamine 2000, o los plásmidos que codifican los genes N, P, L del virus del sarampión (MV) o virus sincitial respiratorio (RSV) y respectivo plásmido de ADNc antiminigenoma GFP RSV o MV. Dos o tres días después de la transfección, la replicación del minigenoma como se indica mediante la expresión de proteínas GFP se examinó bajo un microscopio fluorescente. El NDV tuvo la actividad de polimerasa más fuerte en comparación con el virus del sarampión y el RSV.

Ejemplo 12. Las células cancerosas sensibles a NDV se identificaron por selección de panel celular.

Para entender qué tipos de tumores pueden ser sensibles a la oncolisis del NDV, se analizaron 180 líneas celulares de cáncer que cubren una amplia gama de tipos de tumores e indicaciones para la sensibilidad al NDV recombinante y sus variantes. Las líneas celulares se obtuvieron de American Type Tissue Collection (Manassas, VA) o the European Collection of cell cultures (ECACC) y se cultivaron en medios y en las condiciones recomendadas por el proveedor. Se sembraron 10,000 líneas celulares de cáncer en placas de 96 pocillos y se infectaron 6 horas después con un virus. Las concentraciones de virus oscilaron entre MOI 10- 0.0001 (o 1 a 100,000 pfu por pocillo). La viabilidad celular se determinó 48-96 horas posteriores a la infección. La sensibilidad se determinó usando un corte de > 30% de muerte de células a las 72 horas posteriores a la infección con el virus a una MOI de 0.1. Las figuras 13A y 13B proporcionan una visión general de la sensibilidad por tipo de tumor. Las líneas celulares de cáncer hematológico (leucemia y linfoma) fueron relativamente insensibles a la oncolisis del NDV, mientras que la mayoría de las líneas celulares de melanoma, ovario y páncreas analizadas fueron sensibles al NDV. Aproximadamente el 58% de todas las líneas celulares de cáncer humano analizadas fueron sensibles al NDV R116i en FPCS en relación con el 4% de las líneas celulares analizadas fueron sensibles al virus basado en S. Esto fue más probable debido a la escisión de la proteína F por las proteasas. El virus R116i es más probable que se escinda por las proteasas ubicuas de tipo furina, mientras que la proteasa que probablemente escinda la proteína F S116 no está definida y es probable que se exprese de manera menos ubicua. La variante rederivada de S16-KM produjo un tamaño de placa más grande y una potencia oncolítica mejorada en relación con la variante original de S116.

Para probar esto adicionalmente, se infectó un panel más pequeño de 22 líneas celulares de cáncer que se había determinado que tenían un intervalo de sensibilidad al virus NDV R116 con variantes que expresaban GFP y se determinó la viabilidad celular a las 72 horas posteriores a la infección. Usando el mismo corte de sensibilidad que se describió anteriormente, el 41% de las líneas celulares analizadas fueron sensibles a R116i, el 4% sensible a S116 y el SKM rederivado es más potente que el S116 NDV con un 27% de las líneas celulares analizadas como sensibles.

Tabla 4. Resumen de sensibilidad de célula cancerosa para matar el virus mediante R116-hGM-CSF

Indicación	No. de líneas celulares probadas	No. de líneas celulares sensibles a S116	No. de líneas celulares sensibles a R116i
Vejiga	8	0	6
Hueso	4	0	4
Cerebro	4	0	4
Mama	26	2	14
Colorectal	14	0	3
Gástrico	4	0	3
HNSCC	9	0	5
Hem	28	0	4
Riñón	4	0	4
Hígado	9	2	7
Pulmón	28	0	20
Melanoma	8	0	8
Ovarios	10	0	8
Pancreático	14	0	11
Próstata	6	2	3
Otros	3	1	1

Las células derivadas de los tejidos de cáncer indicados se examinaron para determinar la muerte de células mediante NDV 73T recombinante con R116 en el FPCS y el GM-CSF humano. Se indica el número de células que mostraron una muerte de más del 50% por la infección del virus a una moi de 0.1 y el total de líneas celulares analizadas.

Ejemplo 13. Los derivados de r73T tenían actividad de inhibición del crecimiento tumoral y/o tumoral en el modelo de melanoma singénico.

Después del refinamiento del modelo tumoral, se ensayó la eficacia del S-116-RD NDV que codifica GM-CSF humano o murino en el modelo singénico de B16F10 refinado (Figura 15A y 15B). 1×10^8 pfu se infectó por vía intratumoral para 3 dosis y hubo un mínimo de 8 ratones por grupo. La inhibición significativa del crecimiento tumoral se demuestra con > 80% de inhibición del crecimiento tumoral (Figura 15B). La regresión tumoral a corto plazo se logró con la dosis intratumoral (i.t.) repetida, lo que también condujo a un aumento significativo en el tiempo de supervivencia de 18 días para el control en relación con 42 días en el grupo tratado. El cese del tratamiento después de 3 dosis fue seguido por un nuevo crecimiento del tumor. Un solo animal sin evidencia de tumor residual en el grupo S116-mGM-CSF a los 50 días se volvió a estimular mediante la implantación de células tumorales B16F10 en el flanco alternativo. El crecimiento del tumor se retrasó pero no se inhibió, lo que sugiere en este modelo que no se logró una respuesta de memoria inmune completa dentro de este animal único.

Con el fin de evaluar los efectos oncolíticos e inmunitarios sobre el crecimiento tumoral, las variantes de NDV R116i y S116 que codifican hGM-CSF o mGM-CSF respectivamente se probaron para determinar su eficacia en el modelo de tumor colorrectal CT26 singénico inmune competente del ratón. A cada virus se le administró 1×10^8 PFU del virus por vía intratumoral para 4 dosis. Los tumores tenían un mínimo de 100 mm³ antes de comenzar la dosificación. Todos los animales tratados con virus demostraron una potente actividad antitumoral como monoterapia. Con 11/12 animales libres de tumores después del tratamiento con R116 que codifica GM-CSF humano, que es una tasa de respuesta completa del 92%. El virus S116-KM con derivación menos lítica tuvo una inhibición del crecimiento tumoral reducida que alcanzó un 53% de TGI y una tasa de respuesta completa del 36%. Sin embargo, en presencia de GM-CSF murino que, a diferencia del GM-CSF humano, estará activo en el modelo de ratón, esta tasa de respuesta aumentó a 54% con una inhibición del crecimiento tumoral del 75%. De este modo, es probable que dotar el virus S116 con GM-CSF pueda aumentar la actividad antitumoral.

Virus	% TGI	% Respuesta completa (CR)
R116 hGM-CSF	83	92
R116 mGM-CSF	ND	ND
S116 hGM-CSF	53	36
S116 mGM-CSF	75	54

Los tumores que permanecían se tomaron para el análisis histológico y se tiñeron con hematoxilina y tinción con eosina (H y E) y se usaron métodos de inmunohistoquímica para la detección del NDV (Figura 15C). Existe una clara evidencia de la expresión de NDV y esto parece estar concentrado alrededor de las áreas necróticas del tumor, lo que sugiere que el NDV está contribuyendo a la muerte y necrosis de las células tumorales. También hay evidencia clara de infiltración de células inmunes en el tumor y áreas necróticas. En áreas que tienen una fuerte tinción para la formación de sincitios de células multinucleadas de NDV también se puede observar. Adicionalmente, parece que hay un tumor viable remanente muy mínimo, lo que indica que los datos de inhibición del crecimiento del tumor pueden subestimar la actividad de NDV dentro de este modelo.

La figura 15C muestra que el NDV tiene una potente actividad antitumoral en el modelo de tumor colorrectal CT26 de ratón inmunocompetente. Con el fin de evaluar los efectos oncolíticos e inmunes sobre el crecimiento tumoral, las variantes del NDV (R116i y S116 que codifican hGM-CSF o mGM-CSF, respectivamente, se probaron para determinar su eficacia en el modelo de tumor colorrectal CT26 competente sintético inmune de ratón. Cada virus fue administrado con 1×10^8 PFU de virus por vía intratumoral para 4 dosis. Los tumores tenían un mínimo de 100 mm^3 antes de comenzar la dosificación. Todos los animales tratados con virus demostraron una potente actividad antitumoral en monoterapia. Con 11/12 animales libres de tumores después del tratamiento con R116 que codifica GM-CSF humano, que es una tasa de respuesta completa del 92%. El virus S116-KM con rederivación menos lítica tuvo una inhibición del crecimiento tumoral reducida que alcanzó un 53% de TGI y una tasa de respuesta completa del 36%. Sin embargo, en presencia de GM-CSF murino, que a diferencia del GM humano CSF estará activo en el modelo de ratón; esta tasa de respuesta se aumentó a 54% con una inhibición del crecimiento tumoral del 75%. De este modo, dotar el virus S116 con GM-CSF aumenta la actividad antitumoral.

Las figuras 15D-F muestran que la dosificación múltiple con rNDV R116i causó la inhibición del crecimiento tumoral e impulsó el reclutamiento de células inmunes en el modelo de xenoinjerto de cáncer de ovario (OVCAR4). Para evaluar adicionalmente la actividad oncolítica de rNDV in vivo, se usó un modelo de xenoinjerto de cáncer de ovario humano (OVCAR4). Este modelo es de crecimiento lento y tiene una patología macroscópica que recuerda a los tumores ováricos humanos con una morfología celular poco diferenciada y grandes áreas llenas de líquido como el ascítico. Una vez que los tumores alcanzaron los 100 mm^3 , los ratones se asignaron al azar para recibir 8 dosis de R116i NDV que codifica GM-CSF de ratón o humano o PBS como control. Solo el producto de la secuencia del gen murino sería bioactivo en el modelo de ratón. Se inyectaron 2.5×10^7 pfu por vía intratumoral en un volumen de menos de $50 \mu\text{l}$ una vez a la semana. Las curvas de crecimiento tumoral se muestran en la figura 15D. Inhibición tumoral a largo plazo lograda en animales con tumores tratados con cualquier variante de NDV. También hubo pruebas de que el genoma viral usó RT-PCR dentro del tumor al final del estudio (24 horas después de la última dosis). Tras el análisis histológico, existe una clara evidencia de infiltrado inmune, así como otros cambios histológicos en el tumor residual (Figuras 15E y F). Los tumores tratados son mucho menos diferenciados que los animales tratados con control y parecen tener menos áreas llenas de líquido ascítico. Un alto nivel de infiltrado inflamatorio encontrado en el número de tumores tratados adyacentes al tumor remanente y el análisis de inmunohistoquímica (IHC) revela que estos infiltrados inmunes son positivos para la proteína del NDV. Existe un fuerte grado de reclutamiento de células inmunes innatas en los tumores en los grupos tratados con NDV. Estos datos demuestran una potente eficacia antitumoral en un modelo de cáncer de ovario morfológicamente relevante que puede ser causado a través de la oncolisis directa y el reclutamiento inmune innato y la activación.

Ejemplo 14: los virus del NDV indujeron la regresión tumoral.

Se evaluó el efecto oncolítico de 73T-R116i-hGM-CSF y 73T-R116i-mGM-CSF en el modelo de melanoma B16. El estudio evaluó la tolerabilidad del virus en el ratón B16. Cada virus se dosificó a 2×10^7 pfu dos veces en los días 11 y 14 por vía intravenosa (i.v) o intraperitoneal (i.p), o una vez en el día 11 a 1.1×10^7 pfu por vía intratumoral (i.t). Los grupos tratados con R116-hGM-CSF o mGM-CSF por tres vías diferentes de administración tuvieron una tasa de crecimiento tumoral más lenta en comparación con el grupo no tratado (Figura 15A). Cada grupo incluía 3 ratones. Las tasas de inhibición del tumor fueron estadísticamente significativas en el grupo control. De este modo, los derivados de r73T descritos en este documento tienen ventajosamente baja patogenicidad aviar, alta actividad oncolítica y se replican en títulos altos en huevos de pollo. En base a estos resultados, los virus descritos en este documento son útiles para inducir la regresión del tumor y mejorar los resultados del tratamiento del paciente con cáncer (Figura 16).

Además de GM-CSF, se pueden insertar varios transgenes (Tabla 2) en la cepa NDV 73T para mejorar la muerte del tumor. Estos transgenes incluyen lo siguiente:

(1) Citoquinas o variantes de ingeniería de citoquinas, tales como GM-CSF, IL-2, IL-21, IL-15, IL-12 y IL-12p70

- 5 (2) Ligandos y quimioquinas de la superficie celular, incluidos OX40L, CD40L, ICOSL, Flt3:, B.1 (CD80), CD137L, CXCL10 (IP-10), CCL5, CXCL9. (3) Inhibidor de Myc: Omomyc. (4) Transgenes para fines de toma de imágenes in vivo, tal como la radioterapia mediada por el simportador de yoduro de sodio (NIS) para la radioterapia. (5) Moduladores adicionales de la supervivencia de las células tumorales para mejorar la muerte del tumor, incluidos, pero no se limitan a, inhibidores de la progresión del ciclo celular, inhibición de proteínas antiapoptóticas, potenciación de proteínas proapoptóticas, inhibición de conductores oncogénicos clave de la transformación maligna. Estos pueden incluir la administración transgénica de proteínas luego de la replicación selectiva de NDV en células tumorales, la producción de ARNip selectivo o de actividad amplia, la administración de miARN o la inhibición de miARN seleccionado (6) Antígenos tumorales tal como E6, E7, antígenos de testículos de cáncer, antígenos oncofetales, proteínas artificiales o sobreexpresadas como nuevos antígenos tumorales ya sea solos o en combinación con otros transgenes. (7) Anticuerpos o proteínas de fusión recombinantes que se dirigen a las proteínas inmunomoduladoras ya sea para bloquear la regulación negativa o proporcionar una señal agonista para mejorar la función de las células T. El ejemplo de tales anticuerpos puede incluir, pero no se limita a; PD-L1, CTLA4, CD-137 (4-1BB), OX40, GITR, TIM-3, CD73, PD-1, HVEM, y LIGHT. (8) Aumento de la actividad farmacodinámica/farmacocinética de recNDV mediante ingeniería o expresión de recNDV en células que transfieren proteínas a recNDV para reducir la eliminación por complemento o para disminuir la respuesta inmunitaria adaptativa al NDV.
- 10
- 15
- 20

Tabla 5. Transgenes para la inserción potencial en NDV 73T y sus actividades biológicas

Transgén	Tamaño del gen	MOA (funciones relacionadas con la inmunoterapia)
Citoquinas		
<u>GM-CSF</u>	0.47kB	- Factor de crecimiento celular hematopoyético - Estimula las células madre para diferenciarse en granulocitos y monocitos (y finalmente APC,
<u>IL-2</u>	0.48kB	- Estimula las células CD8 T, CD4 T, NK, y B - Aumenta la producción de citoquina - Induce la expansión de T-reg
<u>IL-21</u>	0.6kB	- Estimula las células T CD8, NK, y las células B - No induce la expansión de T-reg
<u>IL-15</u>	0.5kB	- Similar a la función IL-2 - Apoya la supervivencia de CTL CD8 (en contraste con IL-2 que promueve CTL CD8 de memoria)
<u>IL-12p70</u>		Estimula las células CD8 T y las células NK.
<u>IL-12A</u>	0.76 kB	Impulsa la diferenciación de células T Th1 CD-4
<u>IL-12B</u>	0.99 kB	- Reduce T-reg - Repolariza los macrófagos M2 a los macrófagos M1
Superficie celular de ligandos y quimioquinas		
<u>OX40L</u>	0.55kB	- Se une al receptor en células T activadas (no ingenuas) que emiten la señal de activación - Efectos corriente abajo de la activación en células T: - Proliferativo y antiapoptótico - Induce citocinas, Ag-spec Ab, - células T de memoria

<u>CD40L o CD40</u>	0.79kB	- La unión al receptor en las DC es crítica para la imprimación de células T (MHC-II, CD86, CD80 sobrerreg) • Estimula IL-12, MIP-1a de DC que conducen Th1-diff y migración a sitios inflamatorios • Importante para CTL (imprimación cruzada)
<u>ICOSL</u>	0.9kB	• Receptor ICOS expresado en células T naive y sobreg. después de estim de TCR y CD28 • La literatura muestra evidencia de diferenciación Th1 y Th2 a través de ICOS • Proporciona señal para la producción de Ab de alta afinidad
<u>Flt3L</u>	0.7kB	• Impulsor clave del desarrollo y diferenciación de células hematopoyéticas (células DC, NK, y B) • Expresado ubicuamente (receptor limitado a las células inmunes)
<u>B7.1 (CD80)</u>	0.866 kB	• Por lo general sobrerregulado en DC maduras • Molécula coestimuladora para la diferenciación de las células T naive CD4 en subconjuntos T-helper (Th1; IL-
<u>CD137L</u>	0.767 kB	• Expresado en DC, células NK, células CD8-T activadas • Dispara la proliferación de células T, la secreción de IL-2 y las capacidades citolíticas
<u>CXCL10 (IP-10)</u>	0.296 kB	• Molécula ELR-negativa con actividad antitumoral demostrada • quimioatrayente para células T, células NK, monocitos, DC • Atenúa la angiogénesis
<u>CCL5 (RANTES)</u>	0.275 kB	• quimioatrayente para eosinófilos, basófilos, mastocitos, monocitos, CTL, células CD4-T, • Se cree que las funciones antitumorales son el resultado de la infiltración de células inmunes
<u>CXCL9 (MIG)</u>	0.367 kB	• Quimioatrayente para leucocitos • Expresión dependiente de IFN-gamma; NO inducido por IFN-alfa / beta
Inhibidor myc		
<u>Omomyc</u>	1.3 kB	• Eficacia demostrada en el modelo de cáncer de pulmón de ratón
<u>Imagen</u>		
<u>NIS</u>	2 kb	Simportador de yoduro de sodio humano para concentrar 131-I en células cancerosas para radioviroterapia

Ejemplo 15. Terapia contra el cáncer que implica la administración de NDV oncolíticos en combinación con mAb modulador inmune.

5 El virus oncolítico NDV se puede administrar de forma concurrente o secuencialmente con anticuerpos terapéuticos o proteínas de fusión agonistas cuando sea apropiado (por ejemplo, anti-PD-L1, anti-CTLA4, anti-OX40, anti-GITR, anti-TIM-3, anti-PD-1 y anti-ICOS). Se generan datos preclínicos que establecen la dosis y la programación más eficaces de las moléculas que mejoran la actividad del NDV en modelos de tumores en combinación con las nuevas construcciones de NDV descritas en este documento. Los transgenes se pueden insertar en NDV recombinante para la expresión, ya sea individualmente o en combinación, para administrar múltiples modos de actividad, por ejemplo, para mejorar la muerte celular del tumor inducida por las nuevas variantes de NDV. El aumento de la liberación de antígenos de células tumorales combinado con un enfoque inmunomodulador tiene el potencial de aumentar la respuesta inmune adaptativa a estos antígenos de tumores liberados.

10

Ejemplo 16. La eficiencia de escisión de la proteína F y la actividad de fusión se redujeron en la proteína F con mutación R, S o S-KM en el sitio de escisión de la proteína F.

Para entender si la diferencia en el sitio de escisión de la proteína F afecta la escisión de la proteína F en las células infectadas y su impacto en la actividad de fusión, el plásmido de la proteína F se transfectó en células 293 para examinar la escisión de la proteína F. Además, los plásmidos F y HN se cotransfectaron para examinar la actividad de fusión en el ensayo transitorio, ya que tanto las proteínas F como HN son necesarias para la formación de fusión (Figuras 3B y 3C). La proteína WtF se escindió mediante la proteasa huésped más eficazmente que la proteína F con la mutación R, S o S-KM en el sitio de escisión de la proteína F, se detectó muy poco producto de escisión de la proteína F (F1) en F con el sitio de escisión S y no se detectó producto de escisión en células transfectadas con plásmido F lentogénico. La proteína F de la construcción R y S tiene un sitio de glicosilación unido a N (NXT) en el sitio de escisión, lo que resulta en una movilidad de migración más lenta en la SDS-PAGE que en la lento y la S-KM, ya que la mutación KM eliminó el sitio de glicosilación. Estos datos demostraron que las mutaciones R y S en el sitio de escisión de la proteína F afectaron a la escisión de la proteína F y que la S-KN es más eficiente que la S. Dado que el gen F y HN se clonaron en el vector pVito2-neo-MCS que codifica un gen EGFP, la formación sincicial puede ser visualizada por las células verdes fusionadas. Se observó una gran formación sincicial en las células 293 transfectadas con el plásmido wt F y HN. Todos los mutantes F con residuos R, S o S-KM en los sitios de escisión de la proteína F dieron como resultado una formación sincicial muy reducida.

Ejemplo 17. El virus r73T-R116i con inserción de 198 nt mostró un crecimiento más lento y un perfil diferencial de síntesis de ARN y proteínas en células DF-1 en comparación con las células Vero.

El virus R116i con 198 nt insertado entre la unión HN-L mostró una cinética de crecimiento más lento en células DF-1 de pollo en condiciones de moi alto, como se muestra en las figuras 6B y 6D. La diferencia de crecimiento de R116i con la inserción de 198nt se redujo en comparación con el virus wt y el virus R que no tiene la inserción inergénica en los puntos de tiempo más tempranos de la infección (10-20 h). En las células Vero, la diferencia de crecimiento entre estos virus no era muy evidente (Figuras 6C y 6E). Para comprender si la inserción inergénica en los virus R116i afectó la transcripción y la replicación del ARN viral, se examinaron el ARN viral y la síntesis de proteínas en células DF-1 infectadas mediante análisis de transferencia Northern y Western, respectivamente (Figuras 6F y 6G). La síntesis de ARN y proteínas de R116i con inserción de 198 nt se redujo en gran medida en las células DF-1 infectadas. Por el contrario, en las células Vero infectadas, la transcripción del gen corriente arriba, como el ARNm de NP, aumentó considerablemente en las células infectadas con R118i-198 o 198RSV, mientras que los ARN genómicos de estos dos virus se redujeron. El nivel de la proteína L de estos dos virus se redujo, pero los otros productos de proteínas virales aumentaron, tal como NP, F y HN, como se muestra en las figuras 6H y I. Los datos obtenidos en las figuras 6F-I se realizaron a condición alta de moi (moi = 5). La síntesis de ARN y proteínas se evaluó adicionalmente en condiciones bajas de moi (moi = 0.001). Nuevamente, R116i-198 o 198RSV tuvieron un perfil de síntesis de ARN y proteína diferencial en células DF-1 y Vero. La síntesis de ambos ARN y proteínas de R116i-198 o 198RSV se redujo en células DF-1 de pollo (Figuras 6J). En contraste, el ARN y la proteína de la corriente superior aumentaron en las células Vero, pero el nivel de ARNm L y la proteína L se redujeron debido a la inserción intergénica de la secuencia 198nt (Figura 6K). El ARN viral y la síntesis de proteínas se compararon en líneas celulares humanas, fibrosarcoma humano HT1080 y células Hela, y células DF-1 (Figura 6L). Estos datos confirmaron que R116i-198 o 198RSV tenían expresión diferencial, la síntesis de proteínas y de ARN corriente arriba aumentaba mientras que la expresión de la proteína L tenía inhibida la expresión. Estos datos explicaron por qué los virus R116i-198 o 198RSV se replicaron bien en líneas celulares de mamíferos como células Vero, humanas HT1080 y Hela, pero no crecieron bien en huevos de pollo embrionados y células DF-1 de pollo. También proporcionó una base de reducción de la patogenicidad de los pollos de estos virus R116i, como lo demuestra su bajo valor de índice de patogenicidad intracerebral (ICPI).

Ejemplo 18. La expresión del transgén del GM-CSF del ratón tuvo una eficacia de inhibición del crecimiento tumoral más baja que la expresión del transgén del GM-CSF humano en R116i-198RSV, pero no en S116-KM.

La figura 11C comparó la contribución del mGM-CSF con la expresión del transgén hGM-CSF en la actividad oncolítica de R116i-198RSV y S116-KM en el modelo de tumor de ratón con xenoinjerto HT1080. El transgén hGM-CSF no reacciona de forma cruzada con mGM-CSF y por lo tanto, fue usado como el control. El transgén mGM-CSF en R116i-198 administrado por vía intratumoral tuvo una eficacia menor en la inhibición del crecimiento tumoral en comparación con hGM-CSF. Se observó una inhibición similar del crecimiento tumoral de mGMCSF y hGM-CSF para el virus S116. Los títulos víricos en tumores tratados con virus se determinaron mediante un ensayo de placa (Figura 11D). En el día 4 posterior a la inyección del tumor, se detectó un título similar para el R116i-198RSV y S116-KM con los pares mGMCSF o hGM-CSF. Sin embargo, en el día 7 posterior a la inyección, R116i-198RSV con mGM-CSF no se detectó, mientras que R116i-198RSV con hGM-CSF todavía tenía un título viral de aproximadamente 4.5 logs/g de tejido. No hubo diferencia en los títulos víricos de S116 con hGM-CSF o mGM-CSF. Estos datos indican que la expresión de mGM-CSF por R116i facilitó la eliminación viral.

Se examinó la infiltración de células inmunes en tejidos tumorales infectados con virus (Figura 11E). R116i-198RSV con mGMCSF tenía el mayor número de células de neutrófilos, NK y macrófagos en los tumores tratados en comparación con R116i-198RSV con hGM-CSF y el par S116 hGM-CSF y mGM-CSF. Las citoquinas y las quimioquinas en el tumor tratado con virus se determinaron mediante el ensayo luminex (Figura 11F). Los cuatro virus estimularon la producción de citoquinas y quimioquinas en muchos pliegues en comparación con los tejidos

tumorales no tratados. La expresión de mGM-CSF por R116i es aproximadamente 10 veces más alta que S116 (106.7 vs 9.9 veces).

La figura 11G mostró una actividad de inhibición del crecimiento tumoral similar de R116i con 198 o 318 nt insertados entre la unión HN-L que contiene el mismo transgén hGM-CSF en el modelo de tumor de ratón con xenoinjerto HT1080. La inserción de 318 nucleótidos en la unión HN-L no redujo la actividad del virus oncolítico viral.

Ejemplo 19. Evaluación de la inactivación del NDV mediada por el complemento y el papel de las proteínas reguladoras en la evasión del complemento.

El sistema del complemento (C') es un sistema de defensa importante contra la invasión microbiana en el huésped. Hay alrededor de 30 glucoproteínas diferentes en el sistema del complemento humano, de las cuales 20 actúan en plasma y 10 son reguladores o receptores en las membranas celulares. Los reguladores de C' unidos a la membrana (RCA) incluyen 4 moléculas bien caracterizadas: hCD46, hCD55, hCD59 y hCD35. Su función principal es proteger las células humanas contra el ataque autólogo del complemento sin afectar el papel de C' en la eliminación de agentes extraños. Estas proteínas RCA son específicas de la especie huésped. El NDV usado para terapia viral en el pasado generalmente se producía en huevos de pollo embrionados. Se espera que el virus oncolítico del NDV administrado por inyección intravenosa a pacientes con cáncer se elimine rápidamente, por lo que se reduce la dosis viral eficaz. Dado que los virus envueltos producidos a partir de células humanas incorporan proteínas RCA durante su salida de las células infectadas, por lo tanto, es deseable producir NDV en cultivos celulares humanos para reducir la lisis o inactivación viral mediada por C'.

Se evaluó la sensibilidad de NDV a la inactivación mediada por C' examinando el NDV producido en huevos de pollo embrionados, líneas de células de suspensión humana 293 y Hela S3 (Figura 17). El virus que creció en los huevos fue sensible a la inactivación de C', la inhibición del suero se eliminó mediante tratamiento térmico (56 °C, durante 30 minutos) del suero. El complemento de cobaya tuvo un nivel similar de efecto de inactivación viral (datos no mostrados), lo que confirma que la inactivación viral se debió a C'. Además, los virus producidos a partir de células Hela fueron más resistentes a la inactivación viral mediada por C' humano que las células 293 y huevos. De este modo, los datos sugieren que las células Hela son mejores que las células 293 para la producción de virus oncolíticos NDV, lo que probablemente resultó en una eliminación viral más lenta y, de este modo, aumentó el índice terapéutico.

Para explicar por qué el NDV producido a partir de las células Hela S3 es más resistente a C', las líneas celulares de suspensión 293 y Hela S se evaluaron para determinar los niveles de las 4 proteínas RCA humanas bien caracterizadas, hCD46, hCD55, hCD59 y hCD35. hCD35 no se detectó en las células 293 y Hela por análisis de Western y, por lo tanto, los datos no se muestran en la figura 18. **hCD46**, hCD55 y hCD59 se detectaron en mayor abundancia en células Hela S3 que en células 293. De este modo, los niveles de proteínas RCA se correlacionan inversamente con la sensibilidad viral a C'.

Para determinar si las tres proteínas RCA regulan la función de C', se insertó el transgén hCD55, hCD59 o **hCD46** en el genoma de NDV mediante genética inversa y se produjeron virus recombinantes que expresan cada una de las tres proteínas RCA. El análisis de transferencia Western mostró que cada una de estas proteínas RCA se expresaba por virus y se incorporaba en viriones (Figura 19). Se determinó que hCD55 es la proteína RCA principal que confiere a la función de inactivación de C' (Figura 20). El virus que expresa hCD55 producido en huevos con hCD55 incorporado en viriones fue el más resistente a la inactivación mediada por C', que está muy cerca de los virus producidos en las células Hela. En comparación, la hCD46 tuvo una mejora marginal en términos de resistencia viral a la inactivación de C' y la hCD59 no tuvo un papel detectable en la regulación de C'.

En conclusión, para reducir la eliminación viral para la terapia viral oncolítica y para mejorar el índice terapéutico del NDV, las células Hela se consideran la línea celular de elección para la producción viral.

Los resultados descritos en este documento se obtuvieron usando los siguientes materiales y métodos.

Células y virus.

Se usaron las siguientes líneas celulares y los medios correspondientes: línea celular Vero de riñón de mono verde africano (ATCC) y fibrosarcoma humano (HT1080, ATCC), medio esencial mínimo de Eagle (EMEM, Hyclone) con suero bovino fetal al 10% (FBS); línea 51D11 del clon Vero (MedImmune), medio libre de suero (SFMMegaVir, Hyclone) con glutamina al 1%; las células de fibroblastos de piel humana normal (CCD1122Sk, ATCC), medio de Dulbecco modificado de Iscove (IMEM) con FBS al 10% formulado por ATCC. Los virus de la enfermedad de Newcastle recombinante (NDV) se cultivaron en cavidades alantoicas de huevos de pollo embrionados libres de patógenos específicos (SPF) de 10-11 días, células Vero o 51D11 clon de vero.

Construcción de ADNc antígeno de NDV y plásmidos de soporte NP, P y L.

El ARN vírico de la cepa 73T de NDV se obtuvo de Dr. Mark Peeples (Nationwide Children's Hospital). Las secuencias de NDV (GenBank) se alinearon para obtener secuencias de consenso para diseñar oligonucleótidos de ADN para RT-PCR del ARN viral. Se generaron seis fragmentos superpuestos de ADNc subgenómico que abarcan todo el genoma de NDV mediante RT-PCR de alta fidelidad (Figura 1). El vector pUC19 se modificó para incluir un enlazante oligonucleotídico de 88 nt que contenía sitios de restricción introducidos entre los sitios EcoRI y HindIII para el ensamblaje secuencial de ADNc antigenómico de longitud completa de la cepa NDV 73T. Además, el plásmido de ADNc de la cepa 73T (p73T) contiene un promotor de ARN polimerasa T7 de 27 nucleótidos (nt) en el extremo 5' y un 189 nt que contiene una secuencia de ribozima antigenoma de HDV y una señal de terminación de la transcripción de la ARN polimerasa T7 en el extremo 3'. Para generar NDV no virulento, la secuencia que codifica el sitio de escisión de la proteasa de la proteína de fusión se modificó mediante mutagénesis dirigida al sitio de la cepa LaSota de NDV no virulenta (lentogénica, lenta) o glucoproteína B (gB) del citomegalovirus (S116). Para la construcción de plásmidos de expresión NP, P y L, los marcos de lectura abiertos de la proteína (ORF) se amplificaron mediante RT-PCR y se clonaron en el plásmido pCITE2a bajo el control de la ARN polimerasa T7.

Inserción del transgén en el NDV.

Para la inserción de un transgén en la unión P-M, se introdujo un sitio de restricción Afel en nt 3148 en el plásmido subclon que contiene el fragmento SacII-PmlI (Fig. 2A). El ADNc que codifica el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos de ratón o humano (GM-CSF) o interleucina 2 (IL-2) fue optimizado con codones y sintetizado por el ADN 2.0. Un casete de genes contiene el extremo del gen (GE) de N, el inicio del gen (GS) de P y el marco de lectura abierto (ORF) del transgén, que se insertó en el sitio Afel. El fragmento SacII-PmlI del plásmido resultante se barajó en el plásmido r73T y se nombró como p73T-P1.

Para insertar un transgén en la unión HN-L entre HN ORF y la secuencia de la señal de terminación del gen (GE) de HN, se introdujo un sitio de restricción Afel en nt 8231 en el plásmido que contiene el fragmento AgeI-XbaI (Figura 2A). El casete del gen se generó por PCR usando un par de cebadores antisentido y de sentido de fosfato (Tabla 3) y se insertó en el sitio Afel.

Tabla 3. Secuencias de cebadores oligonucleotídicos para la inserción de un casete transcripcional de transgén.

Transgén	Sentido	Antisentido
hGM-CSF	5' <u>TTAAGAAAAAATACGGGTAGAA</u> cgccaccATGTGGCTGCAGAGCCTGCTG 3'	5' TCATTCCTGCACGGGCTCCCAGCAGTC 3'
mGM-CSF	5' <u>TTAAGAAAAAATACGGGTAGAA</u> cgccaccATGTGGCTGCAGAACCTGCTG TTCTGG 3'	5' GTATCACTTCTGGCCGGGTTTCTTGCACTC 3'
hIL-2	5' <u>TTAAGAAAAAATACGGGTAGAA</u> cgccaccATGTATAGGATGCAACTTCTG TC 3'	5' GTCAAGTCAGGGTAGAGATAATGCTCTGGC 3'
mIL-2	5' <u>TTAAGAAAAAATACGGGTAGAA</u> cgccaccATGTATTCAATGCAGCTGGCA TC 3'	5' GAGTTACTGAGGGGAAGTTGAAATG 3'
EGFP	5' <u>TTAAGAAAAAATACGGGTAGAA</u> cgccaccATGGTGAGCAAGGGCGAGGA GCTG 3'	5' AATTACTTGTACAGCTCGTCCATGC 3'
EGFP (HN-L)	5' <u>ACGGGTAGGACATGGTGAGCAAGG</u> GCGAGG 3'	5' TTTTCTAACATAGTATAATTAATCACCAAGGATACAATTGGCCAGAAAAGAGCCTATTAATATGTGATTTTCGCGTTACTTGTACAGCTCGTCCA T 3'

Las secuencias de terminación de gen (GE) y de inicio de gen (GS) están subrayadas. La secuencia de Kozak se muestra en minúsculas. Las secuencias correspondientes a 5' o 3' secuencias del transgén se muestran en cursiva. Excepto para el EGFP (H-N), todos los otros pares de cebadores se pueden usar para insertar el transgén entre G-M o HN-L.

hGM-CSF: factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos humanos; mGM-CSF: ratón GM-CSF; hIL-2 y

mIL-2 corresponden a interleucina 2 de ratón y humana (IL-2), respectivamente.

El fragmento AgI-XbaI del plásmido resultante se barajó en el plásmido p73T, produciendo p73T-HN1. Otra estrategia para insertar la secuencia en la unión HN-L fue insertar un casete o secuencias transgénicas de otros paramixovirus entre la señal de terminación del gen (GE) de la HN y la señal de inicio del gen (GS) de la L (Figura 4) en el sitio Afel que se introdujo en nt 8359. El plásmido de ADNc de FL se designó p73T-R116i. Dado que la longitud del genoma de NDV tiene que estar en un múltiplo de 6 nucleótidos (regla de 6), se hizo que el ADNc antígeno de diversas construcciones siguiera la regla de 6.

Para insertar dos casetes de transcripción en la unión P-M, se introdujo un sitio Afel al final del ORF de GM-CSF (nt 3619) (Figura 2B). El ORF de IL-2 se amplificó usando un par de cebadores antisentido y de sentido de fosfato que contenían las secuencias GE y GS y se insertó en el sitio Afel. El fragmento SacII-PmII del plásmido resultante, incluidos los casetes transcripcionales de GM-CSF e IL-2, se intercambió de nuevo en el plásmido r73T, produciendo p73T-P2.

Generación de virus quiméricos r73T que contienen ectodominio de otros paramixovirus.

El ADN genómico del NDV quimérico se produjo reemplazando la F y la HN del NDV con las del paramixovirus de paloma 1 (PPMV-1). La secuencia de codificación C-terminal para la cola citoplásmica y la porción transmembrana de NDV 73T F (residuos de aminoácidos 503 a 553) se unió con la secuencia de codificación de la proteína ectodominio F de PPMV-1 (residuos 1 a 502), las secuencias de codificación N-terminal de NDV HN (residuos de la secuencia de aminoácidos 1 a 45) se fusionaron con la HN (residuos 46 a 577) mediante la superposición de reacciones de PCR usando el kit GeneArt (Invitrogen). El fragmento amplificado fue digerido y clonado en ADNc de NDV digerido con PmII-AgeI. El virus de parainfluenza 5 (PIV-5) F o HN se introdujo en el ADNc antígeno del NDV 73T mediante una estrategia de clonación similar. El ectodominio PIV5 F (residuos 1 a 486) se fusionó con la transmembrana y la cola citoplásmica de NDV 73T F (residuos 503 a 553). El NDV HN (residuos 1 a 45) se unió con el ectodominio PIV5 HN (residuos 36 a 565). El fragmento de ADNc se clonó en ADNc antígeno de NDV digerido con PmII-AgeI.

Recuperación de NDV recombinante a partir de plásmidos de ADNc transfectados.

La línea celular de mamífero que expresa la ARN polimerasa T7, tal como las células BHK-T7, se transfectó con los tres plásmidos que expresan las proteínas NP, P y L del NDV (0.4 µg, 0.4 µg y 0.2 µg por pocillo de una placa de 6 pocillos, respectivamente) y un plásmido que codifica el ADNc antígeno de NDV (1.6 µg) usando Lipofectamine 2000. Tres días después de la transfección, el sobrenadante de cultivo celular se inyectó en las cavidades alantoicas de huevos de pollo embrionados SPF de 10 a 11 días o pasando en células Vero para amplificar el virus rescatado. La recuperación del virus se confirmó mediante un ensayo de hemaglutinación usando 1% de glóbulos rojos de pollo (RBC). El rescate de virus también se puede realizar por electroporación de los plásmidos de ADNc antígeno, NP, P, L, junto con un plásmido que expresa la ARN polimerasa T7 en células Vero como se describió anteriormente (Kaur et al., Optimization of plasmid-only rescue of highly attenuated and temperature-sensitive respiratory syncytial virus (RSV) vaccine candidates for human trials. 2008 J. Virol. Methods 153:196-202). El virus recuperado se confirmó mediante secuenciación de ADNc amplificado por RT-PCR.

Pasaje in vitro para seleccionar virus con sitio estable de escisión de la proteína F.

Para examinar si la secuencia de escisión de la proteína F (FPCS) era estable y si se podían seleccionar mutaciones estabilizantes después del pasaje en cultivo de tejidos, r73T-S116 se pasaron en serie 10 veces en células Vero y fibrosarcoma humano HT1080 a MOI de 0.01. Después de cada 2-3 pasajes, se aisló ARN viral de los medios de cultivo, se amplificó el ADNc por RT-PCR y se secuenciaron los genes F y/o HN.

Morfología de la placa vírica en células Vero y cuantificación del título por ensayo de placa.

Las células Vero en una placa de 6 pocillos se infectaron con virus diluidos en serie y se incubaron con un 1% de revestimiento de metilcelulosa a 37 °C, durante 3 días o 6 días para la morfología de la placa en presencia de tripsina (TrypLE™, Invitrogen) para cuantificación del título viral. Las monocapas celulares se fijaron con metanol y se tiñeron con el anticuerpo policlonal anti-NDV de pollo contra el virus NDV inactivado seguido de la exposición a anticuerpo anti-pollo conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) (Dako).

Prueba de patogenicidad del virus de pollo por el tiempo medio de muerte del huevo (MDT) y los ensayos de índice de patogenicidad intracerebral (ICPI).

La patogenicidad de los virus r73T se determinó mediante la prueba del tiempo medio de muerte (MDT) en huevos de pollo embrionados SPF de 10 días. La prueba ICPI en pollos SPF de 1 día se realizó en the USDA's National Veterinary Service Laboratory (NVSL, Ames, Iowa). Para la prueba MDT, se inocularon 0.1 ml de una serie de dilución de 10 veces entre 10^{-6} y 10^{-9} en las cavidades alantoicas de huevos de 8 a 10 de 9 a 10 días por dilución y se incubaron a 37 °C. Los huevos se examinaron dos veces al día durante 7 días para registrar el momento de la muerte del embrión. El MDT se calculó como el tiempo medio (h) para la dosis letal mínima de virus para matar a todos los embriones inoculados. El ensayo MDT proporciona una predicción razonable de la patogenicidad del virus. Los virus con MDT <60 h son normalmente cepas verogénicas (virulentas); con MDT = 60 a 90 h, cepas mesogénicas (intermedias); > 90 h como cepas letogénicas (avirulentas). Para la prueba ICPI, se inocularon 0.05 ml de una dilución 1:10 de líquido alantoico infeccioso nuevo para cada virus en el grupo de 10 pollos SPF de 1 día a través de la vía intracerebral. Las aves se observaron para los síntomas clínicos y la mortalidad una vez cada 8 horas durante un período de 8 días. En cada observación, las aves se calificaron de la siguiente manera: 0 si es normal, 1 si está enfermo y 2 si está muerto. El ICPI es la media de la puntuación por ave por observación durante el período de 8 días. Los valores de ICPI van desde 0.0 a 2.0. El bajo virulento (LoND): ICPI <0.7; virulento (vND): ICPI ≥ 0.7.

La muerte de las células víricas se evaluó mediante un ensayo de viabilidad celular.

Las células se sembraron en placas de 96 pocillos a 5×10^3 células/pocillo durante la noche se infectaron con r73T a diversos MOI. La viabilidad celular se determinó mediante el kit CellTiter Glo (Promega) según el manual del fabricante. El porcentaje relativo de células supervivientes se determina comparando el nivel de ATP de cada muestra de prueba con el control de muestra no tratada de 100% viable. Los datos presentados en la tabla son el porcentaje relativo de las células muertas.

El efecto del NDV en la muerte tumoral se evaluó en el modelo de xenoinjerto subcutáneo HT1080.

Se implantaron subcutáneamente (s.c.) ratones atímicos desnudos homogéneos de NCR (Taconic) con 5×10^6 células HT1080 (en 100 µl de PBS) en un flanco. El tratamiento viral comenzó cuando los tumores alcanzaron un volumen de 65-300 mm³. Se administró 73T recombinante en 100 µl a diferentes niveles de dosis ya sea localmente mediante inyección intratumoral (i.t) o sistémicamente mediante inyección intratumoral (i.t) en la vena de la cola, respectivamente. Los animales de control se inyectaron solo con 100 µl de PBS. El crecimiento del tumor se midió usando un calibrador digital, y el volumen del tumor se calculó como $0.5 \times (\text{altura}) \times \text{ancho} \times \text{largo}$ (mm³). Los ratones se sacrificaron cuando el peso corporal se redujo en un 20% del peso corporal original o el volumen del tumor superó los 2000 mm³.

Biodistribución viral en ratones con xenoinjerto HT1080.

Se inyectaron i.v. nueve ratones desnudos que portaban tumores subcutáneos de xenoinjerto de fibrosarcoma humano HT1080 con 10^8 pfu de r73T-R116i-hGM-CSF. Tres ratones se terminaron a 1, 4 y 8 día (s) después de la inyección. Un ratón inyectado con PBS se terminó el día 8. Se recogieron muestras de tumores, pulmones, bazo, ovarios y suero. El título de virus infeccioso en los homogeneizados de tejido se cuantificó mediante ensayo de placa.

Cuantificación del nivel de proteína GM-CSF por ELISA.

Los tumores de ratones infectados con NDV e inyectados con PBS se homogeneizaron en PBS usando un disociador de MACS suave (Miltenyi Biotec) según las instrucciones del fabricante. El sobrenadante de tejidos homogeneizados o suero recogido de ratones se analizó para determinar el nivel de GM-CSF mediante un kit ELISA DuoSet (R&D).

Análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos se realizaron usando el software GraphPad Prism 6.0. La prueba t no pareada se usó para evaluar las diferencias en la regresión del tumor entre los grupos. El software GraphPad Prism también se usó para calcular la IC50 de rNDV 73T para la muerte de células in vitro en células normales y tumorales.

REIVINDICACIONES

1. Una cepa 73T del virus de la enfermedad de Newcastle atenuado (NDV) en la que se modifica el sitio de escisión de la proteína F de tipo salvaje (FPCS) que tiene la secuencia de aminoácidos 111G-R-R-Q-K-R/F117, y en la que la secuencia de escisión de la proteína F modificada (FPCS) comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en:
5
S116: 111H-N-R-T-K-S/F117;
S116K: 111H-N-K-T-K-S/F117;
S116M: 111H-N-R-M-K-S/F117;
S116KM: 111H-N-K-M-K-S/F-1118; y
10 R116: 111H-N-R-T-K-R/F-1118.
2. El virus de la enfermedad de Newcastle atenuado de la reivindicación 1, en el que el FPCS modificada es R116: 111H-N-R-T-K-R/F-1118.
3. El virus de la enfermedad de Newcastle atenuado de la reivindicación 1 o 2, en el que el virus comprende una región intergénica HN-L aumentada que comprende una secuencia no codificante entre 50 y 300 nucleótidos de longitud.
15
4. El virus de la enfermedad de Newcastle atenuado de la reivindicación 3, en el que la secuencia no codificante se deriva de un paramixovirus tipo -1 (APMV-1), un virus sincitial respiratorio (RSV) o una secuencia aleatoria.
5. El virus de la enfermedad de Newcastle atenuado de la reivindicación 3 o 4, en el que la secuencia no codificante tiene una longitud de 60, 102, 144 o 198 nucleótidos.
- 20 6. El virus de la enfermedad de Newcastle atenuado de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que el virus comprende una o más secuencias de polinucleótidos heterólogas insertadas en la unión P-M.
7. El virus de la enfermedad de Newcastle atenuado de la reivindicación 6, en el que las secuencias de polinucleótidos heterólogas codifican una citoquina, un ligando de la superficie celular y/o una quimiocina.
8. El virus de la enfermedad de Newcastle atenuado de la reivindicación 7, en el que la citoquina se selecciona del grupo que consiste en GM-CSF, IL-2, IL-21, IL-15, IL-12, y IL-12p70.
25
9. El virus de la enfermedad de Newcastle atenuado de la reivindicación 8, en el que la citoquina es GM-CSF humano.
10. El virus de la enfermedad de Newcastle atenuado de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que el FPCS modificada es R116: 111H-N-R-T-K-R/F-1118, la secuencia no codificante tiene una longitud de 198 nt, y la secuencia de polinucleótidos heteróloga codifica GM-CSF humano.
30
11. El virus de la enfermedad de Newcastle atenuado de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10 para usar en un método de tratamiento del cáncer.
12. El virus de la enfermedad de Newcastle atenuado para uso de la reivindicación 11, en el que el virus mata selectivamente células tumorales, en el que el virus contacta con una célula tumoral.
- 35 13. El virus de la enfermedad de Newcastle atenuado para uso de la reivindicación 11, en el que el virus induce la regresión del tumor en un sujeto, en el que el virus entra en contacto con una célula tumoral.
14. El virus de la enfermedad de Newcastle atenuado para uso de las reivindicaciones 11 a 13, en el que el cáncer es un cáncer seleccionado del grupo que consiste en cáncer de vejiga, ovario, cerebro, páncreas, próstata, sarcoma, pulmón, mama, cuello uterino, hueso, hígado, cabeza y cuello, gástrico, riñón, linfoma, leucemia, tiroides, colon, colorrectal y melanoma.
40
15. El virus de la enfermedad de Newcastle atenuado para uso de las reivindicaciones 11 a 14, en el que el virus de la enfermedad de Newcastle atenuado se administra por vía intravenosa, sistémica, intraperitoneal o intratumoral.

Figura 1 Construcción de ADNc antigénico NDV 73T

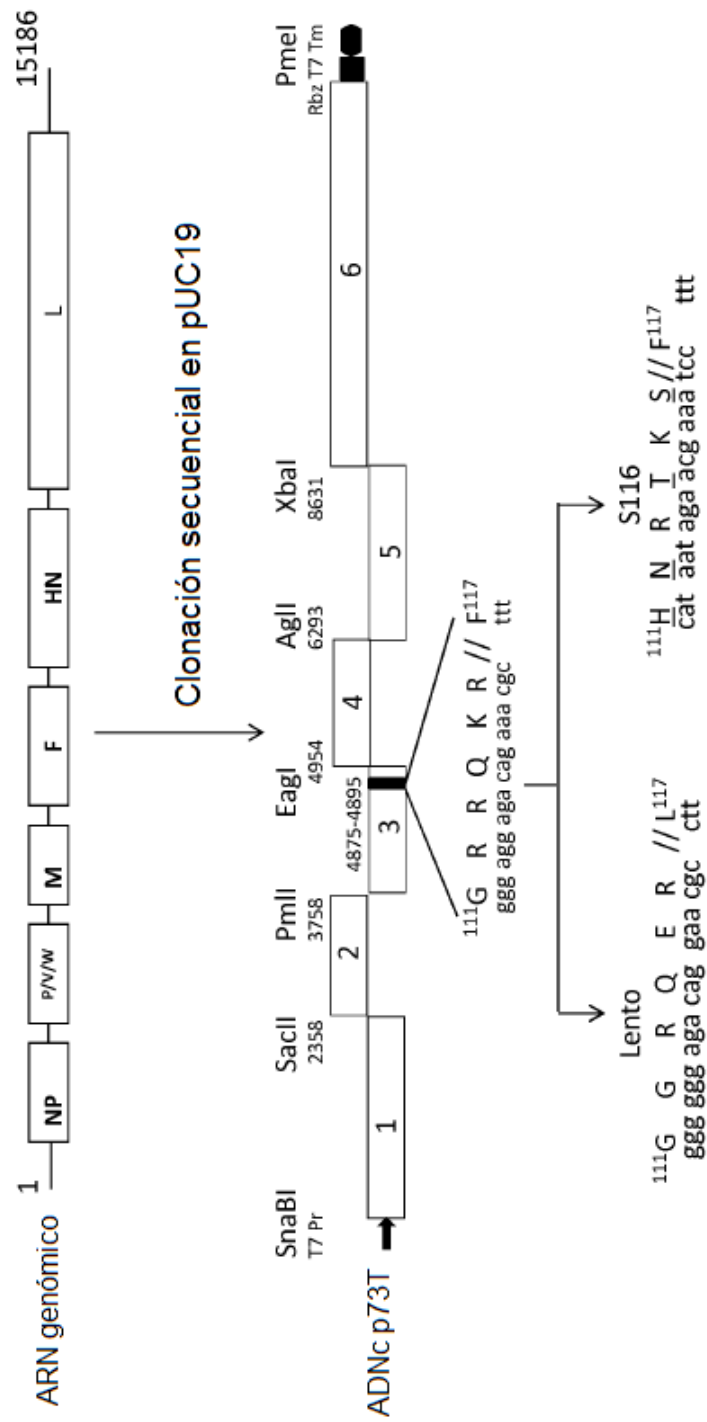


Figura 2. Inserción de casete(s) de transgenes en el genoma de NDV 73T

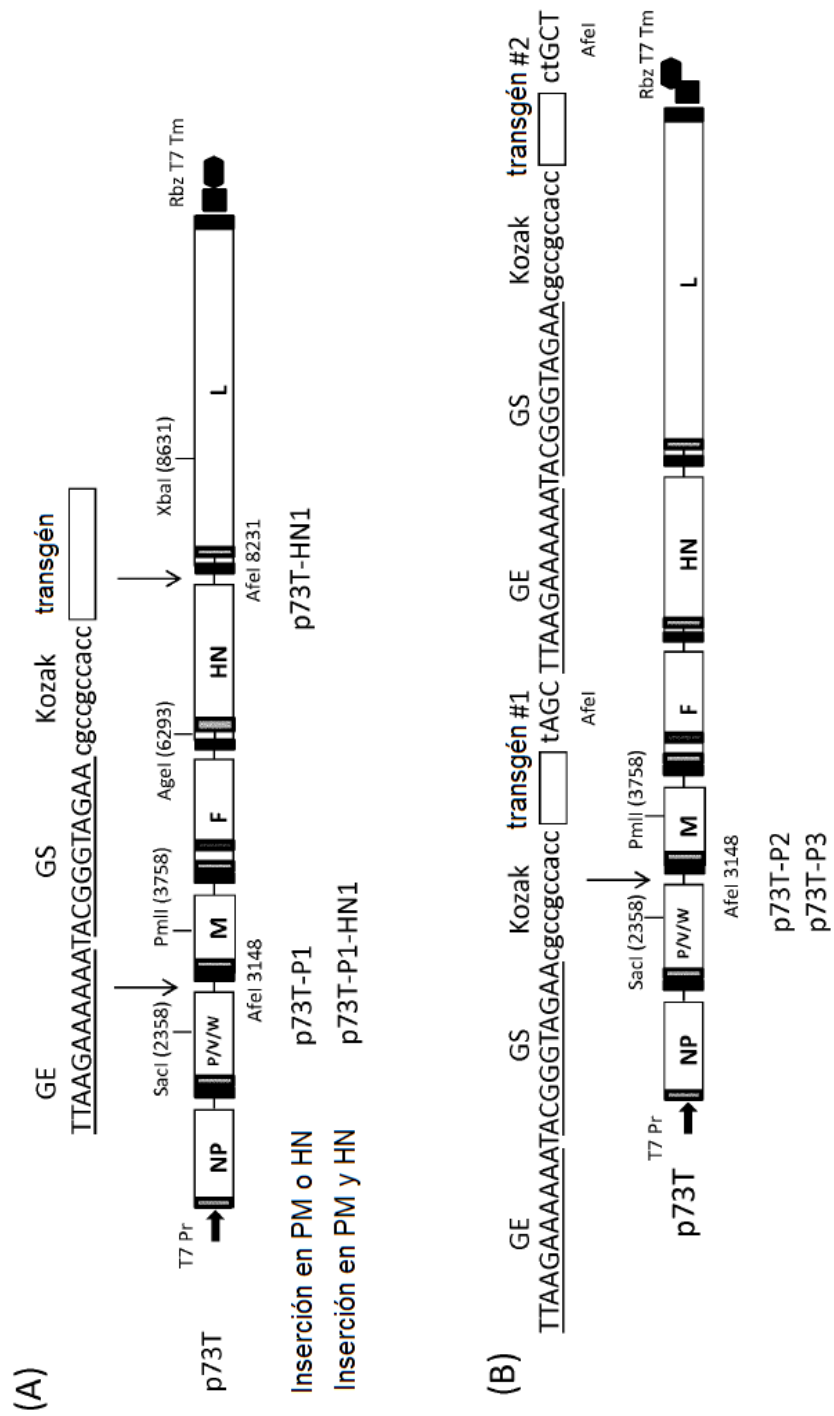
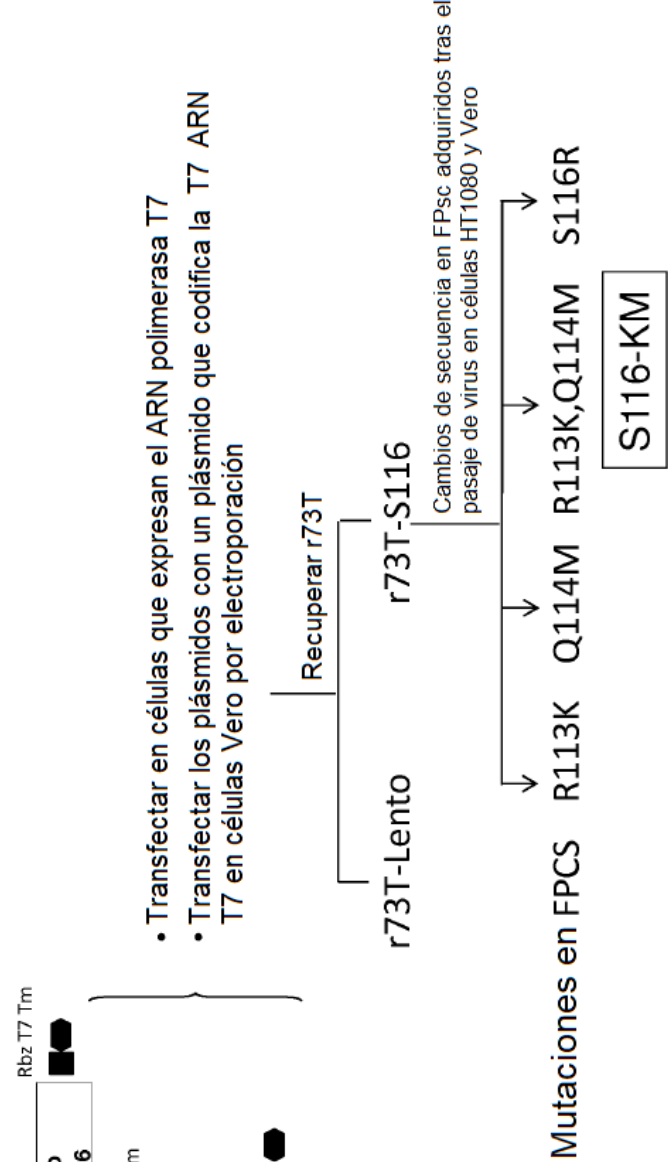


Figura 3A. Método para recuperar la cepa recombinante NDV infecciosa 73T (r73T) con FPCS modificado



Figuras 3B y C. Evaluación de la división de la proteína F y la actividad de fusión in vitro

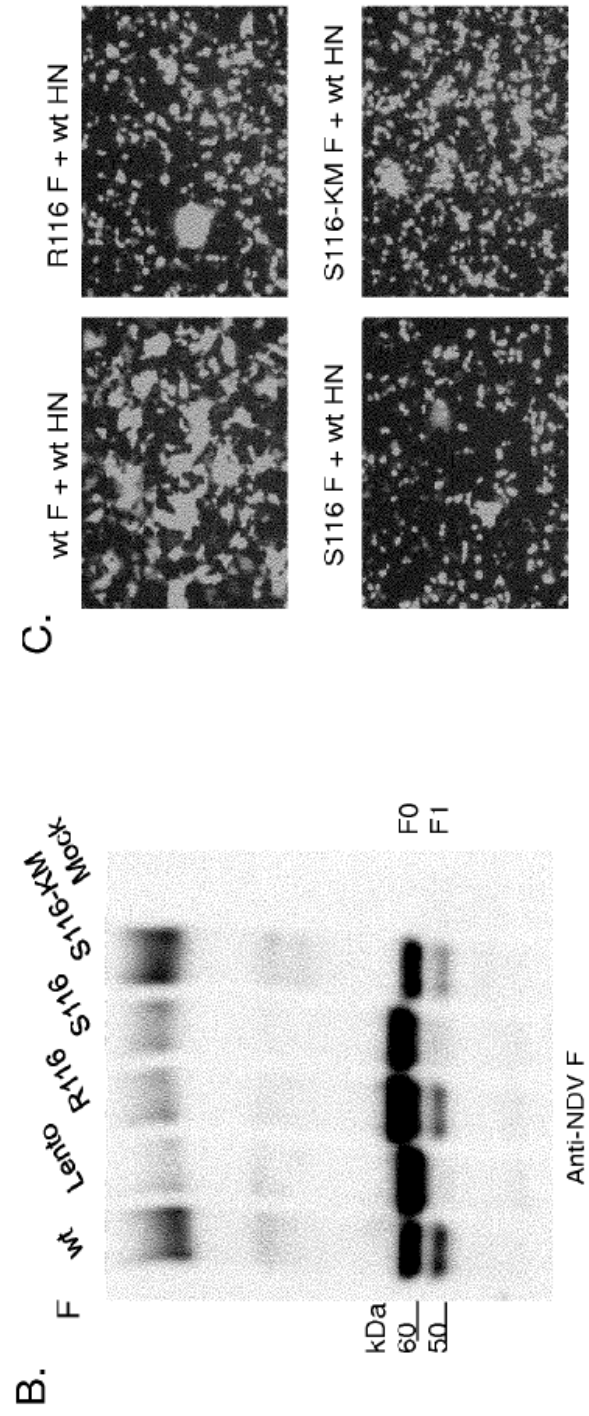


Figura 4. Resumen de las características de los derivados de r73T-lento y r73T-S116

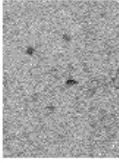
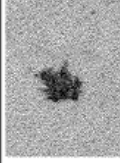
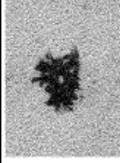
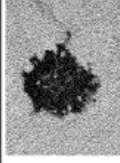
Nombre del virus (73T) ^a	Secuencia ^b FPSC	Formación ^c de placa	MDT (hrs) ^d	ICP ^e	Muerte ^e relativa de células HT1080	Vero (pfu/ml) ^g	Huevos (pfu/ml) ^h
-lento	¹¹¹ G-G-R-Q-E-R/L- ¹¹⁸		> 156	0.00	13	7.5E+03	5.7E+08
-S116	¹¹¹ H-N-R-T-K-S/F- ¹¹⁸		> 156	0.00	31	4.4E+06	4.6E+08
-S116K113	¹¹¹ H-N-K-T-K-S/F- ¹¹⁸		> 156	ND	29	3.4E+06	3.8E+08
-S116M114	¹¹¹ H-N-R-M-K-S/F- ¹¹⁸		> 156	ND	31	3.6E+06	3.4E+08
-S116K113M114 (S116-KM)	¹¹¹ H-N-K-M-K-S/F- ¹¹⁸		> 156	0.00	48	2.4E+06	4.2E+08
-R116	¹¹¹ H-N-R-T-K-R/F- ¹¹⁸		66	0.65	80	6.2E+06	1.7E+08

Figura 5. Estrategias para atenuar la virulencia del virus r73T-R116 en pollos

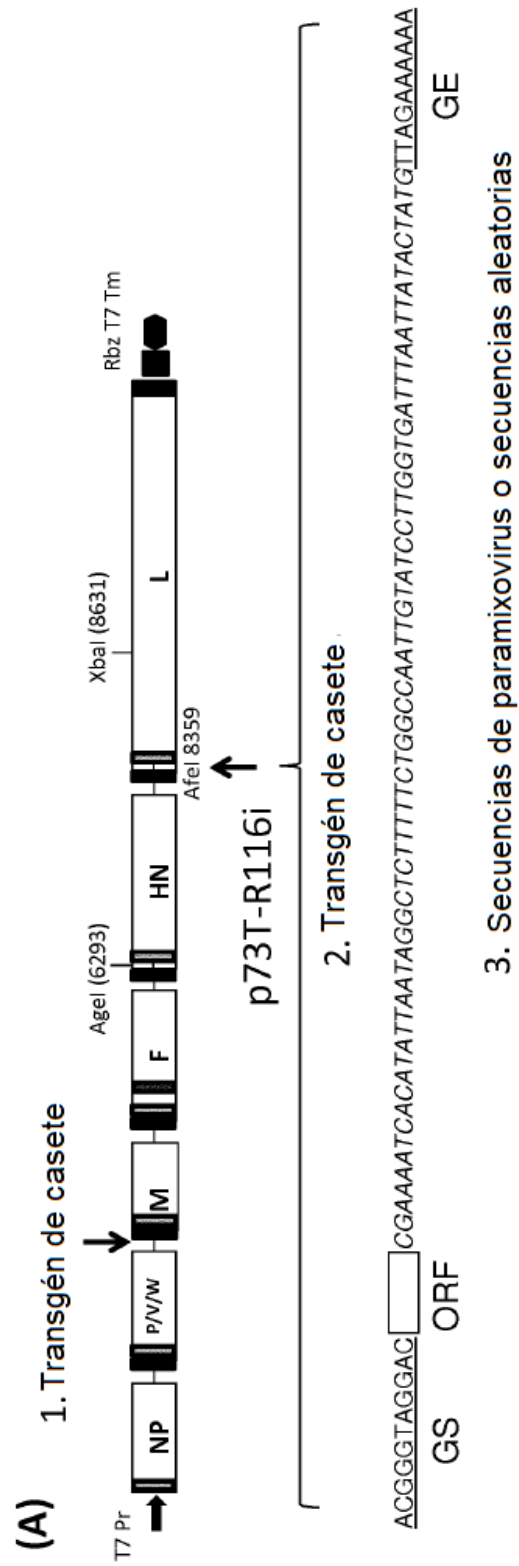


Figura 5. continuación

(B) Secuencias no codificantes insertadas en la unión HNL

APMV-1 N 318 nt
aatccttaagaaatcacagtacacaatcaaaagagatgtggggacaaaccacagctgtcactcgtcttctctgcagagggaagtgtcacttattgtggagagatactgtatgccaaagcacacag
attactcacatgcagctgaagtaggaatgcagtacgtgagcaccacactgggagcagagcgtacacagcagataactaaagaactcaggtagtgaggcaggtattgaccaagacatact
ctctgggaaggcaaaaacagcaaaaggggagggttgcaaatgtagacatacatgggggttgaaagaag

RSV-NP 198 nt
acttctgtcaccagcaaaatacggcatccaacaggagcacaggagatagttattgatactcctaattatgatgtgcagaaacacatcaataaagttatgtggcatgttatttaatacacagaagatgctaata
cataaattcactgggttaatagttatgttatatgcgatgtctaggttaggaagagaagacaccataaaat

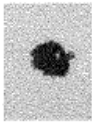
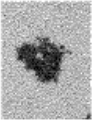
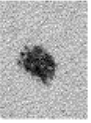
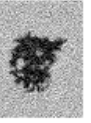
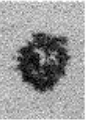
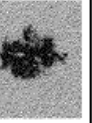
Secuencia aleatoria 198 nt
gctgtgaaagcaaaaaacatcgtctctccgttgcccaatactatcatgatccgccaatgatataaaaaaacccggcggcaaggtcgcgcgtcttcgcatacgacacatcgttgatagggcgtgaagtctca
acatgtggcactcctctggaccagtgaggacaacacgaacgcgcctctcttagaaggagatacaatgacccggctgagg

Secuencia aleatoria 144 nt
gctgtgaaagcaaaaaacatcgtctctccgttgcccaatactatcatgatccgccaatgatataaaaaaacccggcggcaaggtcgcgcgtcttcgcatacgacacatcgttgatagggcgtgaagtctca
acatgtggcactcctgga

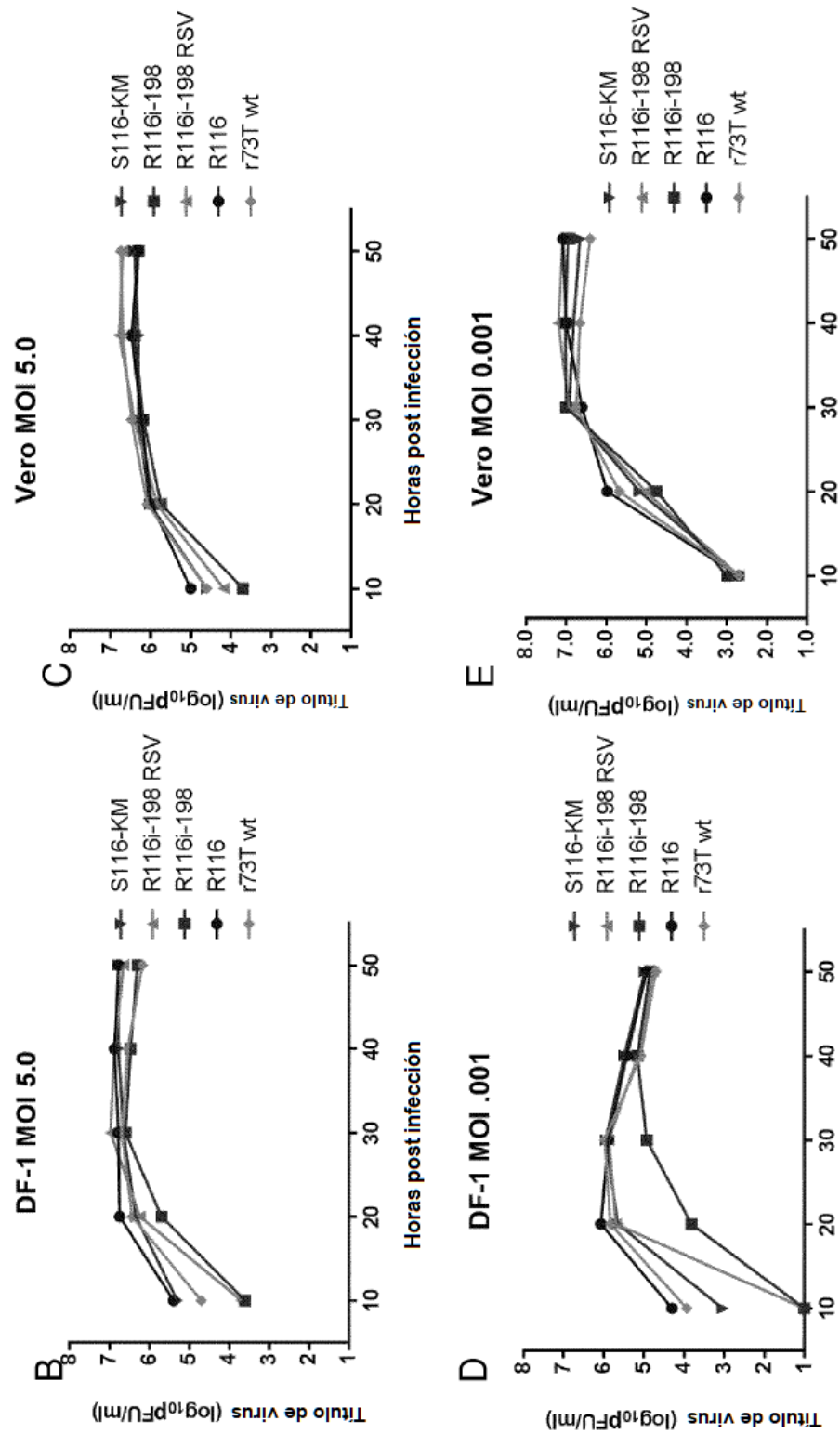
Secuencia aleatoria 102 nt
gctgtgaaagcaaaaaacatcgtctctcaacatgtggcactcctggaccagtgaggacaacgaacgcgcctctcttagaaggagatacaatgacccggctgagg

Secuencia aleatoria 60 nt
gctgtgaaagcaaaaaacatcgtctgcgcctctcttagaaggagatacaatgacccggctgag

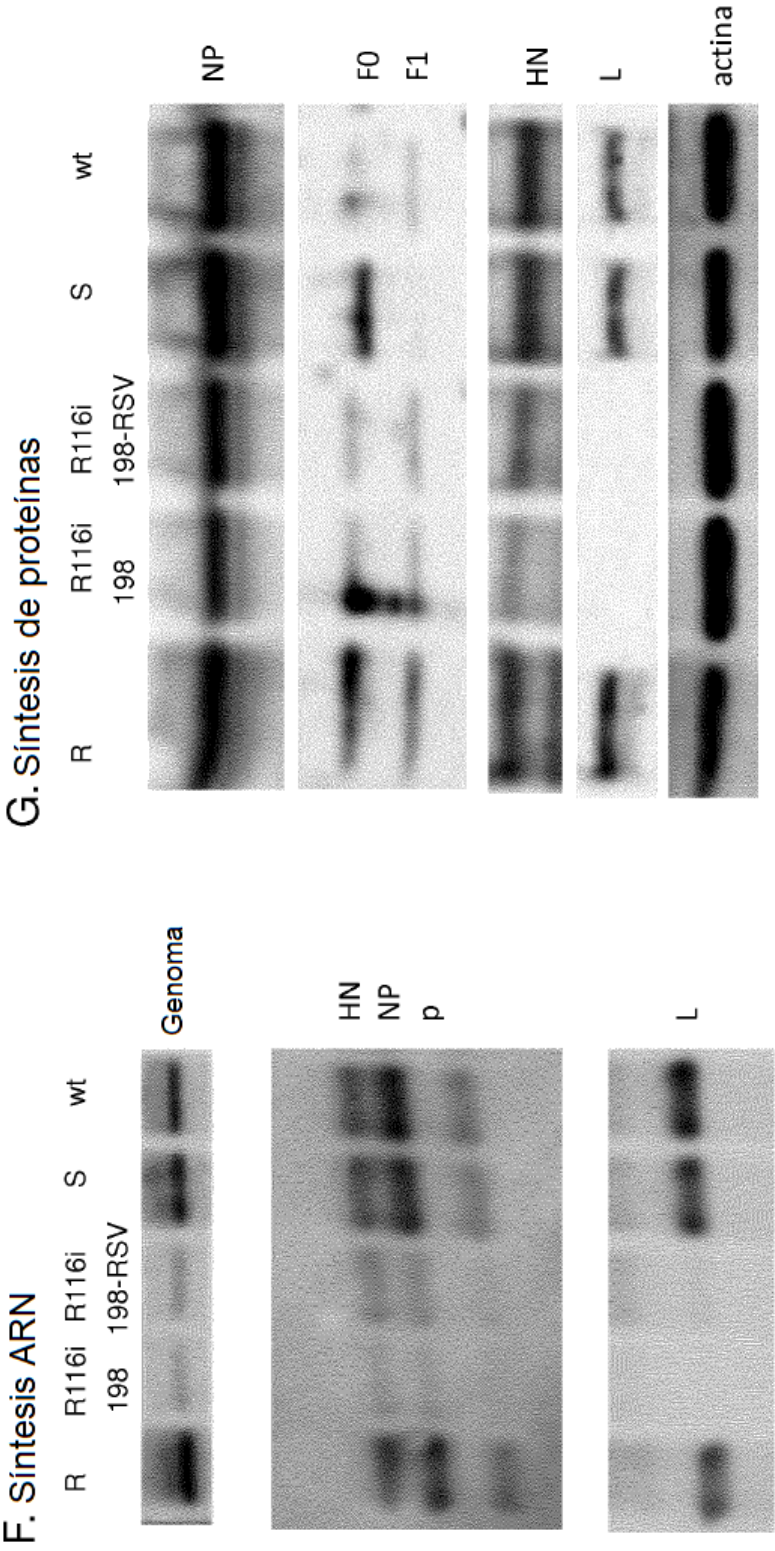
Figura 6A. Resumen de las características de los derivados de r73T-R116

Nombre del virus (r73T-R116i-) ^a	Inserción en HN-L ^b	formación ^c de placa	MDT (hrs) ^d	ICPI ^e	Muerte ^f relativa de células	Vero (pfu/ml) ^g	Huevos (pfu/ml) ^h
R116i	ninguna		62	0.65	80	6.3E+06	2.0E+08
318 APMV	APMV-N 318nt		>156	0.27	80	9.9E+06	5.0E+07
198 RSV	RSV-NP 198 nt		>156	0.0375	86	6.4E+06	6.0E+07
198	Aleatoria 198 nt		>156	0	85	7.7E+06	5.0E+07
144	Aleatoria 144 nt		79	0.74	82	7.3E+06	2.4E+08
102	Aleatoria 102 nt		64	0.51	83	6.4E+06	1.1E+08
60	Aleatoria 60 nt		64	0.78	75	6.5E+06	1.3E+08
GFP	EGFP casete del gen		86	0.82	87	5.7E+06	1.5E+08

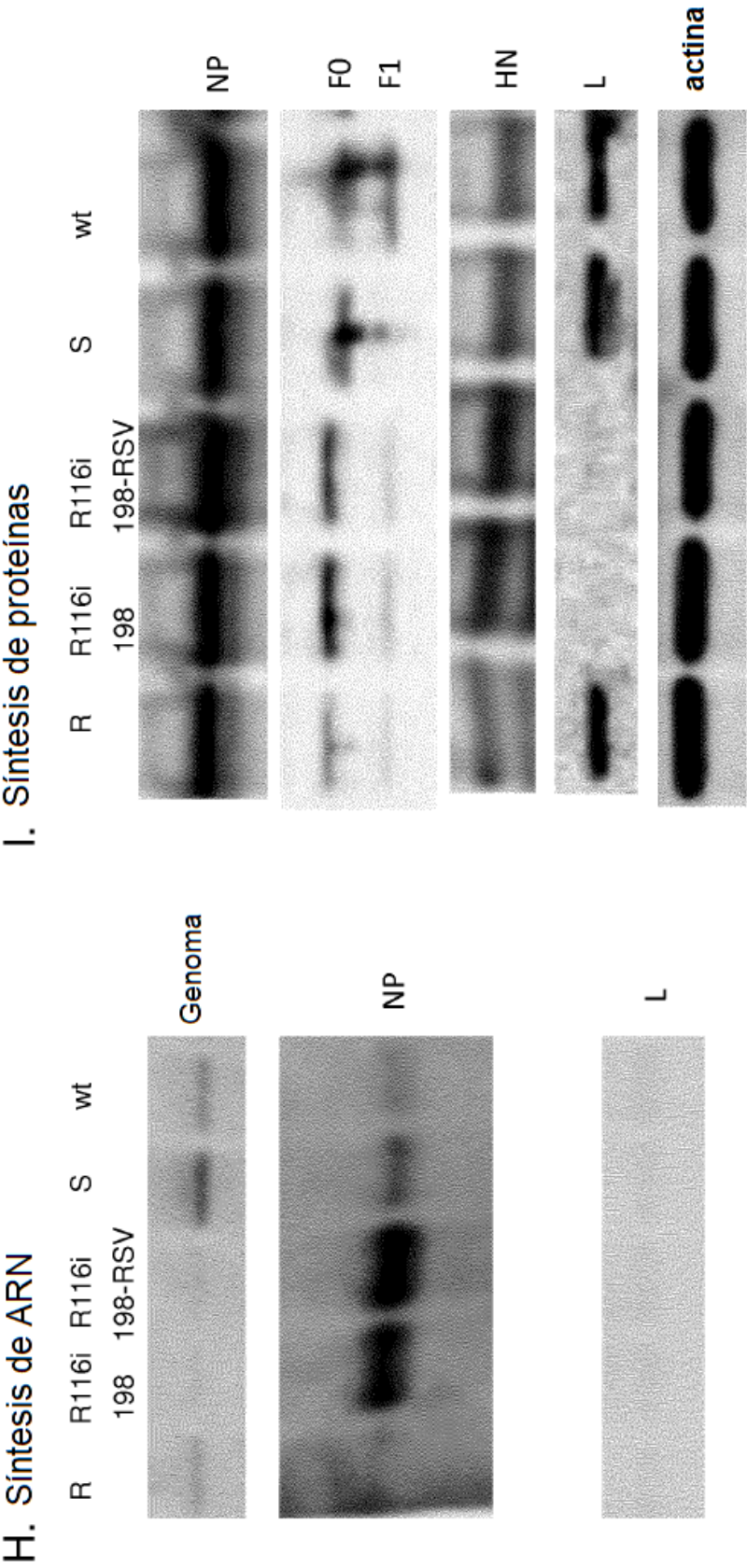
Figuras 6B-E. El virus r73T-R116i exhibe una cinética de crecimiento más lenta en las células DF-1 en comparación con las células Vero



Figuras 6F y G. La expresión génica de r73T-R116i se reduce en células de fibroblastos de pollo DF-1



Figuras 6H e I. La expresión del gen en el flujo ascendente de la inserción de HN-L está regulada por incremento, mientras que la expresión del gen en el flujo descendente está regulada por disminución en células Vero infectadas por el virus r73T-R116i.



Figuras 6J y K. La expresión génica en células DF-1 y Vero se ve afectada por la inserción en la unión HN-L

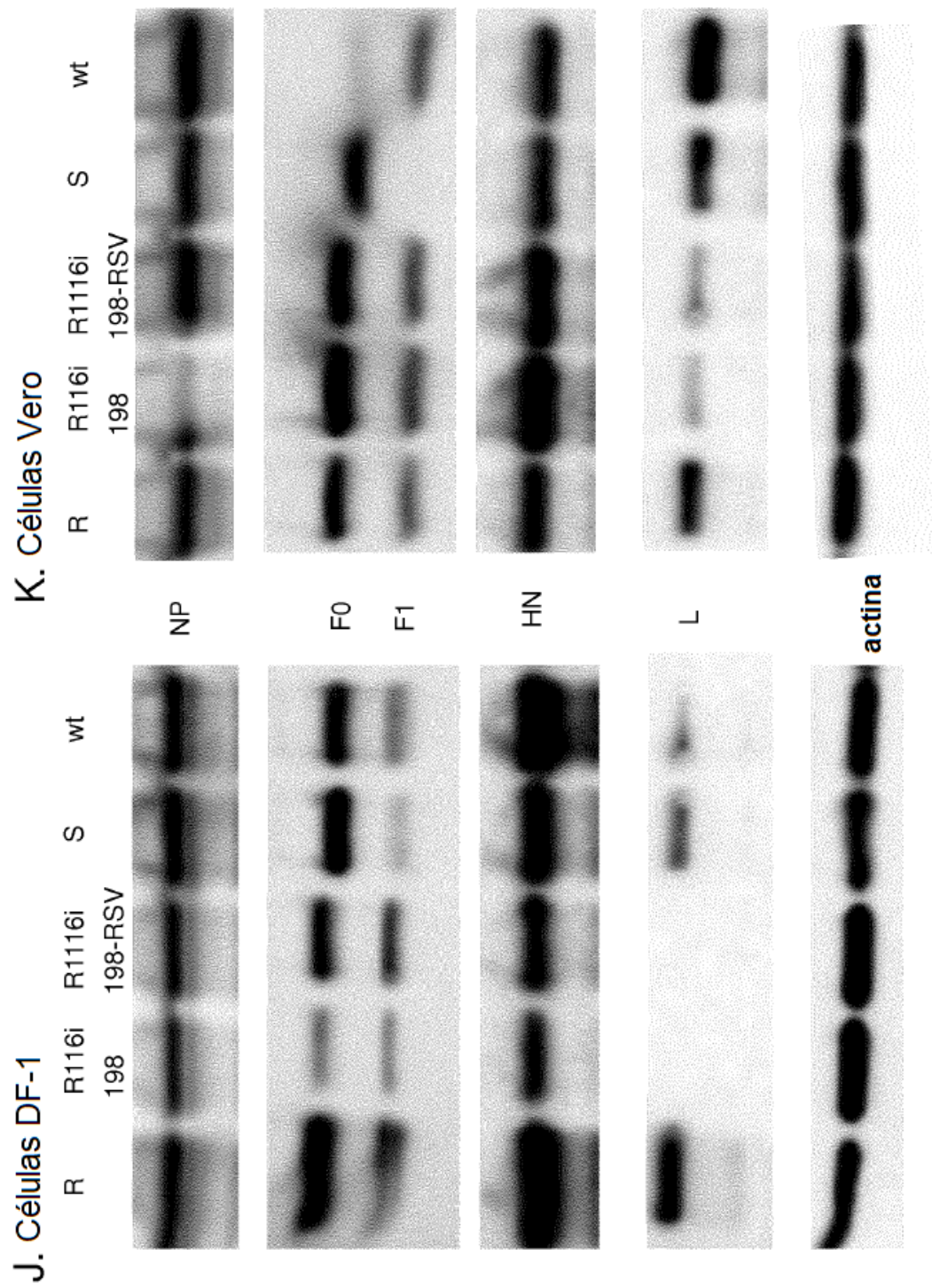


Figura 6L. La expresión de los genes anteriores está regulada en las células humanas infectadas con r73T-R116i

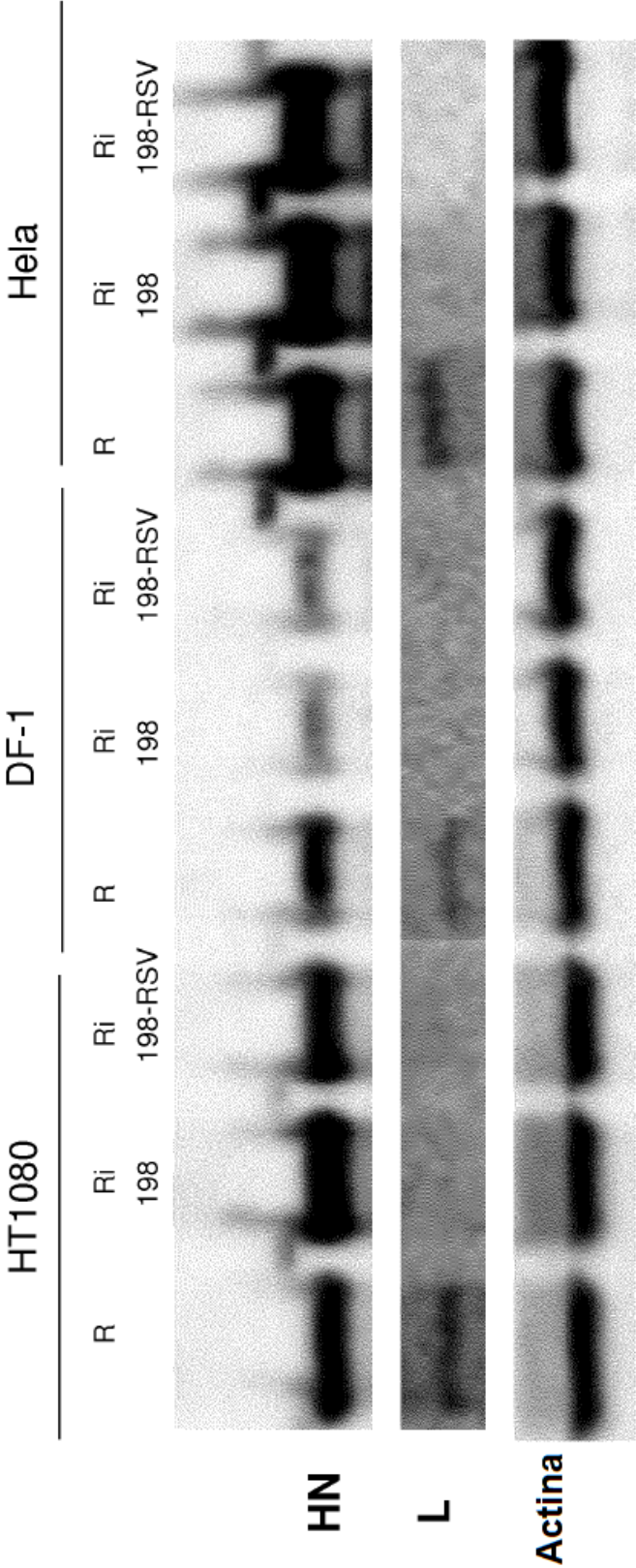


Figura 7. Cinética de crecimiento de los virus r73T en huevos de gallina embrionados

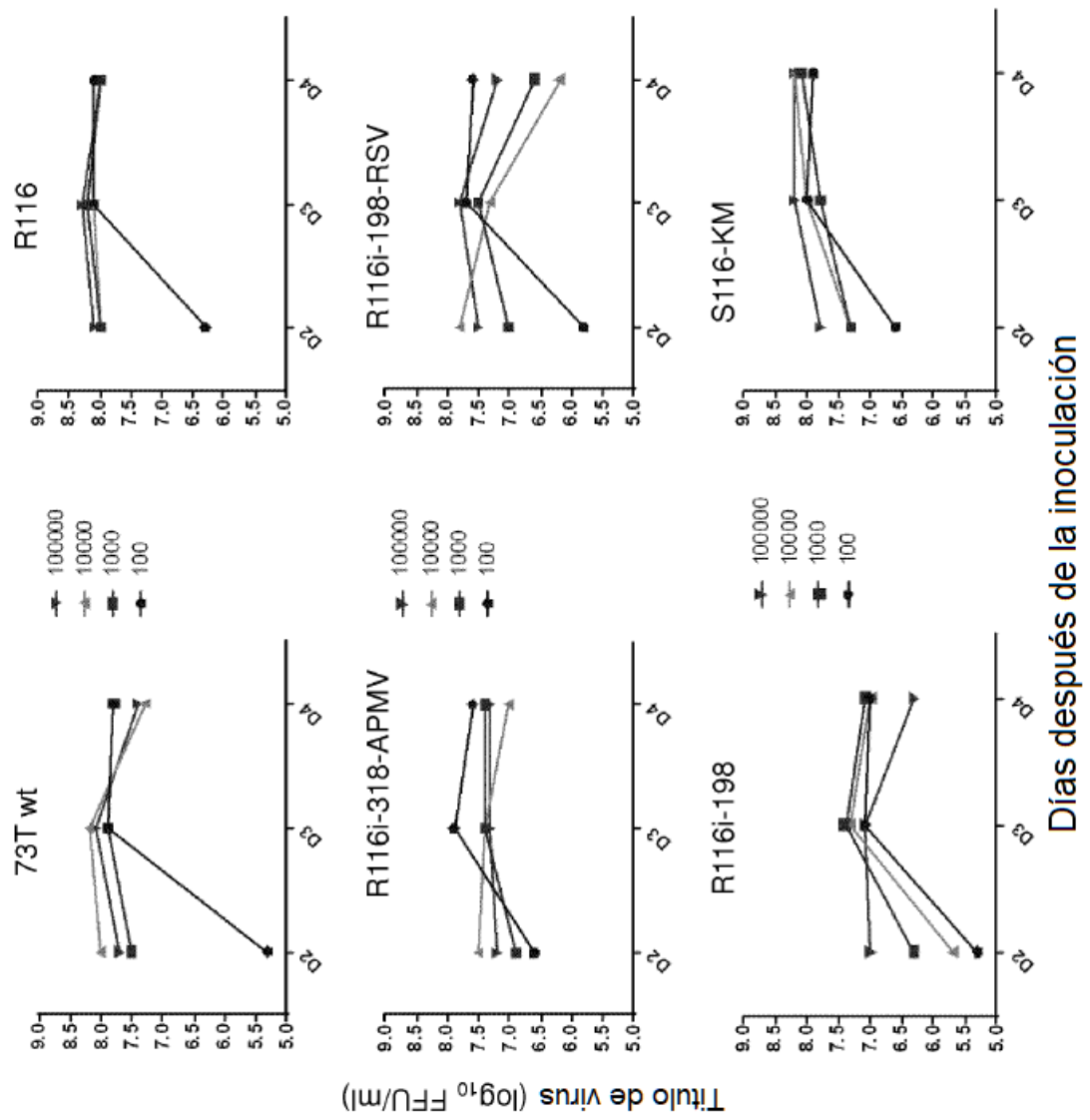


Figura 8. Cinética de crecimiento de virus r73T en células Vero

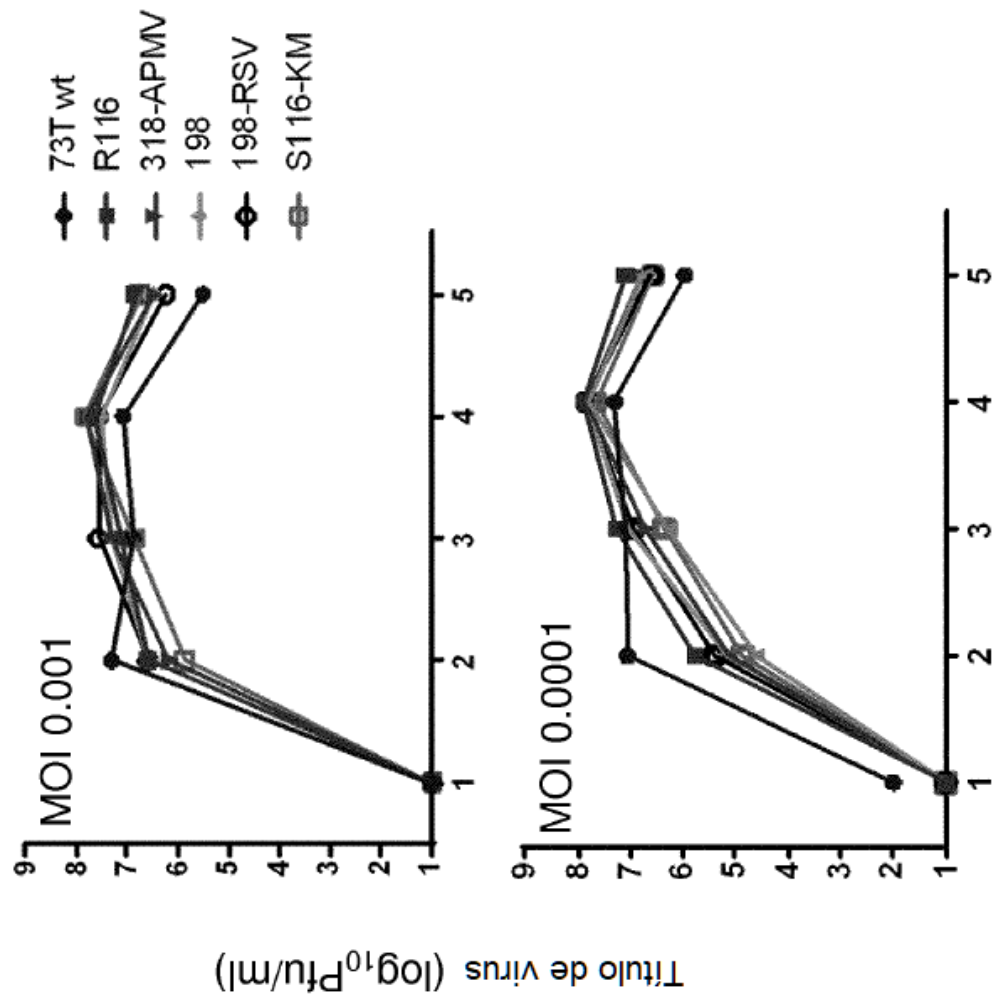


Figura 9. Replicación selectiva y citotoxicidad del virus r73T en células tumorales

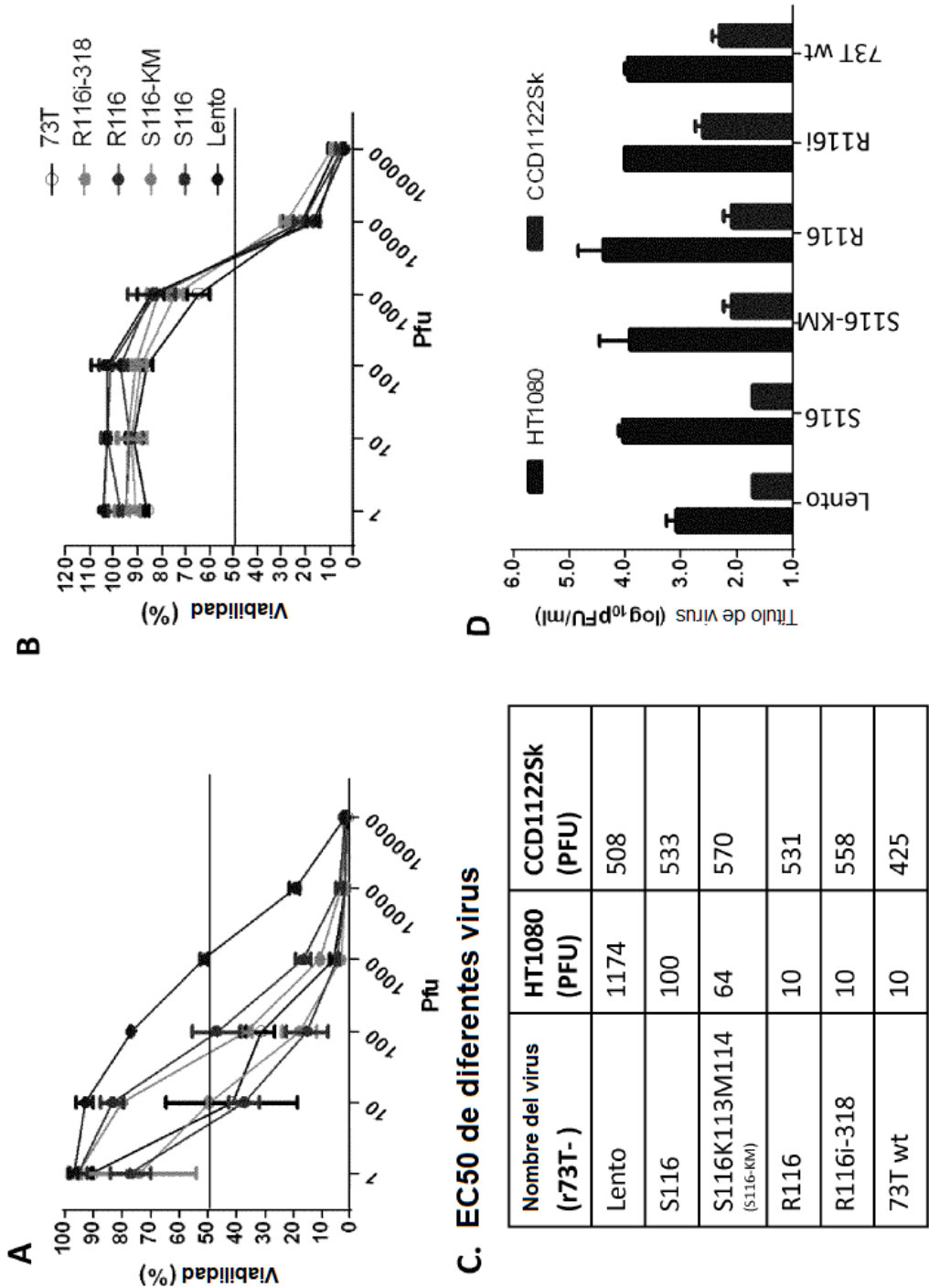


Figura 10. Los derivados de r73T son efectivos en la regresión del tumor en la administración local y sistémica

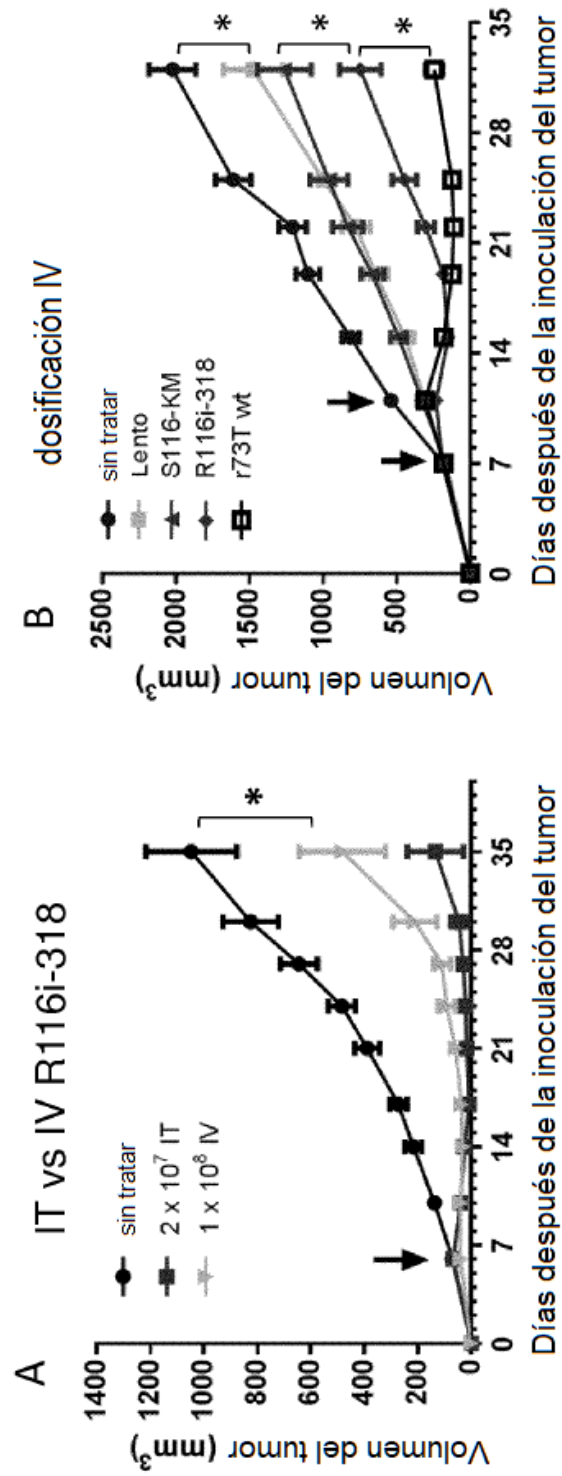


Figura 11A y B. Replicaciones selectivas de r73T-R116i-hGM-CSF en tumores después de una única administración IV

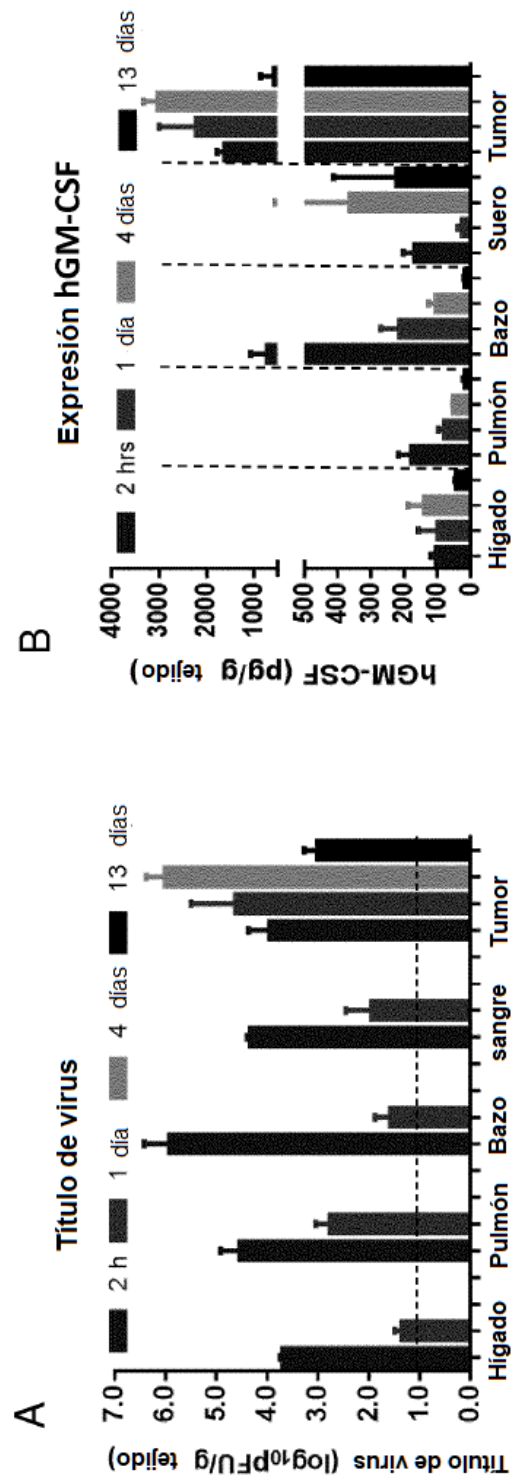


Figura 11C. Efecto del ratón GM-CSF en la inhibición del crecimiento tumoral por IV e IT en el modelo HT1089

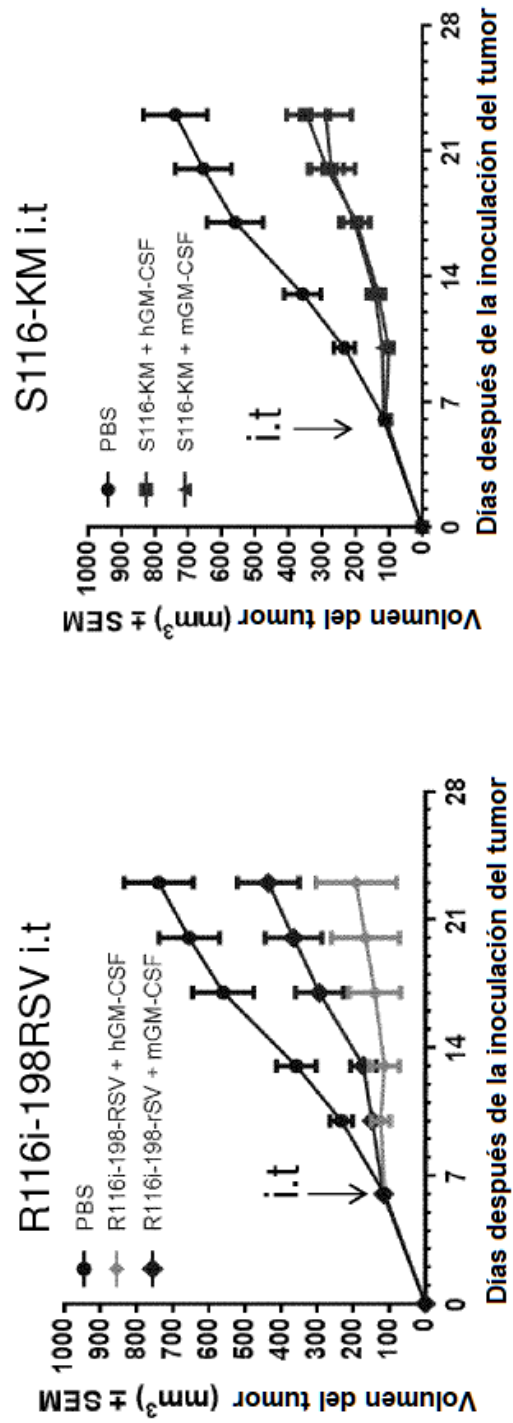


Figura 11D. Expresión de la depuración acelerada del virus GM-CSF del ratón en tumores

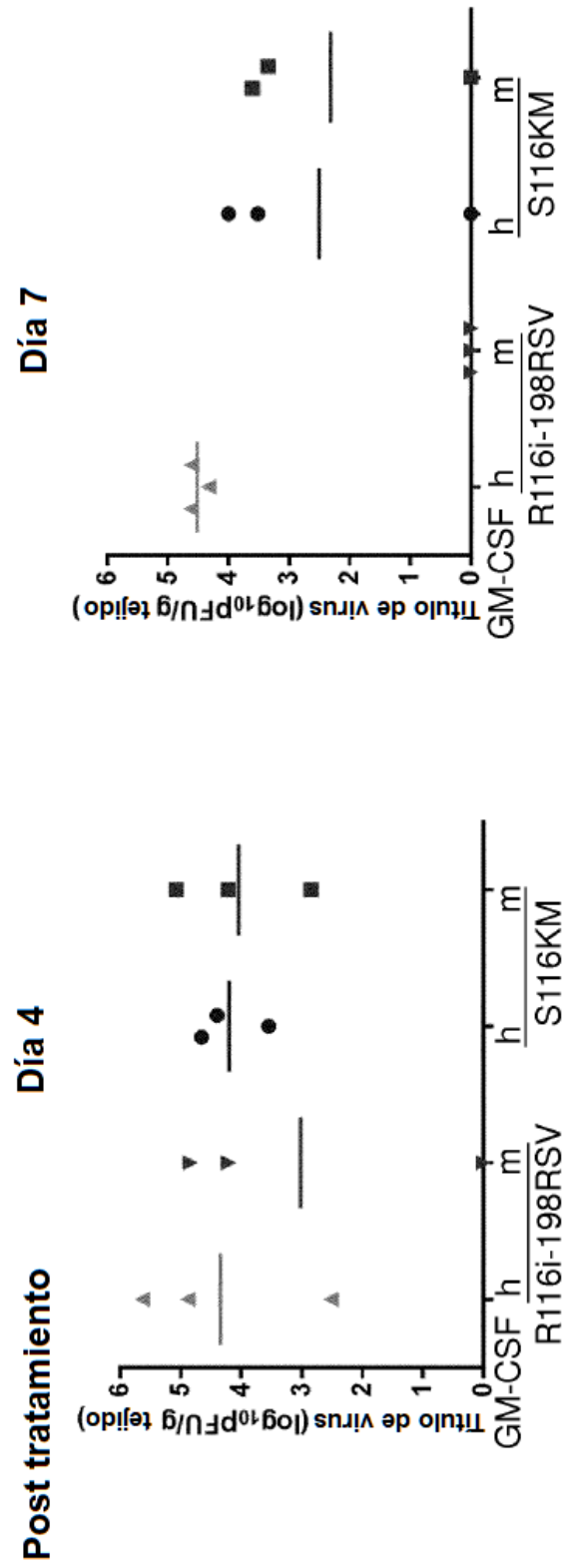


Figura 11E. La expresión del GM-CSF del ratón induce más infiltración de células inmunitarias en los tumores

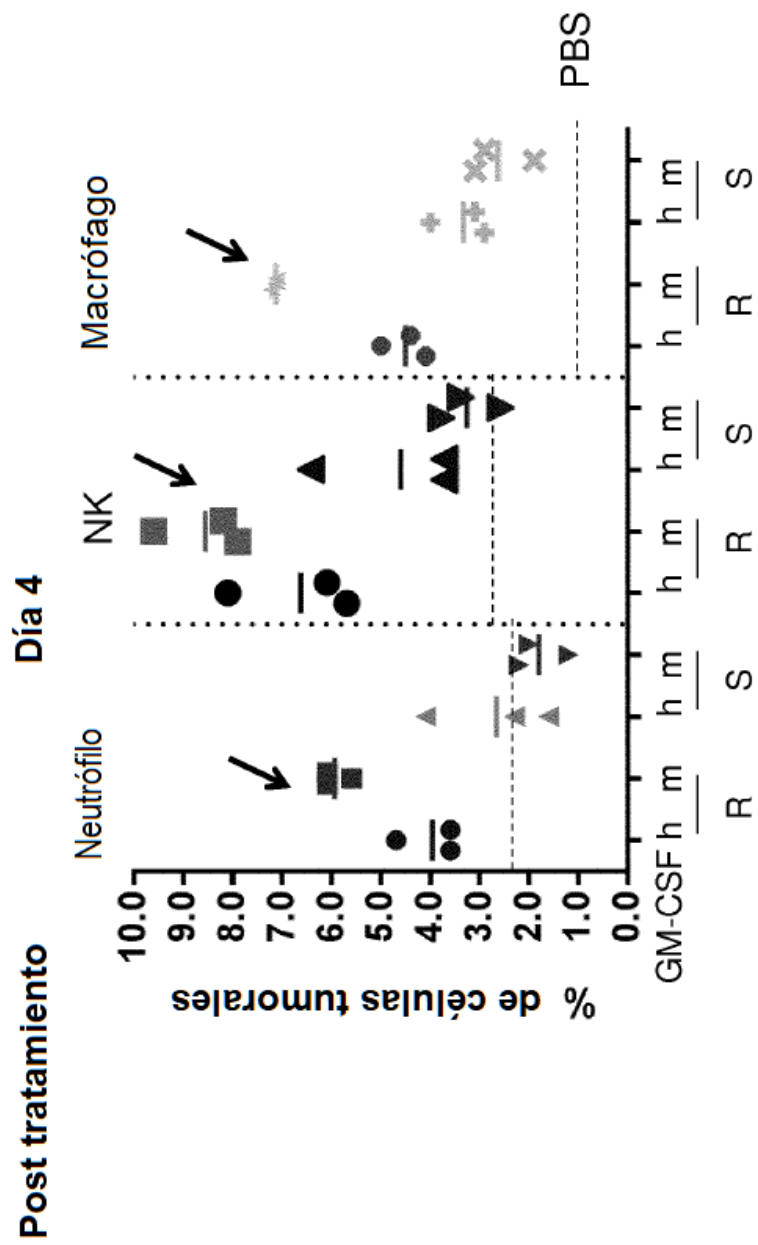


Figura 11F. El tratamiento con rNDV provoca la regulación de citoquinas y quimiocinas en tejidos tumorales

Citoquina/quimiocina en el día 4 después del tratamiento	Pliegue del cambio con respecto al grupo de PBS			
	R		S	
	hGM-CSF	mGM-CSF	hGM-CSF	mGM-CSF
mGM-CSF	1.3	106.7	2.4	9.9
MIG (CXCL9)	3.9	3.1	5.3	4.9
IFN- β	51	28	8	12
IFN- γ	6.9	2.7	6	2.4
IL-6	13.2	5.5	6.6	2.7
IL-10	5.7	2.8	0.5	2
MIP-1a (CCL3)	37.9	13.4	15.6	4.4
IL-12	2.9	2.5	2.4	2.3
MCP-1(CCL2)	8.4	9.5	8.9	5
TNF- α	5.2	4.7	3.6	3.7
IP-10 (CXCL10)	8.5	6.6	12.5	6.5
RANTES (CCL5)	24.5	21.2	35.9	10.1

Figura 11G. R116i-318 y 198 es comparable en inhibición del crecimiento tumoral

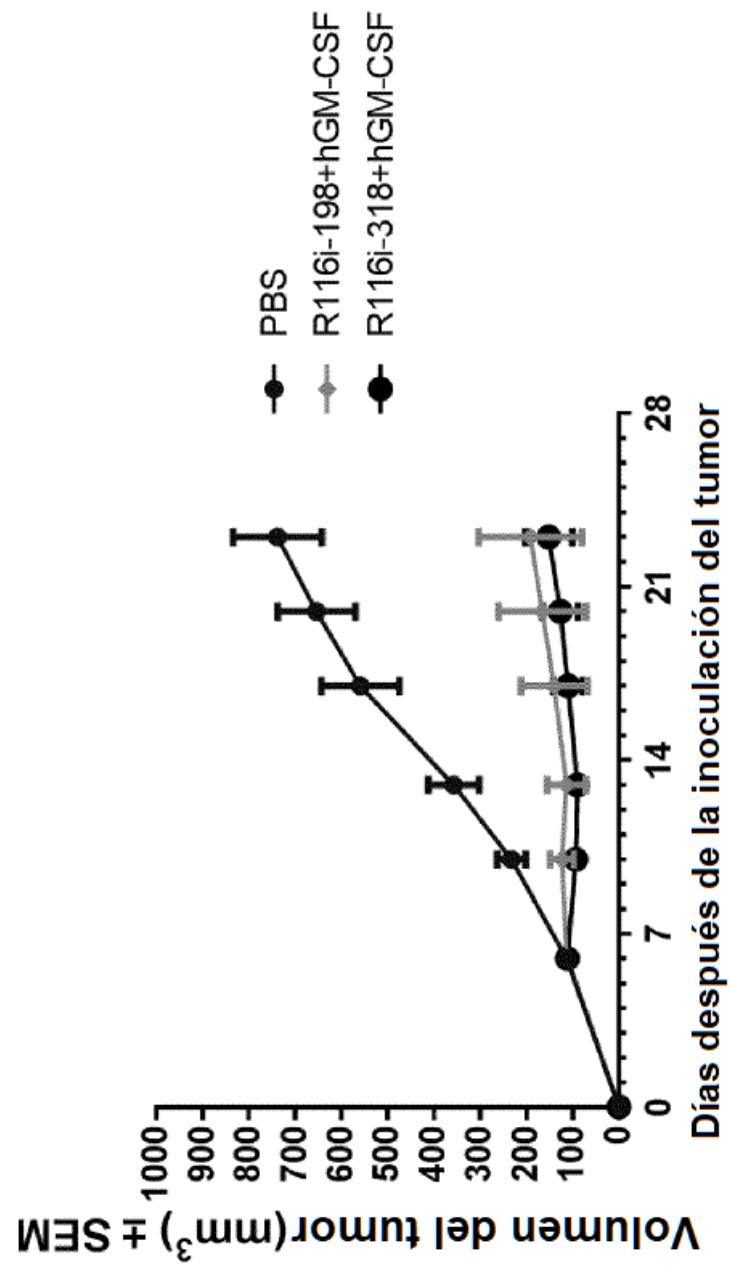


Figura 12A. Construcción de ADNc antígeno de 73T que contiene el gen F y/o HN quimérico

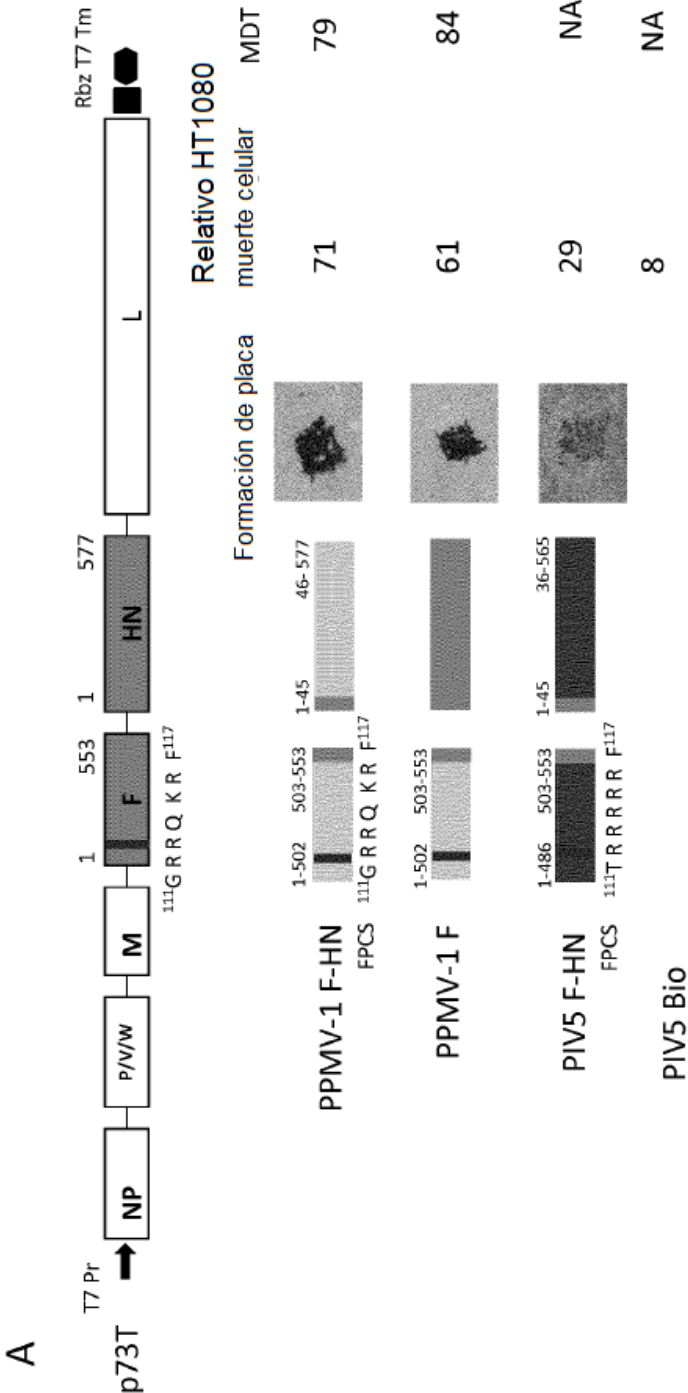


Figura 12B.

B

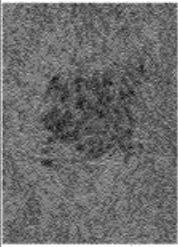
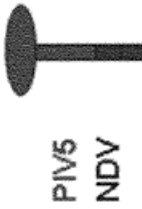
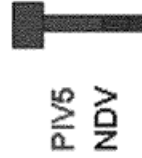
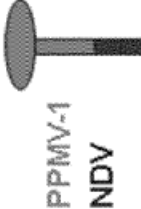
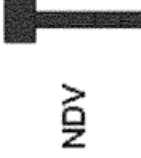
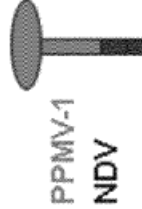
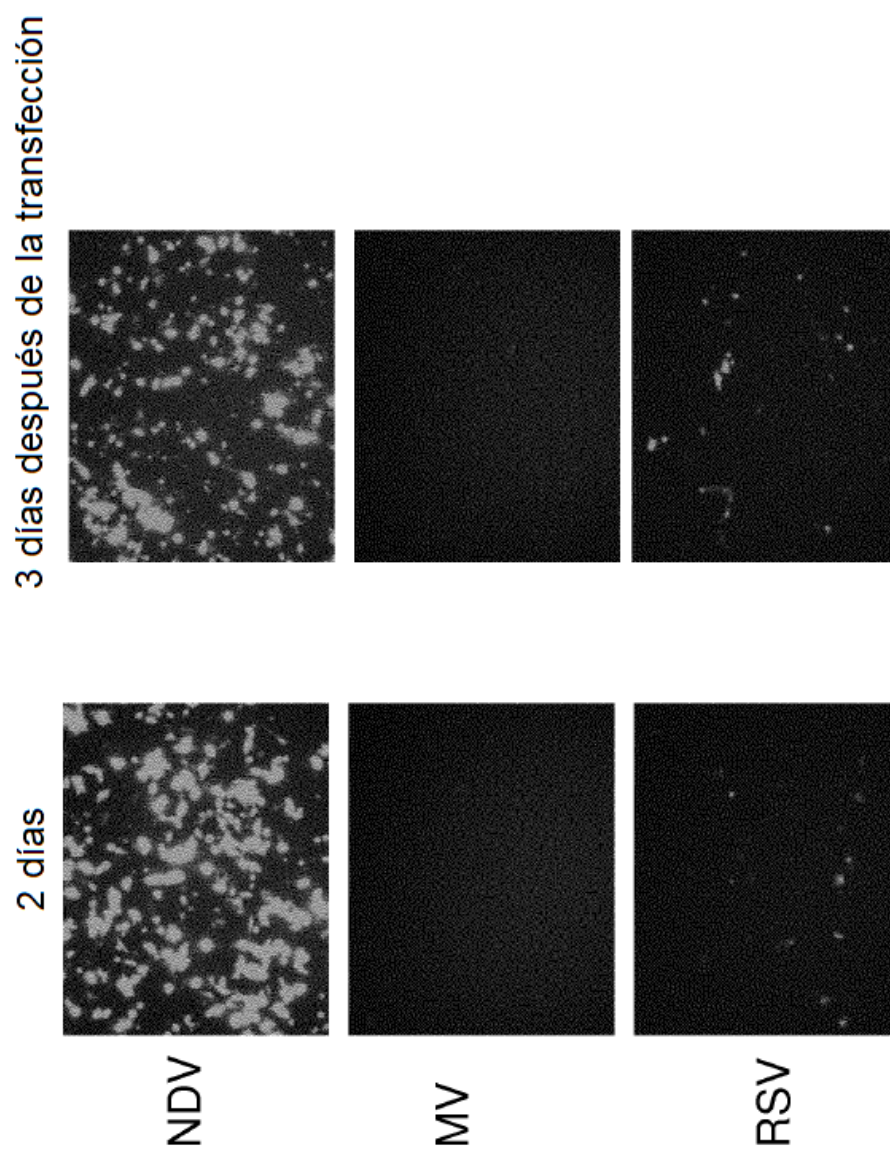
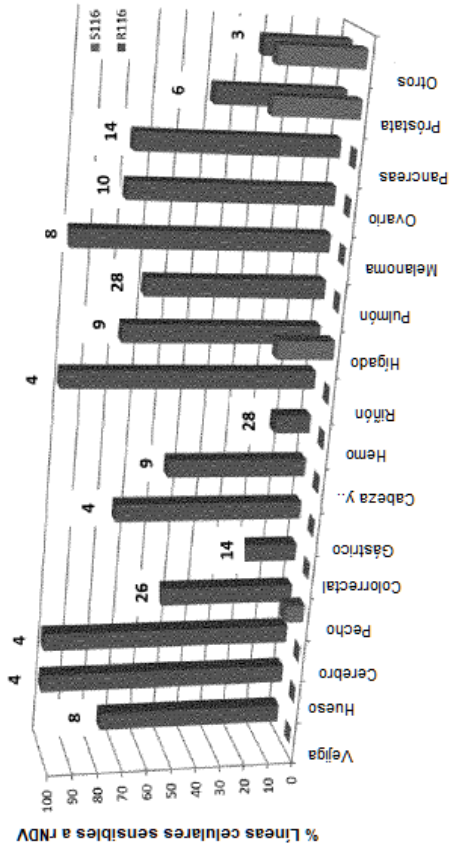
Vero w/o tripsina	Propagación en las células	Gen F	Gen HN	Crece en huevos (pfu/ml)	Crece en Vero w/o tripsina (pfu/ml)
	+++	 PIV5 NDV	 PIV5 NDV	No	6.0×10^6
	++++	 PPMV-1 NDV	 NDV	2.4×10^8	2.1×10^6
	+++	 PPMV-1 NDV	 PPMV-1 NDV	2.7×10^8	2.5×10^6

Figura 12C. Comparación de la función de ARN polimerasa compleja mini-genoma ensayo



Figuras 13A y B. Sensibilidad de la línea celular del cáncer para variantes de rNDV

A.



B.

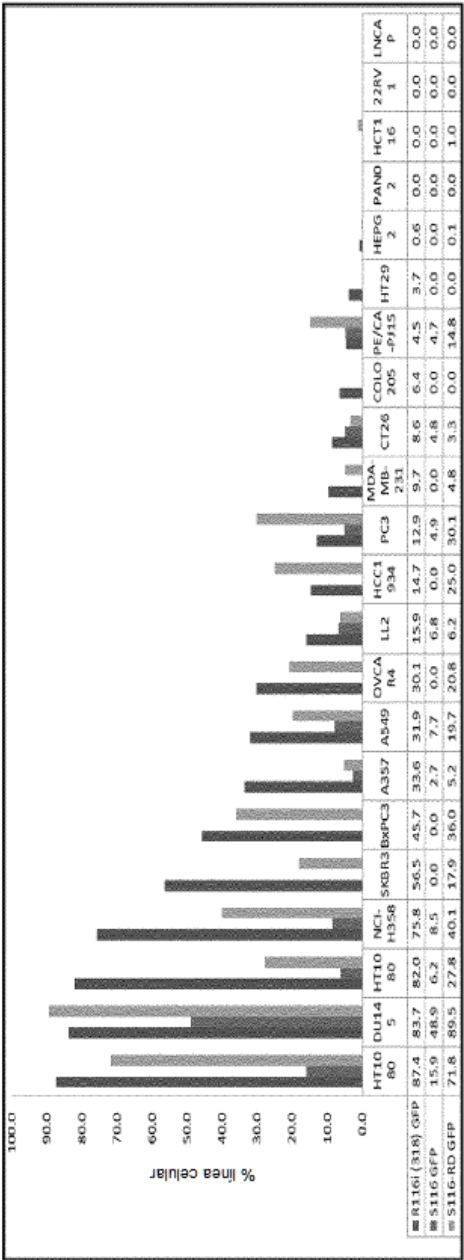
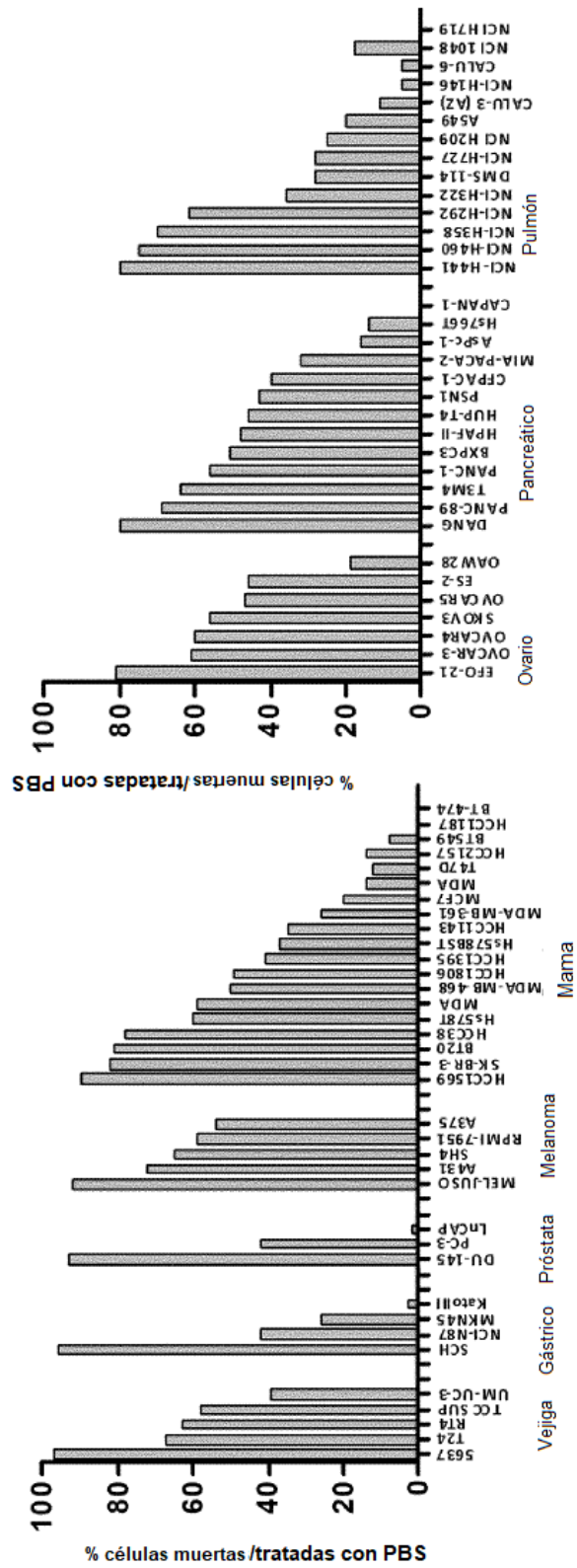


Figura 14. Permisividad de líneas celulares de cáncer para recNDV^{GM-CSF}



Leyenda de la figura: Efecto citopático de rNDV de las variantes R116i (que expresan GM-CSF). El % máximo de muerte se determinó 3 días después de la infección de líneas celulares tumorales en relación con el control no infectado.

Figura 15A y B. Inhibición del crecimiento tumoral en el modelo de melanoma de ratón singénico (B16F10AP3) por recNDV^{GM-CSF}

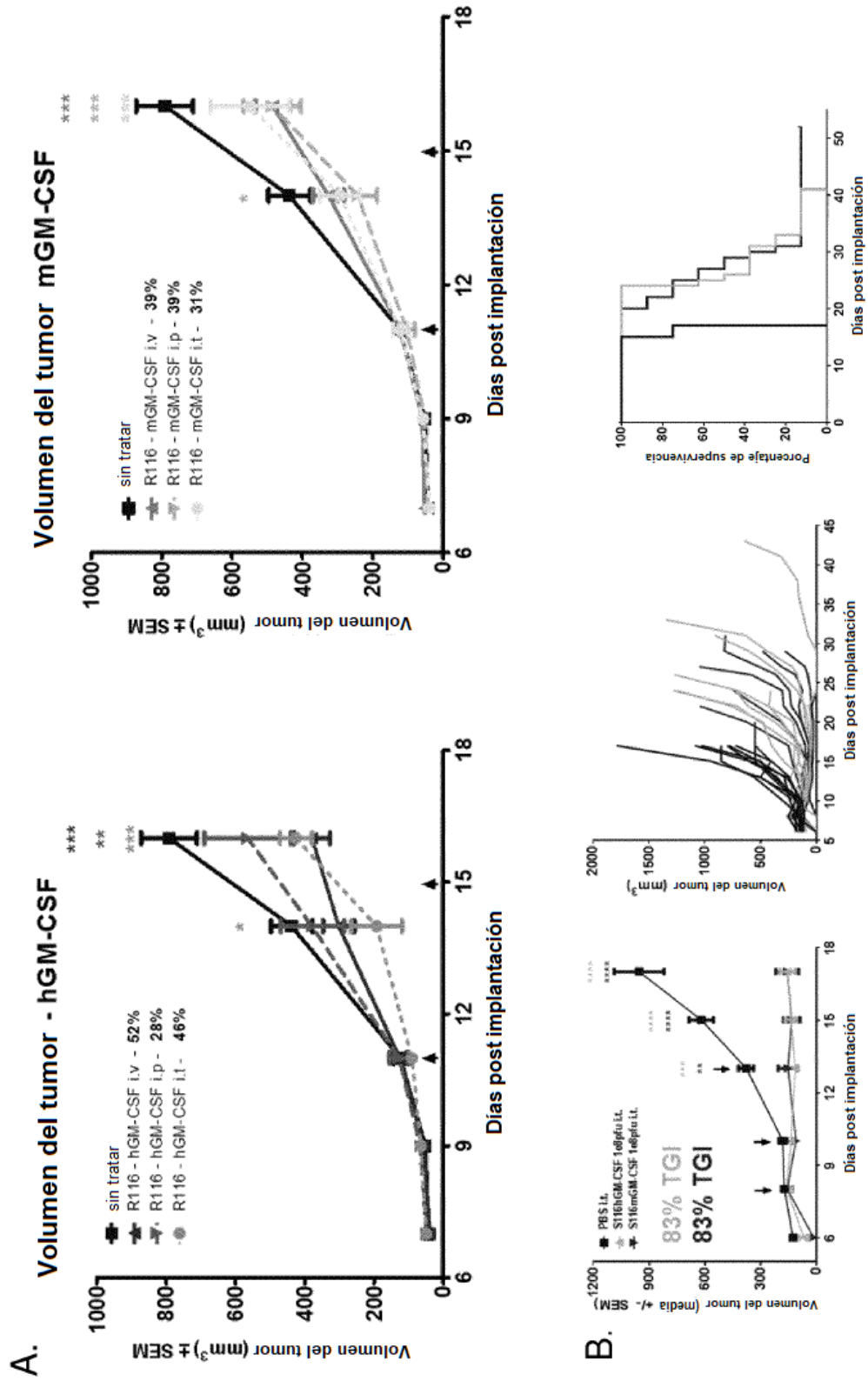
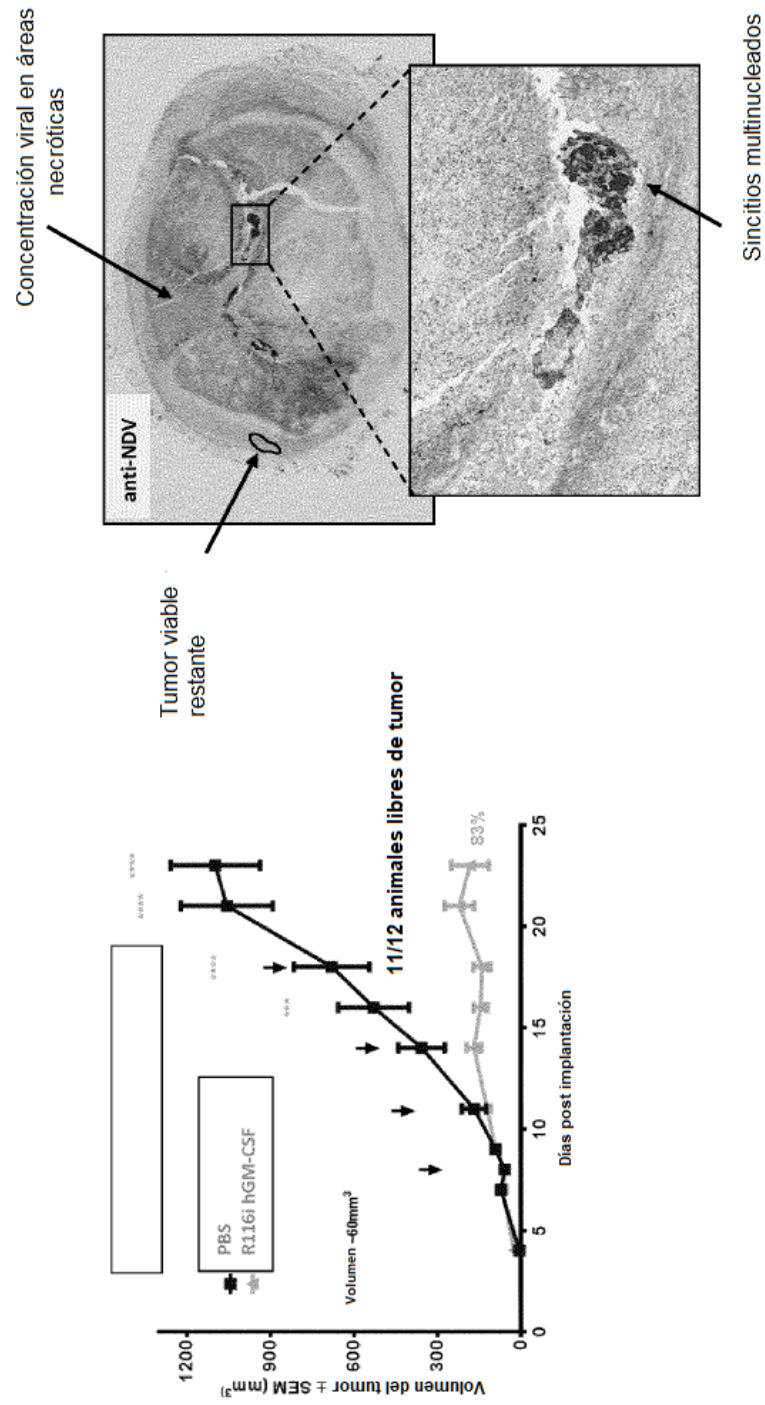


Figura 15C. El NDV tiene una potente actividad antitumoral en el modelo de tumor colorrectal CT26 de ratón inmunocompetente



Figuras 15D-F. La dosis múltiple de rNDV R116i causa la inhibición del crecimiento tumoral e impulsa el reclutamiento de células inmunitarias en el modelo de xenoinjerto de cáncer de ovario (OVCAR4)

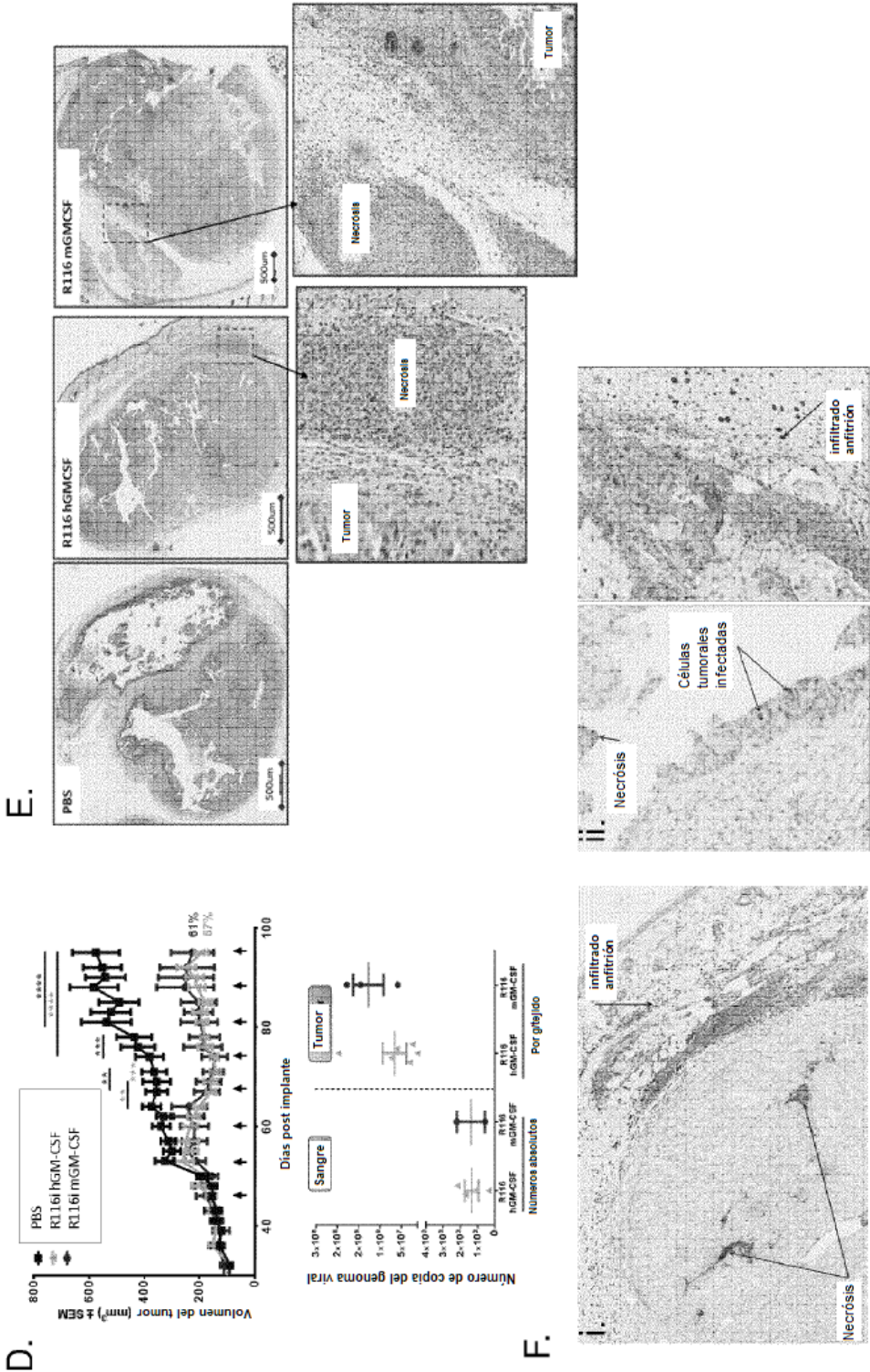
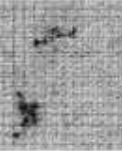


Figura 16. Resumen de las construcciones de NDV

FPCS (R-R-Q-K-R ¹¹⁶ /F)	Placas en Vero (sin tripsina)	Transgén	Muerte HT1080 (%) a 72h	ICPI	comentarios
Lento (G-R-Q-E-R/L)		hGM-CSF	20	0.0	Replicación depende de la tripsina
S116 (N-R-T-K-S/F)		ninguno	60	0.0	No necesita tripsina para intro replications
		hGM-CSF	40	0.075	Placas más grandes
R116 (N-R-T-K-R/F)		ninguno	80	tbd	Grandes placas, muerte celular más eficiente
		hGM-CSF	80	0.65	
S116K113M114 (N-K-M-K-S/F)		hGM-CSF	48	0.00	Grandes placas, muerte celular eficiente intermedia
R116-HN/L(318nt) (N-R-T-K-R/F)		hGM-CSF	80	0.05 - 0.27	virus de control 2 loci att escisión F y estiramiento intergénico
R116-HN/L(198nt) (N-R-T-K-R/F)		hGM-CSF	86	0.0375	

Todas las cepas tienen títulos de 8-9log₁₀ PFU/ml en huevos y ~ 7.0 log₁₀ PFU/ml en células Vero, sitio de escisión lento: 3log₁₀ PFU/ml en Vero.

Figura 17. La NVD producida a partir de células Hella es menos sensible a la inactivación mediada por C'

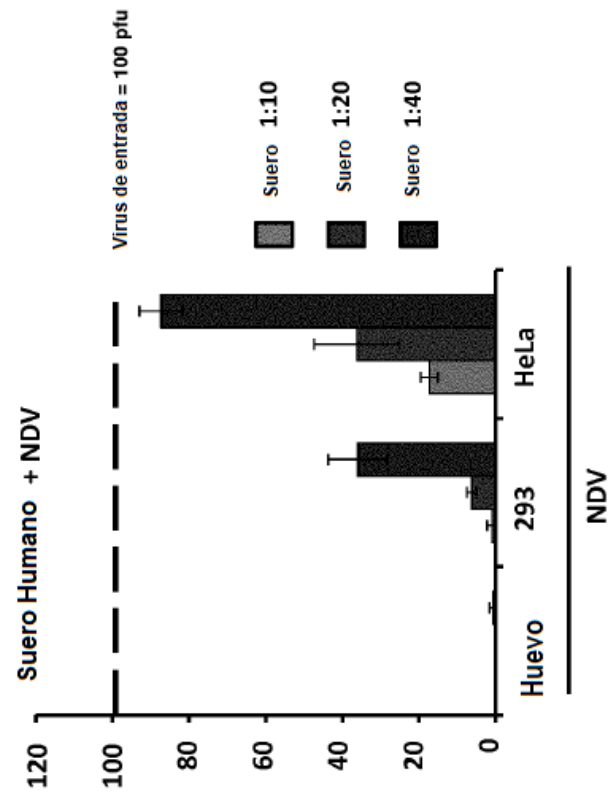


Figura 18. Las células HeLa-3S expresan niveles más altos de proteínas RCA que las células 293

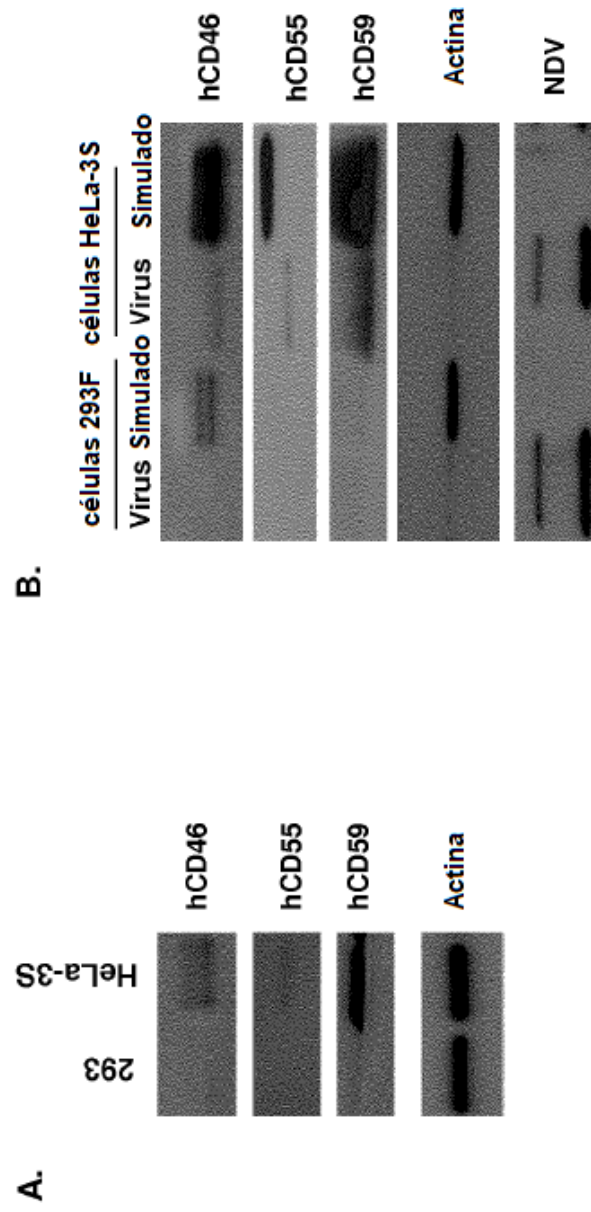


Figura 19. Expresión de proteína RCA por NDV

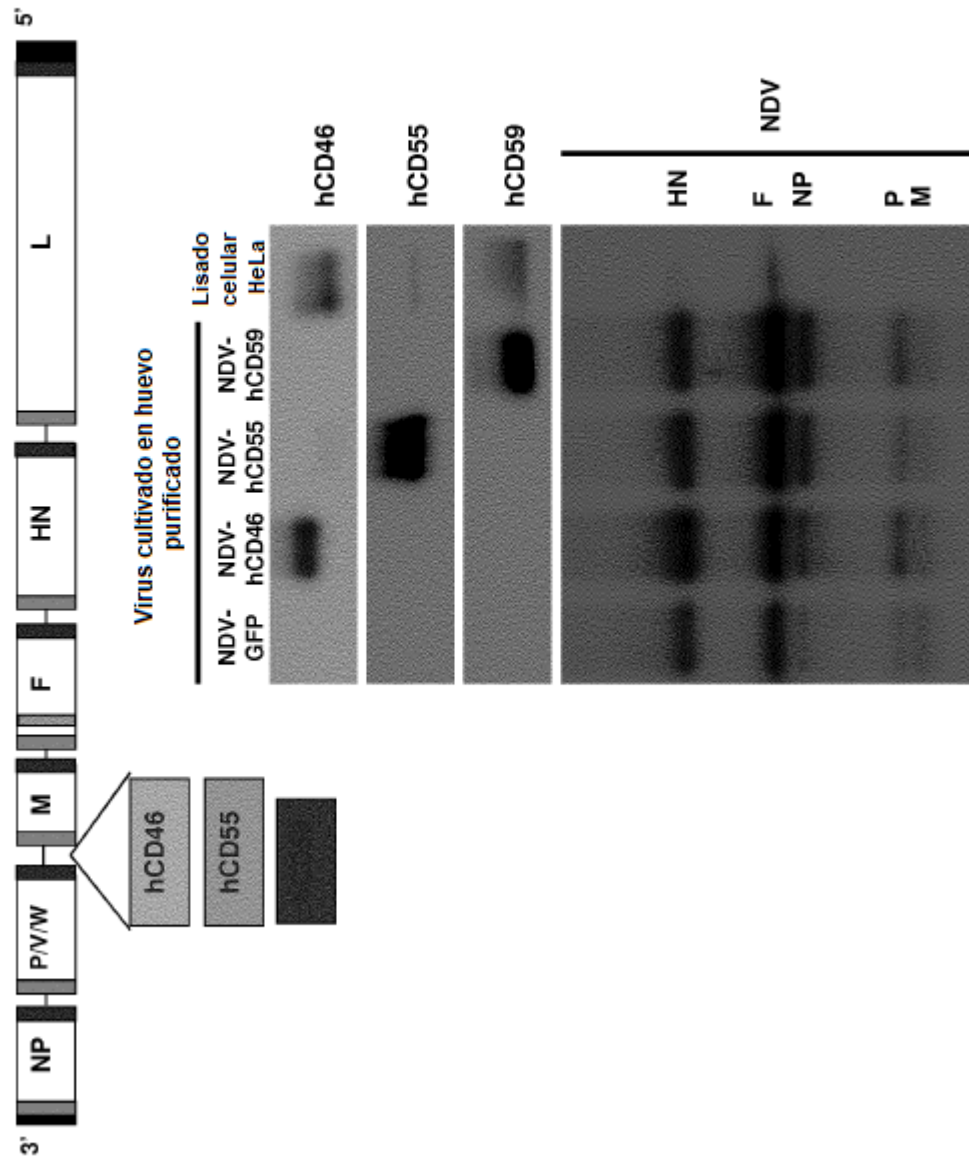


Figura 20. CD55 es una proteína RCA crítica para prevenir la inactivación de C' de NDV

