

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 745 599**

51 Int. Cl.:

**A61K 35/76** (2015.01)

**C12N 7/06** (2006.01)

**A61P 35/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.12.2013 PCT/CA2013/051009**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.06.2014 WO14094182**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.12.2013 E 13865170 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.05.2019 EP 2935569**

54 Título: **Partículas no replicantes derivadas de rhabdovirus, y sus usos**

30 Prioridad:

**21.12.2012 US 201261740856 P**

**14.06.2013 US 201361835310 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**02.03.2020**

73 Titular/es:

**CELVERUM INC. (100.0%)  
160 Elgin Street, Suite 2600  
Ottawa, ON K1P 1C3, CA**

72 Inventor/es:

**CONRAD, DAVID;  
BATENCHUK, CORY;  
LEBOEUF, FABRICE y  
BELL, JOHN CAMERON**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

ES 2 745 599 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**

Partículas no replicantes derivadas de rhabdovirus, y sus usos

**CAMPO**

5 La presente descripción se refiere, en general, a una partícula no replicante derivada de virus, y a su uso como un agente anticanceroso.

**ANTECEDENTES**

El siguiente análisis de antecedentes no implica o no significa la admisión de que algo de lo que se describe a continuación forme parte de la técnica anterior o de los conocimientos de los expertos en la técnica en cualquier país.

10 Los virus oncolíticos (OV) han sido diseñados a través de la atenuación de mutaciones o supresiones que permiten que el virus se replique exclusivamente en las células que están asociadas con una respuesta inmunitaria deteriorada o una actividad metabólica intensificada, que son dos características claves de la tumorigénesis. Ejemplos de agentes terapéuticos oncolíticos avanzados actuales incluyen el Virus del Herpes Simple OncoVEXGM-CSF y el virus de la vacuna (JX594). Hasta la fecha, el campo de los OV ha estado enfocado principalmente al desarrollo de plataformas en las que el virus vivo tiene una capacidad de replicación/propagación preferente dentro del entorno local del tumor.

15 Actualmente los rhabdovirus (RV), tales como el virus de la estomatitis vesicular (VSV) y el virus Maraba, están siendo estudiados como agentes terapéuticos anticancerosos. En los tumores, la propagación vírica es precipitada por actividades metabólicas descontroladas y programas antivirales disfuncionales. La susceptibilidad tumoral al tratamiento con RV es aún mayor debido a la predisposición hacia la apoptosis mediada por virus.

20 En el área de los Rhabdovirus, las plataformas oncolíticas desarrolladas hasta la fecha usan un virus competente para la replicación en las que el virus se propaga entre las células tumorales. De hecho, los informes que describen el uso de rhabdovirus vivos competentes para la replicación/expresión como una viroterapia directa para el cáncer normalmente comparan la eficacia con controles de virus que no se replican/expresan, en los que no se observa una eficacia medible. En estos informes, se concluye que la replicación y/o expresión del genoma del Rhabdovirus es un componente crítico y esencial de la citotoxicidad tumoral y la eficacia terapéutica.

25 La falta de efectos oncolíticos en estos estudios previos se refleja en los métodos usados para interrumpir la replicación y/o expresión del genoma del virus, así como en el número de partículas de virus usadas. De hecho, cuando se usan los métodos anteriores para interrumpir la replicación y/o expresión del genoma del virus, no se observa ninguna bioactividad del virus. Además, en estos estudios, se aplican como controles de virus no replicantes en la misma dosis que sus virus homólogos vivos, y no a dosis más altas para asegurar que cada célula encuentre una  
30 partícula no replicante.

Se desean enfoques alternativos, y preferentemente más efectivos, para tratar y curar la mayoría de las formas de cáncer. Por ejemplo, el desenlace para la mayoría de los pacientes adultos que sufren de leucemia linfoblástica aguda o leucemia mieloide aguda sigue siendo sombrío. Esto es en parte debido a la naturaleza significativamente inmunodeprimida de la enfermedad. Para la minoría de los pacientes, las respuestas inmunitarias antitumorales son  
35 parcialmente restauradas a través del trasplante alogénico de células madre tras el acondicionamiento mieloablativo. Esta terapia es potencialmente curativa; sin embargo, está asociada con frecuentes eventos adversos y una significativa mortalidad relacionada con el tratamiento. Para muchos pacientes con leucemia mieloide crónica (CML) en fase crónica, la terapia con inhibidores de tirosina cinasas (TKI) específicos ofrece un control excelente de la enfermedad. Sin embargo, cuando la leucemia evoluciona en crisis blásticas de leucemia aguda, existen opciones  
40 terapéuticas muy limitadas debido al desarrollo de resistencia a múltiples fármacos y a la rápida cinética de esta forma de leucemia recalcitrante.

Por lo tanto, existe la necesidad de agentes anticancerosos alternativos, en particular para pacientes inmunodeprimidos. El agente anticanceroso, en virtud de su diseño y sus componentes, sería preferentemente capaz de abordar las necesidades clínicas actualmente no satisfechas y/o superar al menos algunos de los problemas  
45 anteriormente discutidos.

**SUMARIO**

La presente invención se define en las reivindicaciones.

50 Si bien para tratar una variedad de distintos tipos de tumores se han empleado estrategias relacionadas con OV vivos, su aplicación en neoplasias hematopoyéticas, en particular, se vuelve complicada por varios factores. La producción limitada de viriones y la reducida propagación entre las células leucémicas requiere la aplicación de terapia viral de altas dosis para superar estas ineficiencias. Sin embargo, la propagación incontrolada del virus vivo y los efectos inespecíficos sobre el tejido normal comprometen la seguridad de este enfoque, especialmente en pacientes inmunodeprimidos.

- Los problemas asociados con el uso de virus vivos incluyen: 1) la seguridad, que depende de la capacidad del Rhabdovirus vivo para propagarse solamente en el tejido tumoral enfermo, dejando el tejido sano solo; 2) dosis bajas de administración, ya que la introducción en un paciente de virus vivos con capacidad de propagarse hace necesaria la administración de dosis relativamente bajas de estos agentes virales vivos para garantizar la seguridad; 3) la desviación de la respuesta inmunitaria del tumor hacia el virus vivo, lo que disminuye efectivamente la eficiencia de las respuestas inmunitarias antitumorales; y 4) los virus vivos diseñados genéticamente para presentar proclividad hacia tumores a menudo tienen una capacidad productiva disminuida en comparación con el virus de tipo silvestre, y, en consecuencia, la eficiencia en la formulación y los costes de producción son sub-óptimos desde la perspectiva de la fabricación.
- 5 Se ha mostrado previamente que la inyección intra-tumoral con VSV diseñado de manera que presenta una delección del gen de la glicoproteína (VSV $\Delta$ G) que impide el ensamblaje final del virión y su propagación, provoca respuestas inmunitarias antitumorales. Sin embargo, el tratamiento con VSV $\Delta$ G no puede proporcionar una reducción significativa de la masa tumoral diseminada, debido, en parte, a la incapacidad para fabricar y suministrar las dosis terapéuticamente efectivas.
- 10 Los autores son conscientes de no hay informes que detallen el uso de una plataforma derivada de Rhabdovirus que no sea capaz de replicarse ni de expresarse como un agente terapéutico anticanceroso. Las partículas no replicantes derivadas de virus (NVRP) de la presente descripción, y las partículas no replicantes derivadas de rhabdovirus (NRRP), en particular, son partículas de virus de tipo silvestre modificadas de tal manera que carecen de la capacidad de propagarse entre las células. Una vez modificada, la partícula no replicante derivada de virus (NVRP) no puede mantener la replicación del virión.
- 15 Las NVRPs son únicas por el hecho de que conservan el tropismo, tal como el tropismo citolítico, frente a células inmortalizadas. Esto significa que las NVRPs inducirán la muerte celular preferentemente en células inmortalizadas tales como células tumorales o cancerosas y células inmortalizadas transformadas. Ejemplos específicos de NVRPs tienen propiedades inmunoestimulantes innatas y/o adaptativas contra células inmortalizadas.
- 20 En un aspecto, la presente descripción describe una partícula no replicante derivada de rhabdovirus que carece de la capacidad para propagarse entre las células mientras que tiene tropismo frente a células inmortalizadas. El tropismo puede ser un tropismo citolítico. La partícula no replicante derivada de rhabdovirus puede tener propiedades inmunoestimulantes innatas y/o adaptativas contra células inmortalizadas.
- 25 En todavía otro aspecto, la presente descripción proporciona un uso de una partícula no replicante derivada de rhabdovirus para tratar una población de células hiperproliferativas o células cancerosas. La población de células hiperproliferativas es preferentemente de naturaleza hematopoyética, y preferentemente son células leucémicas. La población de células hiperproliferativas pueden ser células de tumores sólidos.
- 30 En todavía otro aspecto, la presente descripción describe tratar un paciente que tiene una población de células hiperproliferativas o células cancerosas, que incluye administrar al paciente partículas no replicantes derivadas de rhabdovirus. La población de células hiperproliferativas puede ser preferentemente de naturaleza hematopoyética, preferentemente células leucémicas. La población de células hiperproliferativas pueden ser células de tumores sólidos.
- 35 Otros aspectos y características de la presente descripción serán evidentes para los expertos normales en la técnica tras revisar la siguiente descripción de realizaciones específicas en conjunto con las figuras adjuntas.
- 40 **BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS**
- Las realizaciones de la presente descripción se describirán ahora, sólo a modo de ejemplo, con referencia a las figuras adjuntas.
- 45 La Fig. 1A es una gráfica que muestra el impacto de la dosis UV sobre la citotoxicidad mediada por NRRP en células Vero y HDFN. No se detectó señal de GFP después de la generación de NRRP inducida por UV. La viabilidad se cuantificó usando el ensayo con resazurina 72 h después de la infección. La MOI de este experimento se fijó en 100 partículas por célula. Las barras de error representan la desviación estándar entre los experimentos por triplicado.
- 50 La Fig. 1B es una gráfica que muestra el impacto de la MOI sobre la citotoxicidad inducida por NRRPs en células Vero y HDFN como se ilustra por la viabilidad como una función de la MOI. La viabilidad se cuantificó usando el ensayo con resazurina 72 h después de la infección. Las barras de error representan la desviación estándar entre los experimentos por triplicado.
- 55 La Fig. 2A es un conjunto de imágenes que muestra la citotoxicidad de las NRRPs sobre células Vero inmortalizadas a través de imágenes de microscopía de fluorescencia y de campo claro de células Vero tratadas con PBS, VSV-GFP vivo o NRRPs, tomadas 24 y 72 horas después de la infección o después del tratamiento. La multiplicidad de infección (MOI) usada en estos experimentos se fijó en 100 partículas por célula.

- La Fig. 2B es una gráfica que muestra la citotoxicidad de las NRRPs a través de la cuantificación de la viabilidad celular con resazurina 72 h después del tratamiento. Las barras de error representan la desviación estándar entre los experimentos por triplicado.
- 5 La Fig. 2C es una gráfica que muestra los títulos virales producidos. NAN significa “no como un número”, ya que no se detectaron viriones.
- La Fig. 3A es un conjunto de imágenes de microscopía fluorescente (4X) de células leucémicas (L1210) y células Vero tratadas con PBS, virus Maraba vivo y NRRPs derivadas del virus Maraba. Las imágenes fueron tomadas 24 h después del tratamiento.
- La Fig. 3B es una gráfica que muestra los títulos virales obtenidos de células tumorales.
- 10 La Fig. 3C es una gráfica que muestra la cuantificación con resazurina de la viabilidad celular de células leucémicas L1210 y células normales HDF, 72 h después de la infección.
- La Fig. 4A es un conjunto de imágenes que muestran imágenes fluorescentes de células L1210 y Vero tratadas con PBS, VSV-GFP vivo, o NRRPs.
- 15 La Fig. 4B es una gráfica que muestra los títulos virales generados por células de leucemia aguda L1210 y células inmortalizadas Vero.
- La Fig. 5 es una imagen de una transferencia Western de la expresión del genoma de NRRP comparada con la expresión del genoma de un virus expuesto a una dosis UV de 20.000 mJ/cm<sup>2</sup>, en la que se observó pérdida de citotoxicidad, y un virus vivo como un control. La referencia a 1x o 2x da cuenta de la cantidad de proteína cargada en el gel. Las proteínas se extrajeron 15 h después de la infección.
- 20 La Fig. 6A es un conjunto de imágenes fluorescentes y de campo claro de células Vero tratadas con NRRPs generadas químicamente o generadas con busulfán.
- La Fig. 6B es una imagen de microscopía de campo claro de células Vero tratadas con busulfán solo, a la misma dosis usada para generar NRRPs en la Fig. 6A, durante 15 horas.
- La Fig. 6C es un conjunto de imágenes fluorescentes y de campo claro de células Vero tratadas con VSV-GFP vivo.
- 25 La Fig. 7A es un conjunto de imágenes de campo claro y de fluorescencia de células Vero tratadas con NRRPs, generadas tomando 1E10 de VSV congelado de tipo silvestre e irradiando esta preparación con 15 kGy de cobalto-60.
- La Fig. 7B es un conjunto de imágenes de campo claro y de fluorescencia de células Vero tratadas con VSV-GFP vivo de tipo silvestre.
- 30 La Fig. 7C es un conjunto de imágenes de campo claro y de fluorescencia de células Vero en PBS.
- La Fig. 8A es un conjunto de imágenes de campo claro de células L1210 y HDF tratadas con PBS o NRRPs a una MOI de 100.
- La Fig. 8B es una gráfica que muestra la cuantificación de viabilidad con resazurina en líneas celulares de leucemia y normales. Las líneas celulares murinas se indican mediante un \*.
- 35 La Fig. 8C es un conjunto de imágenes de microscopía de fluorescencia de tratamientos con PBS, VSV-GFP vivo, o NRRP en líneas celulares de leucemia aguda murina de células T Jurkat humanas, leucemia linfoblástica murina de células B A20, leucemia linfoblástica de células T A301, y leucemia promielocítica aguda HL60, y líneas celulares normales GM38 y HDF.
- La Fig. 9 es un conjunto de gráficas que muestra el análisis de citometría de flujo de tinción con Anexina V-APC y 7-AAD de células L1210 tratadas con PBS o NRRPs.
- 40 La Fig. 10 es una gráfica que ilustra la viabilidad celular después de un ensayo de cuantificación con resazurina para la línea celular de leucemia aguda L1210 tomada 72 horas después del tratamiento con NRRPs generadas por UV, y el efecto combinatorio de las NRRPs generadas por UV con bendamustina (300 µM).
- La Fig. 11 es una gráfica que ilustra la viabilidad celular después de un ensayo de cuantificación con resazurina para la línea celular de leucemia aguda L1210 tomada 72 horas después del tratamiento con NRRPs generadas por UV, y el efecto combinatorio de las NRRPs generadas por UV con dexametasona (45 µM).
- 45 La Fig. 12 es una gráfica que ilustra la viabilidad celular después de un ensayo de cuantificación con resazurina para la línea celular de leucemia aguda L1210 tomada 72 horas después del tratamiento con NRRPs generadas por UV, y el efecto combinatorio de las NRRP generadas por UV con doxorubicina (0,025 µM).

- La Fig. 13 es una gráfica que ilustra la viabilidad celular después de un ensayo de cuantificación con resazurina para la línea celular de leucemia aguda L1210 tomada 72 horas después del tratamiento con NRRPs generadas por UV, y el efecto combinatorio de las NRRPs generadas por UV con vincristina (0,0125  $\mu$ M).
- 5 La Fig. 14 es una gráfica que ilustra la viabilidad celular después de un ensayo de cuantificación con resazurina para la línea celular K562 de leucemia mieloide Ph positiva tomada 15 horas después del tratamiento con NRRPs generadas por UV, y el efecto combinatorio de las NRRPs generadas por UV con idarrubicina (0,05  $\mu$ M).
- La Fig. 15A es una ilustración de un modelo fenomenológico desarrollado por Le Boeuf et al. para simular la citotoxicidad de las NRRPs en células normales y en tumores con defectos en las rutas de señalización antivirales. Para describir la cinética de las NRRPs, se modificó el modelo original eliminando la replicación del virus (X). Las líneas discontinuas describen los defectos de IFN asociados con células tumorales.
- 10 La Fig. 15B es una gráfica que muestra la relación simulada entre los defectos en la ruta de señalización antiviral y la viabilidad después del tratamiento con NRRPs a las 72 horas.
- La Fig. 15C es una gráfica que muestra la relación in vitro entre la MOI y la viabilidad 72 h después de la infección con NRRPs en células HDF normales en presencia o ausencia de IFN.
- 15 La Fig. 15D es una gráfica que muestra la relación in vitro entre la MOI y la viabilidad 72h después del tratamiento con NRRPs en células L1210 leucémicas en presencia o ausencia de IFN.
- La Fig. 16A es un conjunto de imágenes de microscopía de campo claro de dos muestras de pacientes con crisis blástica de leucemia mieloide crónica tratadas con PBS o NRRPs.
- 20 La Fig. 16B es un conjunto de imágenes de microscopía fluorescente (4X) de leucemia aguda (crisis blástica de CML) procedente de muestras de sangre periférica de pacientes humanos. Las muestras enriquecidas en leucemia se obtuvieron de sangre periférica tratada con PBS, VSV-GFP vivo, o NRRPs codificadas para GFP. Las imágenes se obtuvieron 24 h después de la infección a una MOI = 100.
- La Fig. 16C es un diagrama de citometría de flujo que complementa los datos presentados en las Fig. 16A y 16C de tinción con Anexina-V y CD33 en dos muestras de pacientes en crisis blástica de CML tratadas con PBS o NRRPs (MOI = 100) 48h después del tratamiento. La población blástica CD33+ fue enriquecida mediante cultivo a largo plazo de las células.
- 25 La Fig. 16D son gráficos que muestran análisis de citometría de flujo de la tinción con CD33 en las dos muestras de pacientes con crisis blástica de CML tratadas con PBS o NRRPs.
- La Fig. 17A es un conjunto de imágenes de microscopía de campo claro de una muestra de médula ósea sana tratada con PBS o NRRPs durante 18 horas.
- 30 La Fig. 17B es una gráfica que muestra la cuantificación de la tinción con Anexina-V en la muestra de médula ósea sana tratada con PBS o NRRPs durante 65 horas.
- La Fig. 18A es una gráfica que muestra la curva de supervivencia en un modelo murino de tratamiento de crisis blástica. Después de la exposición a L1210 en ratones en el día 1, los ratones recibieron tres dosis diarias de NRRPs o PBS.
- 35 La Fig. 18B es un conjunto de gráficas que muestran la cuantificación basada en Luminex de citocinas inducidas por NRRPs en ratones portadores de L1210 durante crisis blásticas agudas. Todas las citocinas identificadas fueron inducidas más de 2 veces en ratones tratados con NRRP, y son estadísticamente significativas (prueba de la t no pareada  $pV < 0,05$ ).  $pV$  se ha corregido para tener en cuenta el ensayo de múltiples hipótesis (Método de Benjamini y Hochberg).
- 40 La Fig. 19 es una gráfica que muestra la curva de supervivencia en un modelo murino inmunocompetente de apoptosis inmunogénica. Antes de la exposición a L1210 en el día 1, los ratones recibieron tres dosis semanales de células L1210 irradiadas con radiación  $\gamma$ , incubadas o no incubadas con NRRPs.
- La Fig. 20 es un conjunto de imágenes de microscopía de campo claro de líneas celulares de mieloma MPC-11 y RPMI-8226 tomadas 15 h después del tratamiento con PBS o NRRPs. Las NRRPs fueron administradas a una MOI = 250, una dosis que se determinó previamente no tenía ningún impacto en la viabilidad de células normales.
- 45 La Fig. 21 es una gráfica que muestra la viabilidad celular después de un ensayo de cuantificación con resazurina para líneas celulares de mieloma MPC-11 y RPMI-8226, tomada 15 horas después del tratamiento con NRRPs administradas a una MOI 250. SR4987 es una línea celular de células estromales de médula ósea normal.
- 50 La Fig. 22 es una gráfica que ilustra la viabilidad celular después de un ensayo de cuantificación con resazurina para la línea celular de mieloma múltiple MPC-11, tomada 72 horas después del tratamiento con NRRPs generadas por UV, y el efecto combinatorio de las NRRPs generadas por UV con melfalán (20  $\mu$ M).

- La Fig. 23 es una gráfica que ilustra la viabilidad celular después de un ensayo de cuantificación con resazurina para la línea celular de mieloma múltiple MPC-11, tomada 72 horas después del tratamiento con NRRPs generadas por UV, y el efecto combinatorio de las NRRPs generadas por UV con el compuesto mimético del segundo activador de caspasa derivado de la mitocondria (SMAC), LCL161 (15  $\mu$ M).
- 5 La Fig. 24 es una gráfica que ilustra la viabilidad celular después de un ensayo de cuantificación con resazurina para la línea celular de mieloma múltiple RPMI-8226, tomada 72 horas después del tratamiento con NRRPs generadas por UV, y el efecto combinatorio de las NRRPs generadas por UV con carfilzomib (5 nM).
- La Fig. 25A es un conjunto de imágenes de microscopía de campo claro de una línea celular de glioblastoma de tumor cerebral tardío (DBT) en ratón, tomadas 24 horas después del tratamiento con PBS o NRRPs.
- 10 La Fig. 25B es un conjunto de imágenes de microscopía de campo claro de una línea celular de astrocitoma (K1491), tomadas 24 horas después del tratamiento con PBS o NRRPs.
- La Fig. 25C es un conjunto de imágenes de microscopía de campo claro de una línea celular de glioma de ratón (GL261), tomadas 24 horas después del tratamiento con PBS o NRRPs.
- 15 La Fig. 26 es una gráfica que muestra la viabilidad celular después de un ensayo de cuantificación con resazurina para las líneas celulares de cáncer cerebral DBT, K1491, K1492, CT2A, y GL261 con respecto al control normal HDFN.
- La Fig. 27 es una gráfica que ilustra la viabilidad celular después de un ensayo de cuantificación con resazurina para la línea celular de glioblastoma CT2A, tomada 72 horas después del tratamiento con las NRRPs generadas por UV, y el efecto combinatorio de las NRRPs generadas por UV con el inhibidor de HDAC SAHA (10  $\mu$ M).
- 20 La Fig. 28A es un conjunto de imágenes de microscopía fluorescente (4X) de la citotoxicidad mediada por NRRP sobre células tumorales en líneas celulares resistentes de tumores sólidos. El conjunto de imágenes muestra células cancerosas mamarias o de mama de ratón (4T1) y riñón humano (786-0) tratadas con PBS, VSV vivo y NRRPs. Las imágenes fueron tomadas 24 h después de la infección.
- La Fig. 28B es un conjunto de imágenes de microscopía de campo claro, tomadas 72 h después de la infección, de la citotoxicidad de células tumorales mediada por NRRP en líneas celulares resistentes de tumores sólidos, en células cancerosas de mama (4T1) y riñón (786-0) tratadas con PBS, VSV vivo y NRRPs.
- 25 La Fig. 28C es una gráfica que muestra la cuantificación con resazurina de la viabilidad celular en líneas celulares resistentes de tumores sólidos, de células cancerosas de mama (4T1) y riñón (786-0) tratadas con PBS, VSV vivo y NRRPs, 72 h después de la infección.
- 30 La Fig. 29 es una gráfica que ilustra la ventaja en la supervivencia en el cáncer de colon subcutáneo CT-26 tratado con 2E9 de NRRPs generadas por UV en los días 16, 18 y 21 después de la implantación del tumor.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA

En general, la presente descripción proporciona una partícula no replicante derivada de virus y su uso como un agente anticanceroso. Una partícula no replicante derivada de virus (NRVP) es una partícula derivada de un virus que es capaz de unirse y ser internalizada por una célula, pero que ha sido modificada para evitar la formación, o reducir sustancialmente la formación, de nuevas partículas de virus cuando la NRVP está en la célula. Un ejemplo de una NRVP es una partícula no replicante derivada de rhabdovirus (NRRP).

35

La NRVP incluye: una envoltura que tiene un número suficiente de proteínas G funcionales en la superficie de la envoltura para permitir que la partícula derivada de virus se una a la superficie de una célula y sea internalizada. También incluye un polinucleótido de ARN con una secuencia que codifica todas las proteínas necesarias para el ensamblaje de nuevas partículas virales, y una mezcla de proteínas que forman una estructura alrededor del polinucleótido de ARN. Sin embargo, la estructura del ARN de la NRVP está suficientemente reticulada o se ha escindido de tal manera que forma segmentos discontinuos de ARN, de modo que el genoma de la NRVP no puede ser usado para producir las proteínas necesarias para la formación de nuevo virus. Por ejemplo, cuando la partícula está en una célula, la secuencia de ARN no puede ser transcrita en ARNm, traducida en proteína, o ambas. El deterioro o la falta de transcripción y/o traducción significa que se producen insuficientes proteínas en la célula, y no se pueden ensamblar nuevas partículas virales.

40

45

La proteína G funcional puede tener una secuencia que incluye la SEQ ID NO: 1, que se muestra a continuación, que es la secuencia del péptido maduro de la glicoproteína del virus de la estomatitis vesicular Indiana. Esta proteína G funcional tiene número de acceso NCBI NP 955548.1.

50

## ES 2 745 599 T3

```

kftivfphnq kgnwknvpsn yhycpsssd1 nwhndligta iqvkmpkshk aiqadgwmch
askwvttcdf rwygpkyltq sirsftpsve qckesieqtk qgtwlnpgfp pqscgyatvt
daeavivqvt phhvlvdeyt gewvdsqfin gkcsnyicpt vhnsttwhsd ykvkglcdsn
lismditffs edgelsslqk egtgfrsnyf ayetggkack mqyckhwgvr lpsgvwfema
dkdlfaaarf pecpegssis apsqtsvdvs liqdverild ysloqetwsk iraglpispv
dlsylapknp gtgpaftiin gtlkyfetry irvdiaapil srmvgmisgt tterelwddw
apyedveigp ngvltssgy kfplymighg mldsdlhlss kaqvfehphi qdaasqlpdd
eslffgdtgl sknpielveg wfsswkssia sfffiigllii glflvlrvgi hlciklkhtk
krqiytdiem nrlgk (SEQ ID NO: 1)
    
```

5 Como alternativa, la proteína G funcional puede tener una secuencia que es al menos 75% idéntica a SEQ ID NO: 1, con tal de que sea capaz de unirse a una superficie de una célula y efectuar la internalización de la partícula. Por ejemplo, se pueden realizar sustituciones conservativas de aminoácidos sin anular la capacidad de la proteína para unirse a la superficie de una célula y efectuar la internalización de la partícula. Ejemplos de sustituciones conservativas se muestran a continuación en la Tabla 1.

Tabla 1- Sustituciones conservativas de aminoácidos

Restos originales	Sustituciones ejemplares	Sustituciones preferidas
Ala	Val, Leu, Ile	Val
Arg	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn	Gln	Gln
Asp	Glu	Glu
Cys	Ser, Ala	Ser
Gln	Asn	Asn
Glu	Asp	Asp
Gly	Pro, Ala	Ala
His	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile	Leu, Val, Met, Ala, Phe, Norleucina	Leu
Leu	Norleucina, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys	Arg, Ácido 1,4 Diamino-butírico, Gin, Asn	Arg
Met	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe	Leu, Val, Ile, Ala, Trp	Leu
Pro	Ala	Gly
Ser	Thr, Ala, Cys	Thr
Thr	Ser	Ser
Trp	Tyr, Phe	Tyr
Tyr	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val	Ile, Met, Leu, Phe, Ala, Norleucina	Leu

10 Se pueden realizar sustituciones menos conservativas en porciones de la proteína G que no toman parte en la unión a la superficie celular (tal como en un dominio transmembránico), mientras que se podrían necesitar sustituciones más

conservativas en porciones de la proteína que interactúan con un receptor de la proteína G. Las proteínas G son conocidas en la técnica, y un experto en la técnica podría ser capaz de determinar qué sustituciones de aminoácidos sería posible realizar sin anular la capacidad de la proteína para unirse a la superficie de una célula y efectuar la internalización de la partícula.

- 5 La mezcla de proteínas que forman una estructura alrededor del ARN puede incluir al menos las proteínas N, P, M, y L. Una NRVP que tiene las proteínas N, P, M, G y L puede incluir una NRVP derivada de rhabdovirus. Las NRVPs derivadas de Rhabdovirus se pueden denominar como partículas no replicantes derivadas de rhabdovirus (NRRPs). Para los fines de la presente descripción, el término "Rhabdovirus" (NCBI Taxonomy ID: 11270) puede incluir uno cualquiera de los siguientes género de virus y variantes de los mismos: Cytorhabdovirus (NCBI Taxonomy ID: 11305), Ephemerovirus (NCBI Taxonomy ID: 32613), Vesiculovirus (NCBI Taxonomy ID: 11271), supergrupo Dimarhabdovirus sin clasificar (NCBI Taxonomy ID: 349166), Lyssavirus (NCBI Taxonomy ID: 11286), Novirhabdovirus (NCBI Taxonomy ID: 186778), Nucleorhabdovirus (NCBI Taxonomy ID: 11306), rhabdovirus sin asignar (NCBI Taxonomy ID: 686606) y rhabdovirus sin clasificar (NCBI Taxonomy ID: 35303). Las especies dentro de la familia del Rhabdovirus incluyen, sin limitaciones, el virus Maraba, el virus de la estomatitis vesicular (VSV) y el virus de Farmington.
- 10
- 15 La proteína N puede tener una secuencia que incluye SEQ ID NO: 2, que se muestra a continuación, que es la secuencia de la proteína de la nucleocápside del virus de la estomatitis vesicular Indiana. Esta proteína N tiene un número de acceso de NCBI NC 041712.1.

```
mstvtvkriid ntvivpklpa nedpveypad yfrkskeipl yinttkslsd lrgyvyqgk
sgnvsiihvn sylygalkdi rgkldkdwss fginigkagd tigifdlvsl kaldgvlpdg
vsdasrtsad dkwlplyllg lyrvgrtqmp eyrkkldmgl tnqckmineq feplvpegrd
ifdvwgndsn ytkivaavdm ffhmfkkhec asfrygtivs rfkdcacalat fghlckitgm
stedvttwil nrevademvq mmlpgqeidk adsympylid fglsskspys svknpahfhw
gqtlalllrs trarnarqpd dieytsltta gllayavgs sadlaqqfcv gdnkytpdds
tggltnnapp qgrdvewlg wfedqnrkpt pdmmqakra vmslqglrek tigkyaksef
dk (SEQ ID NO: 2)
```

- 20 Como alternativa, la proteína N puede tener una secuencia que es al menos 80% idéntica a SEQ ID NO: 2, siempre y cuando sea capaz de participar en la formación de la estructura de la proteína. Por ejemplo, se pueden realizar sustituciones conservativas de aminoácidos sin anular la capacidad de la proteína para participar en la formación de la estructura de la proteína. Los ejemplos de sustituciones conservativas se muestran en la Tabla 1.

- 25 La proteína P puede tener una secuencia que incluye SEQ ID NO: 3, que se muestra a continuación, que es la secuencia de la proteína NS del virus de la estomatitis vesicular Indiana. Esta proteína P tiene un número de acceso de NCBI NC 041713.1.

```
mdnltkvrey lksysrldqa vgeideieaq raeksnyelf qedgvehtk psyfqaadds
dtesepeied nqglyaqdpe aeqvegfiqq plddyadeev dvvftsdwkp pelesdehkg
tlrltspegl sgeqksqwlk tikavvqsak ywnlaectfe asgegvimke rgitpdvykv
tpvmnthpsq seavsdvwsll sktsmtfqp kaslqpltis ldelfssrge fisvggdgrm
shkeailgl rykklynqar vkysl (SEQ ID NO: 3)
```

- 30 Como alternativa, la proteína P puede tener una secuencia que es al menos 80% idéntica a SEQ ID NO: 3, siempre y cuando sea capaz de participar en la formación de la estructura de la proteína. Por ejemplo, se pueden realizar sustituciones conservativas de aminoácidos sin anular la capacidad de la proteína para participar en la formación de la estructura de la proteína. Los ejemplos de sustituciones conservativas se muestran en la Tabla 1.

La proteína M puede tener una secuencia que incluye SEQ ID NO: 4, que se muestra a continuación, que es la secuencia de la proteína de la matriz del virus de la estomatitis vesicular Indiana. Esta proteína M tiene un número de acceso de NCBI NC 041714.1.

```
msslkklgl kgkgkkskkl giapppyeed tsmeypsap idksyfgvde mdtydpnqlr
yekffftvkm tvrsnrpfrt ysdvaaavsh wdhmyigmag krpfykilaf lgsnlkatp
avladqqqpe yhthcegray lphrmgktp mlnvpehfrr pfniglykgt ieltmtiydd
esleaapmiw dhfnsskfsd frekalmfgl ivekkasgaw vldsishfk (SEQ ID NO: 4)
```

- 35 Como alternativa, la proteína M puede tener una secuencia que es al menos 80% idéntica a SEQ ID NO: 4, siempre y cuando sea capaz de participar en la formación de la estructura de la proteína. Por ejemplo, se pueden realizar

## ES 2 745 599 T3

sustituciones conservativas de aminoácidos sin anular la capacidad de la proteína para participar en la formación de la estructura de la proteína. Los ejemplos de sustituciones conservativas se muestran en la Tabla 1.

La proteína L puede tener una secuencia que incluye SEQ ID NO: 5, que se muestra a continuación, que es la secuencia de la proteína polimerasa del virus de la estomatitis vesicular Indiana. Esta proteína L tiene un número de acceso de NCBI NC 041716.1.

5

```
mevhdfetde fndfneddya treflnpder mtylnhadyn lnsplisddi dnlirkfnsl
pipsmwdskn wdgvlmlts cganpistsq mhkwmgswlm sdnhdasqgy sflhevdkea
eitfdvvetf irgwgnkpie yikkerwtds fkilaylcqk fldlhkltli lnavsevell
nlartfkgkv rrsshgtnic rirvpslgpt fisegwayfk kldilmdrnf llmvkdviig
rmqtvlsmvc ridnlfsegd ifsllniyri gdkiverqgn fsydlikmve picnlklmkl
aresrplvpq fphfenhikt svdegakidr girflhdqim svktvdltlv iygsfrhwgh
pfidyttgle klhsqvtmkk didvsyakal asdlarivlf qqfndhkkwf vngdllphdh
pfkshvkent wptaaqvqdf gdkwhelpki kcfeipdlld psiiysdksh smnrsevlkh
vrmpntpip skkvltqtmld tkatnwkefl keidekgldd ddliiglkkgk erelklagr
fslmswklre yfviteylik thfvpmfkgk tmaddltavi kkmlsdsssgq glksyeaici
anhidyekwn nhqrklsngp vfrvmgqflg ypslierthe ffeksliyyng rpdlmrvh
ntlinstsqr vcwqqqeggl eglrqkgwti lnlviqrea kirntavkvl aggdngvict
qyktksrnv velqgalnqm vsnnekimta ikigtgklgl linddetmqd adylnygkip
ifrgvirgle tkrsrvtcv tndqiptcan imssvstnal tvahfaenpi namiqynyfg
tfarlllmmh dpalrqslve vqdkipglhs stfkyamlyl dpsiggvsgm slsrfliraf
pdpvteslsf wrfihvhars ehkemsavf gnpeiakfri thidklvedp tslniamgms
panllktevk kcliesrqi rnvqvikdati ylyheedrlr sflwsinplf prflsefksg
tflgvadgli slfqnsrtir nsfkkkyhre lddlivrsev sslthlglkh lrrgscmw
csathadtlr ykswgrtvig ttvphpleml gpqhrketpc apcntsgfny vsvhcpdgi
dvfssrgplp aylgsktses tsilqpwere skvplikat rlrdaishfv epdsklanti
lsnihsltge ewtkrqhgfk rtgsalhrfs tsmshggfa sqstaaltrl mattdtmrdl
gdqnfdfllq atllyaqitt tvarwgwits ctathyhiack sclrpieeit ldssmdytp
dvshvlktr ngegswgqei kqiyplegnw knlapaeqsy qvgrcigfly gdlayrksth
aedssflpls iqgrirgrgf lkgllldglmr asccqvihrr slahlkrpan avyggliyli
dklsvppfl sltrsgpird eletiphkip tsyptsnrnm gvivrnyfky qcrliekgky
rshysqlwlf sdvlsidfig pfsisttllq ilykpflsgk dknelrelan lssllrsg
wedihvkfft kdillcpeei rhackfgiak dnnkdmsypp wgresrgtit tipvytttp
ypklemppr iqnpillgir lqqlptgahy kirsilhgmgy ihyrdflscg dgsggmtaal
lrenvhsrgi fnsllselgs vmrgaspepp saletlggdk srcvnetcw eypsdldcpr
twdyflrka glglqidliv mdmevrdsst skietnvrn yvhrildegg vliykytyty
iceseknavt ilgpmfktvd lvqtefsssq tsevymvckg lkklidepnp dwssineswk
nlyafgsseq efarakkvst yftltgipsq fipdpfvnie tmlqifgvpt gvshaaalks
sdrpadllti slfymaiisy yninhirvgp ippnppsdi aqnvgiaitg isfwslmek
diplyqqcla viqqsfpirw eavsvkgyk qkwstrgdgl pkdtrtsdsl apignwirsl
elvrnqvrln pfneilfnql crtvdnhlkw snlrrntgmi ewinrriske drsilmlksd
lheenswrd (SEQ ID NO: 5)
```

Como alternativa, la proteína L puede tener una secuencia que es al menos 70% idéntica a SEQ ID NO: 5, siempre y cuando sea capaz de participar en la formación de la estructura de la proteína. Por ejemplo, se pueden realizar

sustituciones conservativas de aminoácidos sin anular la capacidad de la proteína para participar en la formación de la estructura de la proteína. Los ejemplos de sustituciones conservativas se muestran en la Tabla 1.

5 En algunos ejemplos, la NRVP puede producir las proteínas N, P, M y G funcionales después de que la NRVP se haya unido y haya sido internalizada por la célula. Sin embargo, la NRVP carece de la capacidad, o tiene una capacidad reducida, de producir la proteína L funcional. Sin la proteína L funcional, o sin la cantidad correcta de proteína L funcional, no se pueden ensamblar nuevas partículas virales.

10 En otros ejemplos, la NRVP pueden producir las proteínas N, P y M funcionales de que la NRVP se haya unido y haya sido internalizada por la célula. Sin embargo, la NRVP carece de la capacidad, o tiene una capacidad reducida, de producir las proteínas G y L funcionales. Sin proteínas G y L funcionales, o sin las cantidades o relaciones correctas de proteínas G y L funcionales, no se pueden ensamblar nuevas partículas virales.

En aún otros ejemplos, la NRVP puede producir las proteínas N y P funcionales de que la NRVP se haya unido y haya sido internalizada por la célula. Sin embargo, la NRVP carece de la capacidad, o tiene una capacidad reducida, de producir las proteínas M, G y L funcionales. Sin las proteínas M, G y L funcionales, o sin las cantidades o relaciones correctas de las proteínas M, G y L funcionales, no se pueden ensamblar nuevas partículas virales.

15 En aún otros ejemplos, la NRVP puede producir la proteína N funcional de que la NRVP se haya unido y haya sido internalizada por la célula. Sin embargo, la NRVP carece de la capacidad, o tiene una capacidad reducida, de producir las proteínas P, M, G y L funcionales. Sin las proteínas P, M, G y L funcionales, o sin las cantidades o relaciones correctas de proteínas P, M, G y L funcionales, no se pueden ensamblar nuevas partículas virales.

20 En aún otros ejemplos, la NRVP carece de la capacidad, o tiene una capacidad reducida, para producir las proteínas N, P, M, G y L funcionales. Sin las proteínas N, P, M, G y L funcionales, o sin las cantidades o relaciones correctas de proteínas N, P, M, G y L funcionales, no se pueden ensamblar nuevas partículas virales.

25 Para que la partícula no replicante derivada de virus sea capaz de unirse a la superficie de una célula y sea internalizada, la NRVP debe tener un número suficiente de proteínas G funcionales en la envoltura de la partícula viral. Se espera que una NRVP que tiene al menos 5% del número de proteínas G que se encuentran en la partícula del virus de tipo silvestre aún pueda ser capaz de unirse a una célula y ser internalizada. Preferentemente, la NRVP tendría al menos 50% del número de proteínas G que se encuentran en la partícula del virus de tipo silvestre, y más preferentemente la NRVP tendría al menos 100% del número de proteínas G que se encuentra en la partícula del virus de tipo silvestre. En ejemplos específicos, la NRVP tiene al menos 60 proteínas G funcionales por partícula, al menos 600 proteínas G funcionales por partícula, o al menos 1.200 proteínas G funcionales por partícula.

30 Como se señaló anteriormente, la NRVP incluye ARN que tiene una secuencia que codifica todas las proteínas necesarias para el ensamblaje de nuevas partículas virales. Una razón por la cual la secuencia de ARN pueda ser incapaz de producir estas proteínas cuando la NRVP está en una célula es cuando el ARN está reticulado en tal grado que se reduce o detiene la producción de proteínas. En algunos ejemplos, al menos 0,05% de los nucleótidos reticulados puede ser suficiente para reducir o detener la producción de proteínas a partir de la secuencia de ARN. En otros ejemplos, el ARN reticulado puede incluir al menos 0,5% de nucleótidos reticulados. Puede ser preferible tener al menos 1% de los nucleótidos reticulados, y más preferible tener al menos 10% o al menos 20% de los nucleótidos reticulados.

35 La reticulación de los nucleótidos puede aumentar la probabilidad de hacer que las proteínas G sean incapaces de unirse a una superficie celular. En consecuencia, puede ser preferible que menos del 80% de los nucleótidos esté reticulado.

Los nucleótidos en la estructura del ARN pueden estar reticulados con otros nucleótidos de ARN, con aminoácidos en una proteína en la estructura proteica alrededor del ARN, o con ambos.

45 Además de la estructura reticulada del ARN, la estructura proteica alrededor del ARN pueden incluir una proteína que tiene un aminoácido que está reticulado con otra proteína de la estructura proteica; reticulado con otro aminoácido de la misma proteína; reticulado con la estructura del ARN; o cualquier combinación de los anteriores.

Además, la estructura del ARN de la NRVP puede ser incapaz de replicarse por la ablación de la función de la actividad de ARN polimerasa de la NRVP codificada por las proteínas P y L. Esto puede lograrse por la reticulación suficiente de las proteínas P y L con la estructura del ARN, por la reticulación de las proteínas P y L con otras proteínas, o dañando la estructura proteica de la NRVP de modo que la función de las proteínas P y L se vea negativamente afectada.

50 Otra razón por la que la secuencia de ARN pueda ser incapaz de producir estas proteínas cuando la NRVP está en una célula es cuando la estructura del ARN se ha escindido para formar segmentos discontinuos de ARN. Los virus de ARN, tales como los rhabdovirus, tienen un solo polinucleótido continuo de ARN que incluye las secuencias de todos los genes que codifican las proteínas necesarias para la replicación viral. La escisión del único polinucleótido continuo en dos o más polinucleótidos discontinuos de ARN da como resultado la transcripción defectuosa del genoma, la traducción defectuosa del genoma, o ambas. Las proteínas que son codificadas en un polinucleótido sin un sitio de iniciación de la transcripción no pueden ser transcritas. Además, el genoma no puede experimentar una replicación de

55

longitud completa, y no puede ser incorporado adecuadamente en una partícula viral naciente, evitando así la producción de partículas virales.

5 Las NRVPs pueden incluir al menos dos polinucleótidos discontinuos de ARN, solamente uno de los cuales comprende un sitio de iniciación de la transcripción. Sin embargo, puede ser preferible escindir el ARN en más de dos segmentos. En consecuencia, las NRVPs incluyen preferentemente al menos cinco, más preferentemente al menos 10, e incluso más preferentemente al menos 100 polinucleótidos de ARN discontinuos.

10 Los virus de ARN pueden tener una secuencia de ARN que está en el orden de los 11.000 nucleótidos. En los virus de ARN que tienen secuencias de ARN con 11.000 nucleótidos o más, puede ser deseable escindir el ARN en segmentos de no más de 10.000 nucleótidos. Una NRVP resultante de la escisión de un virus de ARN con 11.000 nucleótidos podría entonces tener al menos un segmento de ARN de menos de 10.000 nucleótidos y otro segmento de ARN de menos de 1.000 nucleótidos. Dado que sólo uno de los segmentos incluye el sitio de iniciación de la transcripción, o puesto que la secuencia que codifica la proteína es discontinua, el otro de los segmentos no puede ser transcrito o traducido, y cualquier proteína codificada en ese segmento no sería producida.

15 Puede ser preferible escindir el ARN en porciones más pequeñas. Por ejemplo, los polinucleótidos discontinuos de ARN pueden tener no más de 7000, no más de 5000, no más de 3000, o no más de 1000 nucleótidos.

20 Una partícula no replicante derivada de virus se produce a partir de un virus vivo que incluye ARN que tiene una secuencia que codifica las proteínas N, P, M, G y L: separando opcionalmente la partícula derivada de virus a partir de un compuesto que absorbe radiación UV; y sometiendo luego el virus vivo a un agente que daña el ARN, ya sea para reticular la estructura del ARN, o para escindir la estructura del ARN, evitando así que el ARN produzca las proteínas suficientes necesarias para el ensamblaje de nuevas partículas virales.

25 La estructura del ARN del virus vivo está suficientemente reticulada de manera que cuando la partícula derivada de virus está en una célula: se reduce la transcripción del ARN en ARNm; se reduce la traducción del ARNm en proteína; o ambas. Del mismo modo, la estructura del ARN del virus vivo es escindida en segmentos de ARN lo suficientemente discontinuos de modo que cuando la partícula derivada de virus está en una célula: se reduce la transcripción del ARN en ARNm; se reduce la traducción del ARNm en proteína; o ambas.

30 La reticulación del ARN puede lograrse sometiendo el virus vivo a la radiación electromagnética. La radiación electromagnética puede tener una longitud de onda de menos de alrededor de 1 mm. La energía asociada con la radiación electromagnética aumenta a medida que disminuye la longitud de onda. El aumento de energía está asociado con el daño al ADN, evidenciado por el aumento de las tasas de cáncer por exposición a la luz ultravioleta, rayos X y radiación gamma. Por consiguiente, es preferible si la radiación electromagnética tiene una longitud de onda de menos de alrededor de 500 nm, y más preferible si la longitud de onda es menor que alrededor de 280 nm. En ejemplos particulares, la longitud de onda está entre alrededor de 0,1 picómetros y 280 nm.

35 Puede ser especialmente deseable usar radiación electromagnética que tenga una longitud de onda entre alrededor de 100 y alrededor de 280 nm, ya que tales longitudes de onda inducen preferentemente la reticulación en nucleótidos con respecto a la reticulación en proteínas. Cuando la radiación electromagnética está en el espectro UV, es decir, entre alrededor de 100 nm y alrededor de 400 nm, la disolución que contiene el virus vivo puede ser sometida a una dosis de radiación electromagnética entre alrededor de 100 mJ/cm<sup>2</sup> y alrededor de 8.000 mJ/cm<sup>2</sup>. Preferentemente, la dosis está entre alrededor de 150 mJ/cm<sup>2</sup> y alrededor de 5.000 mJ/cm<sup>2</sup>. Incluso más preferentemente, la dosis está entre alrededor de 150 mJ/cm<sup>2</sup> y alrededor de 1.000 mJ/cm<sup>2</sup>. Todavía incluso más preferentemente, la dosis está entre 40 alrededor de 150 mJ/cm<sup>2</sup> y alrededor de 500 mJ/cm<sup>2</sup>. Más preferentemente, la dosis está entre alrededor de 150 mJ/cm<sup>2</sup> y alrededor de 300 mJ/cm<sup>2</sup>.

45 La dosis real puede depender de las características de la disolución. Por ejemplo, si la disolución incluye colorantes que absorben la luz UV, entonces se requiere una dosis mayor. Del mismo modo, si la disolución es irradiada desde un solo punto y el recipiente es grande, puede haber virus vivo que no esté expuesto a la intensidad completa de la luz UV. En tal situación, puede ser beneficiosa una dosis mayor o mayor agitación de la disolución. Un experto en la técnica sería capaz de determinar los parámetros necesarios para proporcionar una dosis apropiada.

50 En situaciones en las que el medio que contiene el virus vivo es turbio, incluye colorante, o absorbe de alguna otra manera la luz UV, puede ser deseable el irradiar el virus vivo con rayos X (es decir, radiación electromagnética con una longitud de onda entre 0,01 y 10 nm) o rayos gamma (es decir, radiación electromagnética con una longitud de onda de menos de 10 picómetros). Cuando la radiación electromagnética es la radiación gamma, el virus vivo puede ser sometido a una dosis entre alrededor de 1 kGy y alrededor de 50 kGy. Más preferentemente, la dosis está entre alrededor de 5 kGy y alrededor de 20 kGy. La radiación gamma puede ser generada desde cobalto-60.

55 El virus vivo puede ser sometido a radiación electromagnética a una temperatura de 4°C o inferior. Por ejemplo, el virus vivo puede ser sometido a radiación UV a una temperatura de alrededor de 4°C. En otro ejemplo, el virus vivo puede ser sometido a radiación gamma a una temperatura de alrededor de -80°C. En aún otro ejemplo, el virus vivo puede ser sometido a radiación gamma a una temperatura de alrededor de -130°C.

- Como se señaló anteriormente, la estructura del ARN puede estar reticulada, o escindida en segmentos de ARN suficientemente discontinuos como para reducir o evitar la transcripción del ARN en ARNm; la traducción del ARNm en proteína; o ambas. Además de la radiación electromagnética discutida anteriormente, esto también puede lograrse mediante la exposición del virus vivo a un agente químico, tal como un agente alquilante capaz de reticular el ARN, o un agente formador de radicales libres capaz de escindir el ARN. Ejemplos de tales agentes de reticulación incluyen busulfán, ciclofosfamida, melfalán, formaldehído, carbodiimida y suberato de bis-sulfosuccinimidilo. Ejemplos de agentes formadores de radicales libres incluyen peróxidos, bromuro de hidrógeno, persulfato de amonio y radical hidroxilo.
- El virus vivo puede ser separado de un compuesto absorbente de la luz UV fraccionando el medio de cultivo usado para generar las partículas virales. El medio de cultivo se puede fraccionar, por ejemplo, en un gradiente de sacarosa. Una vez que se ha preparado la NRVP, ésta se puede separar por fraccionamiento o filtrar el diluyente que contiene las partículas derivadas de virus. El diluyente se puede fraccionar, por ejemplo, en un gradiente de sacarosa o se puede filtrar por filtración de flujo tangencial.
- La presente descripción también incluye estimular una respuesta inmunitaria mediante la administración de partículas no replicantes derivadas de virus, como se describió anteriormente, a un paciente. La administración de las NRVPs induce la expresión y la liberación de citocinas en el paciente. Ejemplos de citocinas que pueden ser liberadas en el paciente incluyen: interleucinas, interferones, citocinas inflamatorias, miembros de la familia de las quimiocinas CXC, miembros de la familia del factor de necrosis tumoral, o cualquier combinación de los mismos. Estos factores pueden dar como resultado la presentación o el reconocimiento de antígenos tumorales.
- La descripción también incluye inducir la muerte celular de las células cancerosas en un paciente, que incluye administrar partículas no replicantes derivadas de virus, como se describe anteriormente, al paciente.
- La descripción incluye además inducir preferentemente la muerte celular en las células cancerosas o células no cancerosas, mediante la administración de partículas no replicantes derivadas de virus, como se describe anteriormente, al paciente.
- La muerte celular puede ser a través de apoptosis, por ejemplo causada por la presencia de las NRVPs, o de constituyentes de las NRVPs en la célula. De forma alternativa, la muerte celular puede ser debida al reclutamiento de células efectoras del sistema inmune innato, células efectoras del sistema inmune adaptativo, o cualquier combinación de las mismas, por ejemplo causada por citocinas liberadas por la célula. Las células efectoras del sistema inmune adaptativo pueden ser células T, células B, o ambas. Las células efectoras del sistema inmune innato pueden incluir mastocitos, fagocitos (tales como macrófagos, neutrófilos, o células dendríticas), basófilos, eosinófilos, células asesinas naturales, células  $T\gamma\delta$ , o cualquier combinación de las mismas.
- El paciente es tratado con un número suficiente de NRVP para estimular la respuesta inmunitaria o inducir la muerte celular de las células cancerosas. Dado que las NRVPs no forman partículas virales vivas, es deseable administrar las NRVPs en una cantidad que sea mayor que la que se administra en los tratamientos con virus competentes para la replicación. Al paciente se le puede administrar  $1E10$  a  $1E15$  partículas no replicantes derivadas de virus, aunque en los ejemplos preferidos se administra al paciente de  $1E11$  a  $1E13$  de partículas no replicantes derivadas de virus.
- Puede existir un beneficio sinérgico cuando se combina el tratamiento de un paciente con NRVP y el tratamiento con un agente quimioterapéutico. El agente quimioterapéutico puede ser, por ejemplo: bendamustina, dexametasona, doxorubicina, vincristina, imatinib, disatinib o idarrubicina. Estos agentes pueden mejorar la sensibilidad a la apoptosis mediada por NRVP, mejorar la secreción de citocinas, mejorar las respuestas inmunitarias antitumorales, promover el cierre vascular, o cualquier combinación de los mismos.
- Las NRVPs pueden usarse para tratar tumores sólidos o neoplasias sin tumores sólidos, tales como la leucemia. Sin embargo, ya que las NRVPs no forman partículas de virus vivos en una célula, es especialmente deseable el exponer todas las células cancerosas a las NRVPs inyectadas. Esto contrasta con la administración de virus competentes para la replicación, en los que la exposición de una parte de las células cancerosas al virus inyectado da como resultado la producción de virus adicional y la posterior exposición de las células cancerosas restantes a las partículas virales generadas.
- En vista de la falta de producción de partículas virales, es preferible usar las NRVPs para tratar la leucemia, ya que la administración intravenosa de las NRVPs da como resultado que una fracción sustancial de las células leucémicas quede expuesta a las partículas. En contraste, en el caso de los tumores sólidos, una porción de las células en el tumor sólido puede no quedar expuesta a las NRVPs inyectadas. El modo de administración de partículas no replicantes derivadas de virus puede ser determinado según el tipo cáncer a tratar. Las NRVPs se pueden administrar al paciente por vía intratumoral, por vía intranasal, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal, intraarterial, intravenosa, subcutánea o intracranial.
- Las partículas no replicantes derivadas de virus (NRVPs) de la presente descripción pueden formarse a partir de partículas de Rhabdovirus de tipo silvestre modificadas de manera que carecen de la capacidad de propagarse entre las células. La partícula no replicante derivada de Rhabdovirus puede ser derivada de una partícula de Rhabdovirus de tipo silvestre competente para la replicación. Una vez modificada, la NRVP no puede mantener la replicación del virión.

Las NRRPs pueden retener su tropismo citolítico frente a células inmortalizadas. Los ejemplos específicos de NRRPs tienen propiedades inmunoestimulantes innatas y/o adaptativas frente a células inmortalizadas.

5 Para los fines de la presente descripción, la expresión “células inmortalizadas” significa células cuya división celular está descontrolada, e incluyen, sin limitación, células hiperproliferativas, células tumorales o cancerosas y células inmortalizadas transformadas. La o las células hiperproliferativas se refieren a cualquier neoplasia o célula o tejido crónicamente infectados. La neoplasia puede ser, por ejemplo, cualquier neoplasia benigna, neoplasia cística, carcinoma in situ, neoplasia maligna, neoplasia metastásica o neoplasia secundaria. La célula hiperproliferativa puede ser una célula cancerosa hematopoyética o una célula de un tumor sólido.

10 Las NRRPs, de acuerdo con la presente descripción, pueden retener su tropismo citolítico frente a las células inmortalizadas. Esto significa que las NRRPs inducirán muerte celular preferentemente en células inmortalizadas, tales como células tumorales o cancerosas y células inmortalizadas transformadas.

El Rhabdovirus de tipo silvestre puede modificarse para generar la NRRP por medios que interrumpen la replicación y/o expresión de su genoma. Esto significa que la replicación y/o expresión del genoma disminuye en comparación con la expresión parental de referencia. La expresión del genoma también podría ser alterada por ablación.

15 Para interrumpir la expresión del genoma del Rhabdovirus de tipo silvestre, se puede usar irradiación electromagnética (EM). La irradiación electromagnética puede incluir la irradiación UV, infrarroja, rayos X, gamma y otros tipos de irradiación en el espectro EM, tal como UVC (200-280 nanómetros). Para interrumpir la expresión del genoma del Rhabdovirus de tipo silvestre también se puede usar la interrupción inducida por medios químicos. Por ejemplo, se puede usar un agente dañino para el genoma, tal como el busulfán.

20 La dosis EM necesaria para interrumpir suficientemente la expresión del genoma del Rhabdovirus de tipo silvestre dependerá del método, y puede variar de acuerdo con parámetros tales como la concentración del virus, la turbidez de la preparación madre del virus, el volumen usado, la presencia de contaminantes o la pureza de la preparación madre del virus, el diluyente usado, y el receptáculo en el que se almacena la preparación del virus para el procedimiento (plástico, vidrio, etc.). La dosificación química también puede verse afectada por diversos parámetros.

25 En un ejemplo, 50  $\mu$ l de un lote de  $1E10$  PFU/ml de Rhabdovirus de tipo silvestre purificado usando el método de colchón de sacarosa se irradió a  $250 \text{ mJ/cm}^2$  (durante alrededor de 40 segundos).

30 La presente descripción proporciona además una partícula no replicante derivada de Rhabdovirus que se genera a partir de una partícula derivada de Rhabdovirus de tipo silvestre. El virus de tipo silvestre ha sido modificado para que carezca de la capacidad de propagarse entre células, pero para retener propiedades inmunoestimulantes innatas y/o adaptativas.

La presente descripción también proporciona un uso de una NRVP, y específicamente una NRRP, para tratar una población de células inmortalizadas.

35 Para los fines de la presente descripción, el término “tratar” se debe entender que significa aplicaciones en las que se usa la NRVP o NRRP sola o en combinación con terapia de radiación, quimioterapia, inmunoterapia, cirugía, terapias basadas en virus oncolíticos u otras terapias basadas en virus.

40 Una persona experta en la técnica entenderá que el término “quimioterapias” incluye, pero no está limitado a, las terapias que implican el uso de inhibidores mitóticos, IMiDS tales como lenalidomida o pomalidomida, agentes modificadores de cromatina, inhibidores de HDAC como SAHA, agentes hipometilantes, agentes alquilantes, inhibidores de mTOR, inhibidores de tirosina cinasa, inhibidores del proteasoma, antimetabolitos, agentes que dañan el ADN o regulan el ADN, inhibidores de la fosfodiesterasa, compuestos miméticos de SMAC como LCL161, corticosteroides y citocinas/quimiocinas.

45 Por ejemplo, la quimioterapia podría incluir terapias que usan: agentes alquilantes, agentes que dañan el ADN o agentes reguladores del ADN, inhibidores mitóticos, inhibidores de tirosina cinasa, inhibidores del proteasoma, IMiDS, antimetabolitos, inhibidores de mTOR, agentes modificadores de la cromatina, inhibidores de HDAC, agentes hipometilantes, inhibidores de la fosfodiesterasa, corticosteroides y citocinas/quimiocinas. Quimioterapias específicas incluyen, pero no están limitadas a: bendamustina, busulfán, carboplatino, carmustina, clorambucilo, cisplatino, ciclofosfamida, dacarbazina, lomustina, melfalán, temozolomida, tiotepa, oxaliplatino, procarbazona, pentostatina, cladribina, clofarabina, citarabina, fludarabina, gemcitabina, hidroxiurea, mercaptopurina, nelarabina, fluorouracilo, bleomicina, dactinomicina, daunorrubicina, doxorubicina, doxorubicina liposomal, idarrubicina, mitoxantrona, capecitabina, topotecán, irinotecán, etopósido, paclitaxel, tenipósido, tioguanina, omacetaxina, altretamina, asparaginasa, asparaginasa, pegaspargasa, isotretinoína, ácido retinoico, arsénico, vinblastina, vincristina, vincristina liposomal, bosutinib, dasatinib, imatinib, nilotinib, sunitinib, vemurafenib, regorafenib, bortezumib, carfilzomib, talidomida, lenalidomida, pomalidomida, metotrexato, pralatrexato, everolimus, temsirolimus, vorinostat, romidepsina, ácido valproico, decitabina, azacitidina, anagrelida, cortisona, dexametasona, prednisona y triamcinolona, interferón alfa 2a, interferón alfa 2b, peginterferón alfa 2b, interferón beta 1b, aldesleuquina/IL-2, denileuquina diftitox, factor estimulante de colonias de granulocitos y factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos.

55

5 Para los fines de la presente descripción, el término “inmunoterapias” se entenderá que significa inmunoterapias dirigidas a CD20 (tal como rituximab, ibritumomabtiuxetano y tositumomab), CD47, CD33, CD38, CD138, CS1, CD52 (tal como alemtuzimab), VEGF (tal como bevacizumab), Her2/Neu (tal como trastuzumab), EGFR (tales como cetuximab y nimotuzumab), CTLA4 (tal como ipilimumab) o IGF-1 (tal como ganitumab). Otras inmunoterapias conocidas por los expertos en la técnica también pueden ser incluidas dentro del alcance del término “inmunoterapias”.

10 La referencia a “terapias basadas en virus oncolíticos” incluye aquellas conocidas en la técnica, incluyendo terapias basadas en el poxvirus (virus basados en el virus de la vacuna), terapias basadas en el virus del herpes simple (OncoVEXGM-CSF), terapias basadas en Rhabdovirus (MG1, VSV-IFN $\beta$ , VSVd51), Reovirus (Reolysin), terapias basadas en adenovirus (ONYX 015), terapias basadas en el virus del sarampión, terapias basadas en el virus de la enfermedad de New Castle, terapias basadas en virus alfa, y terapias basadas en parvovirus.

Las NRVPs y NRRPs se puede administrar por vía intratumoral, intranasal, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal, intraarterial, intravenosa, subcutánea o intracraneal.

15 Se demostraron las propiedades oncolíticas de las NRRPs en varios modelos in vitro e in vivo diferentes usando dos cepas diferentes derivadas de Rhabdovirus y varios tipos de células diferentes, incluyendo muestras de pacientes, como se discute en mayor detalle a continuación.

La citotoxicidad específica del tumor se caracterizó en una serie de ensayos que incluyen la caracterización microscópica del fenotipo celular, cuantificación de la citotoxicidad con resazurina, y citometría de flujo para determinar la destrucción de células tumorales.

20 El uso de un modelo de protección inmune contra L1210 indica que la activación por NRRP de las rutas de muerte celular programada conduce a la generación de una respuesta inmunitaria innata y adaptativa contra el tumor. Como tal, el tratamiento con NRRP no requiere que cada célula sea infectada para mantener la eficacia, y por lo tanto se puede usar como un tratamiento por sí solo o como un adyuvante en regímenes terapéuticos anticancerosos.

25 También se realizó la cuantificación basada en Luminex de citocinas inducidas por NRRP en ratones portadores de L1210 durante crisis blástica aguda. Todas las citocinas identificadas fueron inducidas más de 2 veces en ratones tratados con NRRP y son estadísticamente significativas (prueba de la t no pareada  $pV < 0,05$ ).  $pV$  se ha corregido para tener en cuenta la prueba de múltiples hipótesis (Método de Benjamini y Hochberg).

30 Este experimento muestra también que las NRRPs pueden ser efectivas de forma óptima cuando se aplica una alta relación de NRRP a célula (es decir,  $> 1$ ). Esta mayor dosificación asegura que la mayoría de las células dentro de una población celular encuentre una NRRP citotóxica. Esto contrasta con las terapias de OV vivo, que dependen de la propagación viral para lograr la esperada eficacia terapéutica y que por su naturaleza usan una baja relación de OV a célula para promover la entrega segura al receptor.

### Ejemplos

35 Para todas las figuras excepto la Fig. 1A, las NRRPs fueron generadas por irradiación UVC de una muestra de 50  $\mu$ l de  $1E10$  PFU/ml de VSV-GFP vivos a una dosis de irradiación de 250  $mJ/cm^2$ , se purificaron usando un método de colchón de sacarosa en el que la preparación de virus se centrifugó a través de un colchón de sacarosa al 20% (p/v) en agua (5 ml) a 148.000 x g durante 120 minutos.

#### Ejemplo 1: NRRPs basadas en VSV generadas por irradiación con radiación electromagnética

40 El daño fotónico del Rhabdovirus por radiación UV se puede usar para generar una partícula no replicante derivada de virus que retiene su bioactividad. El uso de altas dosis de irradiación UV ablaciona el genoma de los Rhabdovirus, volviendo al virus biológicamente inerte. Sin embargo, ahora se ha descubierto que la irradiación UV se puede aplicar a una dosis que todavía permite que el virus se una y sea internalizado por una célula, pero que detiene, o sustancialmente reduce, la capacidad de la partícula para formar nuevas partículas virales cuando la partícula viral se encuentra dentro de la célula. De acuerdo con ello, el virus pierde su capacidad de replicarse, sin embargo, mantiene las actividades biológicas.

45 Se determinó que la irradiación de VSV purificado (un Rhabdovirus) que expresa la proteína fluorescente verde con una dosis entre alrededor de 100 y alrededor de 1000  $mJ/cm^2$  de fluencia UV genera una NRRP que retiene tropismo citolítico frente a células inmortalizadas (Figs. 1A y 1B), pero que carece de la capacidad de propagarse entre las células (Fig. 2A).

50 Se aplicó una dosis de 250  $mJ/cm^2$  de irradiación UV a la cepa de VSV de tipo silvestre para generar NRRPs basadas en VSV de acuerdo con la presente descripción. En la Fig. 1A, la dosis UV  $1E2$  corresponde a 100  $mJ/cm^2$ . Como tal, cuando se irradia VSV-eGFP con una dosis de 250  $mJ/cm^2$ , éste pierde sus capacidades de expresión, sin embargo mantiene una potente citotoxicidad contra la línea celular de producción inmortalizada (Vero) (Fig. 2B). La titulación del virus después de la infección confirmó que la partícula resultante era incapaz de replicarse en estas células, en marcado contraste con la infección de virus vivos (Fig. 2C). Este efecto se observó igualmente cuando se usaron otros miembros de la familia del Rhabdovirus, incluyendo el virus Maraba (Fig. 3A, 3B y 3C).

Las curvas de respuesta a la dosis, que se muestran en la Fig. 1A, indican que la citotoxicidad se reduce a dosis de UV por encima de 1000 mJ/cm<sup>2</sup> y queda completamente suprimida a una dosis de UV de 10.000 mJ/cm<sup>2</sup>. Se cree que la citotoxicidad queda suprimida a esta dosis porque las proteínas G están reticuladas en tal grado que no son capaces de permitir que el virus tratado se una a la superficie celular y/o sea internalizado por la célula. Al comparar y contrastar con fibroblastos dérmicos humanos (HDF) neonatales normales (Figs. 1A y 1B), parece que la citotoxicidad ataca preferentemente a las células cancerosas frente a las células no cancerosas. De hecho, las células no cancerosas parecen requerir alrededor de 10 veces más virus para volverse sensibles a la citotoxicidad mediada por NRRP (Fig. 1B).

Para confirmar la ausencia de replicación y propagación de las NRRPs en las células de leucemia aguda, se cuantificaron la síntesis de GFP y los títulos virales después del tratamiento in vitro de una línea celular de una forma agresiva de leucemia linfoblástica aguda en murina (L1210), junto con la línea celular Vero de control (células epiteliales normales de riñón). En ambas líneas celulares sometidas a tratamiento no se observó virus vivo detectable (Figs. 4A y 4B).

El análisis de transferencia Western del genoma viral indica que las NRRPs tienen una expresión genómica global reducida (Fig. 5). Las dosis de UV que bloquean la producción de viriones y disminuyen la expresión del genoma están asociadas con la actividad oncolítica marcada. En estos experimentos se puede usar una alta (mayor o igual a 1) multiplicidad de infección (MOI), o una alta relación de partículas a células, para asegurarse de que cada célula tumoral se encuentre con una NRRP e induzca una muerte celular exhaustiva en toda la población (Fig. 1B).

### **Ejemplo 2: NRRPs basadas en VSV generadas por la exposición a un agente alquilante de ARN**

En otro ejemplo, las NRRPs fueron generadas de forma química mediante el tratamiento de VSV con 6 mg/ml de busulfán a 4°C durante 24 horas, y se añadieron a células Vero durante 24 horas. Menos de 4% de las células Vero continuaron siendo viables después del tratamiento (Fig. 6A). Este efecto se atribuyó a las NRRPs, ya que el tratamiento solo con busulfán durante 24 horas mostró que alrededor del 82% de las células Vero siguieron siendo viables (Fig. 6B). La Fig. 6C muestra el efecto citopático en las células Vero infectadas con VSV-GFP vivo a las 24 horas, y que este lote de virus vivo (VSV-GFP), del cual se derivaron las NRRPs, era, de hecho, competente para la replicación - lo que quedó en evidencia por la expresión de GFP.

### **Ejemplo 3: NRRPs basadas en VSV generadas por exposición a radiación gamma**

En todavía otro ejemplo, las NRRPs fueron generadas mediante la irradiación de 1E10 de VSV congelado con 15 kGy de cobalto-60 a -80°C, y se añadieron 1000 partículas por célula a células Vero durante 48 horas. Una vez más, el efecto citopático de las NRRPs fue claramente evidente en estas células inmortalizadas (Fig. 7A). Los efectos morfológicos de apoptosis celular y muerte inducidos por las NRRPs se compararon con los efectos citopáticos producidos por el tratamiento de las mismas células con VSV-GFP vivo, durante el mismo período de tiempo de 48 horas (Fig. 7B). Las células Vero tratadas solo con PBS continuaron siendo completamente viables, sin efectos citopáticos, y no mostraron fluorescencia (Fig. 7C).

### **Ejemplo 4: Las NRRPs son un tratamiento efectivo in vitro contra células leucémicas**

Se investigó si las células de leucemia aguda son susceptibles a la muerte celular mediada por NRRP usando NRRPs basadas en VSV generadas por el método que emplea radiación UV. En primer lugar, se determinó la citotoxicidad inducida en la línea celular L1210 y la observada en fibroblastos dérmicos humanos normales (HDF). Aunque ambas líneas celulares fueron susceptibles a la infección por el virus vivo, las NRRPs indujeron la muerte únicamente en las células leucémicas L1210 (Fig. 8A). En las células L1210 de leucemia aguda se observó el fenotipo apoptótico clásico, caracterizado por una reducción del diámetro de la célula, la apariencia de "encogida" con numerosos cuerpos apoptóticos y el contenido nuclear fragmentado. La citotoxicidad se cuantificó usando un ensayo estándar con resazurina en varias líneas celulares humanas y murinas. En estos experimentos, las leucemias agudas fueron altamente susceptibles a la muerte celular mediada por NRRP preservándose, al mismo tiempo, la viabilidad de las células normales (Fig. 8B). Resultados similares se determinaron usando las NRRPs basadas en Maraba, una cepa alternativa de Rhabdovirus (Fig. 3A y 3B). La ausencia de expresión genómica se confirmó por microscopía de fluorescencia (Fig. 8C).

El nivel de apoptosis en las líneas celulares L1210 se cuantificó mediante citometría de flujo. Treinta horas después del tratamiento, las NRRPs indujeron una extensa apoptosis (84% de la población) temprana/tardía (Fig. 9). Se ha demostrado que la apoptosis inducida por VSV se correlaciona directamente con el nivel presente de estrés del retículo endoplasmático (ER) (10). Curiosamente, cuando se destruye la capacidad de la célula de mitigar el estrés del ER, se puede inducir apoptosis inmunogénica (16). Las NRRPs inducen esta forma única de muerte celular como se describe más adelante.

En otros ejemplos, las células de leucemia L1210 fueron tratadas con las NRRPs en combinación con bendamustina 300 µM (Fig. 10); dexametasona 45 µM (Fig. 11); doxorubicina 0,025 µM (Fig. 12) o vincristina 0,0125 µM (Fig. 13) durante 72 horas. Las NRRPs han mostrado que por sí solas son capaces de inducir efectos citotóxicos de la manera habitual, sin embargo en combinación con los fármacos anteriores se observa un efecto citotóxico adicional y/o

sinérgico. Esto demuestra que cuando la terapia de NRRP se combina con otros agentes quimioterapéuticos/farmacológicos se produce un efecto de potenciación terapéutica que es único.

En aún otro ejemplo, se trataron células leucémicas mieloides K562 positivas para Ph con las NRRPs generadas por UV en combinación con idarrubicina 0,05  $\mu$ M (Fig. 14) durante 72 horas. Igualmente en este ejemplo, la línea celular de leucemia mieloides fue altamente susceptible a la muerte celular mediada por NRRP y se observó de nuevo un efecto de potenciación al usar esta clase de agente quimioterapéutico en combinación con las NRRPs. Estas observaciones indican que la terapia con NRRP puede verse de hecho aumentada por el uso de agentes terapéuticos adicionales. Esto representa una estrategia alternativa para tratar el cáncer, en particular para tratar las formas recalcitrantes de cáncer que pueden requerir este enfoque combinatorio único para obtener una mayor eficacia.

#### 10 Ejemplo 5: Modelado que representa la especificidad antitumoral de las NRRPs

El modelo usado para describir la especificidad de las NRRPs contra células con defectos en las rutas de señalización antivirales fue adaptado de nuestro trabajo anterior descrito en LeBoeuf et al. 2013 (Fig. 15A). Brevemente, este modelo está representado por un subconjunto de seis ecuaciones diferenciales ordinarias que describen la transición entre las poblaciones de células (UP, IP, AP y PP) en función de la concentración de las NRRPs (N) y el interferón (IFN) en el medio ambiente. Estas ecuaciones son:

$$\begin{aligned}\frac{dUP}{dt} &= -K_{VI} \times [N] \times [UP] - \left( \frac{-K_{IFN\ on}}{1 + \frac{[IFN]^2}{EC_{50}}} + K_{IFN\ on} \right) \times [UP] + K_{IFN\ off} \times [PP], \\ \frac{dIP}{dt} &= K_{VI} \times [N] \times [UP] - \left( \frac{-K_{IFN\ on}}{1 + \frac{[IFN]^2}{EC_{50}}} + K_{IFN\ on} \right) \times [IP] - \gamma_c \times [IP], \\ \frac{dAP}{dt} &= \left( \frac{-K_{IFN\ on}}{1 + \frac{[IFN]^2}{EC_{50}}} + K_{IFN\ on} \right) [IP] - K_{VC} \times [AP] - \gamma_c \times [AP], \\ \frac{dPP}{dt} &= \left( \frac{-K_{IFN\ on}}{1 + \frac{[IFN]^2}{EC_{50}}} + K_{IFN\ on} \right) [UP] + K_{VC} \times [AP] - K_{IFN\ off} \times [PP].\end{aligned}$$

20 Los parámetros usados en las ecuaciones anteriores representan la velocidad de internalización de NRRP ( $K_{NI}$ ), la velocidad de activación de la señalización de IFN ( $K_{IFN\ on}$ ), la tasa de inactivación de la señalización de IFN ( $K_{IFN\ off}$ ), la  $EC_{50}$  de IFN ( $EC_{50}$ ), la velocidad de muerte celular ( $\gamma_c$ ) y la velocidad de aclaramiento de las NRRPs ( $K_{NC}$ ).

El siguiente subconjunto de ecuaciones describe la dinámica de las NVRPs (N) y el interferón (IFN) según la cual:

$$\begin{aligned}\frac{dN}{dt} &= -K_{VI} \times [V] \times [UP] - \gamma_V \times [V], \\ \frac{dIFN}{dt} &= K_{IFN1} \times [IP] + K_{IFN2.1} \times [AP] + K_{IFN2.2} \times [PP] - \gamma_{IFN} \times IFN.\end{aligned}$$

25 Los parámetros descritos en las ecuaciones anteriores representan la velocidad de internalización NRRP ( $K_{NI}$ ), la degradación de NRRP ( $\gamma_N$ ), la producción de IFN a partir de IP, AP y PP ( $K_{IFN1}$ ,  $K_{IFN2.1}$  y  $K_{IFN2.2}$ , respectivamente) y la degradación de IFN ( $\gamma_{IFN}$ ).

30 Se realizó la simulación de Monte Carlo variando aleatoriamente los parámetros anteriores dentro de una ventana de 1 log (Tabla 2) alrededor al parámetro fisiológico derivado de la bibliografía y las pruebas experimentales (18). Las simulaciones se realizaron en Matlab usando ODE15s imponiendo una restricción de no-negatividad. Las tendencias descritas en la Fig. 15B representan el valor de la mediana de alrededor de 1000 simulaciones. El número de células usadas en estas simulaciones fue de 2,5E5, el volumen de los medios se fijó en 1 ml, y la relación de PFU a célula se fijó en 100 partículas por célula. En estas simulaciones, los defectos en las rutas de señalización de IFN fueron simulados disminuyendo los valores de  $K_{IFN1}$ ,  $K_{IFN2.1}$ ,  $K_{IFN2.2}$ ,  $K_{VC}$  y  $K_{IFN\ on}$  desde 100% a 1% de su valor original.

35 Para investigar el mecanismo por el cual se logra la especificidad contra las células tumorales, los autores de la presente descripción simularon la citotoxicidad inducida por las NRRPs en células normales y tumorales. Recientemente, los autores de la presente descripción desarrollaron un modelo basado en población que describe la relación entre la citotoxicidad y la dinámica de replicación de virus oncolíticos vivos en células normales y tumorales. 40 Según este modelo, un ciclo de infección comienza cuando población no infectada de células (UP) se encuentra con los viriones. Esto permite que la población UP se infecte, y, en el contexto del virus vivo, los viriones y las citocinas conocidas como interferones (IFN) se liberan al medio ambiente.

A medida que los IFN aumentan gradualmente, la población de células activa la señalización antiviral (AP), que con el tiempo permite que esta población aclare la infección viral y quede protegida contra daños posteriores (PP). Para adaptar este modelo a las NRRPs, los autores de la presente descripción eliminaron la dinámica de replicación del virus del modelo, y simularon la relación entre la citotoxicidad mediada por NRRP y la extensión de los defectos en las rutas de señalización de IFN, un proceso que se sabe se produce en ~80% de los cánceres. Estos defectos se simularon mediante la disminución de la velocidad de producción de IFN, la velocidad de activación de la señalización de IFN y la velocidad de aclaramiento de NRRP entre células tumorales y células normales. Para asegurarse de que esta observación es sistemática, se usó una plataforma de simulación de Monte-Carlo. En ella, todos los parámetros cinéticos se hicieron variar dentro de una ventana de 1 log alrededor de las estimaciones derivadas de la bibliografía o pruebas experimentales (Tabla 2).

Después de la simulación a través de 1000 parejas de parámetros aleatorios (Fig. 15B), los autores de la presente descripción determinaron que como las células cancerosas pierden su capacidad de señalización o respuesta a los IFN, estas células se vuelven más sensibles a la citotoxicidad mediada por NRRP. Para validar esta observación, los autores de la presente descripción investigaron el impacto de los IFN sobre la citotoxicidad mediada por NRRP en células normales (HDF) y leucémicas (L1210). Curiosamente, mientras que el IntronA (IFN recombinante) podía aumentar aún más la protección de las células normales contra el daño de las NRRPs (Fig. 15C), el IntronA no tuvo un impacto detectable sobre las células leucémicas (Fig. 15D).

Tabla 2: Lista de los parámetros estimados alrededor de las pruebas experimentales y pruebas de la bibliografía descritas por Le Boeuf et al. (2013)

Parámetro	Intervalo utilizado
$K_{VI}$	7,5E-5 a 7,5E-4 ( $V^{-1}h^{-1}$ )
$EC50$	0,25e-12 a 2,5e-12 (M)
$K_{IFN\ on}$	$\ln(2)/(0,2\ a\ 2,0)$ ( $h^{-1}$ )
$K_{IFN\ off}$	$\ln(2)/(5\ a\ 50)$ ( $h^{-1}$ )
$\gamma_c$	$\ln(2)/(2,5\ a\ 25)$ ( $h^{-1}$ )
$K_{VC}$	$\ln(2)/(0,25\ a\ 2,5)$ ( $h^{-1}$ )
$K_{IFN1}$	$K_{IFN2} \times 10$ a 100% (M/h)
$K_{IFN2.1}\&K_{IFN2.2}$	8,3e-18 a 8,3e-17 (M/célula/h) (es decir, 5000-50000 moléculas/célula/h)
$\gamma_{IFN}$	$\ln(2)/(5\ a\ 50)$ ( $h^{-1}$ )
$\gamma_N$	$\ln(2)/(2,5\ a\ 25)$ ( $h^{-1}$ )

**Ejemplo 6: Actividad de las NRRPs en la crisis blástica de AML**

Se investigó el potencial de traslación de la plataforma de NRRP en muestras clínicas. Se obtuvieron células mononucleares de sangre periférica de dos pacientes humanos con crisis blástica aguda de alta carga, y se puso a prueba la susceptibilidad a la muerte celular mediada por NRRP. Los pacientes tenían blastos circulantes con un fenotipo CD33 positivo. Ambos habían recibido previamente un exhaustivo tratamiento contra la leucemia mieloide crónica (CML) y desarrollaron resistencia al tratamiento con inhibidores de la tirosina cinasa (TKI). Las muestras de los pacientes, de forma similar a lo observado en los blastocitos L1210, desarrollaron una obvia apoptosis inducida por NRRP con la morfología clásica (Fig. 16A). La microscopía de fluorescencia confirmó la ausencia de la expresión genómica de las NRRPs (Fig. 16B). De hecho, después del tratamiento con NRRP, estas células leucémicas CD33+ fueron fuertemente teñidas por el marcador de apoptosis Anexina V (Fig. 16C). Se usaron muestras no cultivadas de pacientes para evaluar la especificidad de esta respuesta. De hecho, en ambos pacientes, la población de células leucémicas CD33+ predominante después del tratamiento con NRRP fue ablacionada, dejando las células normales como células dominantes en la muestra (Fig. 16D).

Para asegurarse que las NRRPs no afectan a los glóbulos blancos normales, se trataron células mononucleares de médula ósea aisladas de un donante sano con PBS o las NRRPs. En puntos temporales tempranos (18 horas) y tardíos (65 horas), las NRRPs no indujeron apoptosis dentro de estas muestras (Fig. 17A y 17B).

**Ejemplo 7: Actividad anti-leucémica de las NRRPs in vivo**

Se usó un modelo murino de crisis blástica leucémica para evaluar el potencial de las NRRPs como un agente terapéutico. En resumen, el primer día, los ratones DBA/2 se expusieron a una dosis de  $1 \times 10^6$  blastocitos L1210. Al día siguiente, los ratones comenzaron un régimen de  $3 \times 10^9$  NRRP administradas por vía intravenosa durante tres días consecutivos, y se monitorizó la supervivencia. En paralelo, cohortes separadas de ratones fueron tratadas con VSV vivo con una MTD de  $2 \times 10^6$  virus por inyección (19), o PBS bajo el mismo programa de tratamiento. Los ratones tratados con NRRP lograron una supervivencia del 80% hasta el día 40, lo que representa una ventaja significativa frente a los ratones tratados con PBS ( $P \leq 0,0045$ ) o virus vivo ( $P \leq 0,044$ ) (Fig. 18A). Las NRRPs fueron bien toleradas y se administraron a la dosis máxima factible para este experimento particular, lo que representaba una dosis 1500 veces más alta que la MTD de virus vivo. Dado que la leucemia aguda frecuentemente se disemina al sistema nervioso central, y que el VSV de tipo silvestre es altamente neurotóxico, se realizaron inyecciones intracraneales de las NRRPs y del virus vivo. Mientras que los ratones fueron capaces de tolerar la dosis de producción máxima para inyecciones intracraneales de  $1 \times 10^8$  partículas, todos los ratones sucumbieron rápidamente a una dosis de  $1 \times 10^4$  de virus vivo.

Estimulados por la eficacia y la MTD diferencial ofrecida por la terapia con NRRP, sería interesante saber si el sistema inmune se activa después del tratamiento. 20 horas después del tratamiento con PBS o NRRP se recolectó suero sanguíneo murino de ratones portadores de tumores de células L1210 (Fig. 18B). En este análisis, queda claro que tras el tratamiento con NRRP se inducen las citocinas que normalmente son conocidas por reclutar y diferenciar las células T. Ejemplos de tales citocinas inmunomoduladoras significativamente inducidas por el tratamiento con NRRP incluyen el factor LIF inhibidor de la leucemia, IL-2, IL-4, CCL-2, RANTES y MIP-1 $\alpha$  (Fig. 18B).

Para confirmar la estimulación del sistema inmunitario, en particular la activación de células T, los autores de la presente descripción adoptaron la estrategia vacunal ya descrita en publicaciones anteriores. Experimentalmente, esta plataforma consiste en inyectar células apoptóticas en animales inmunocompetentes y medir la inmunidad adaptativa protectora contra el desafío tumoral posterior. De hecho, las células L1210 tratadas con NRRP desarrollan una apoptosis marcada como puede verse en la Fig. 16C por el aumento de la tinción con anexina-V. Por ello, se adoptó este enfoque experimental clásico para examinar si las NRRPs eran capaces de desencadenar apoptosis inmunogénica.

Dos cohortes de ratones DBA/2 (singénicos con L1210) recibieron tres dosis intravenosas semanales de  $1 \times 10^6$  células L1210 irradiadas con radiación  $\gamma$  y pretratadas con NRRPs. Otra cohorte recibió el mismo número de células L1210 irradiadas con radiación  $\gamma$ . Después de una semana de este régimen, se administró un desafío con células L1210 leucémicas ( $1 \times 10^6$  células) a través de la vena de la cola, y se registró la supervivencia. La cohorte que recibió las células L1210 tratadas con NRRP presentaron un 80% de protección después del desafío leucémico, que fue de otro modo uniformemente letal en las cohortes no tratadas administradas con L1210 (Fig. 19). Los ratones supervivientes se mantuvieron durante  $> 150$  días para garantizar una protección prolongada. Esto es consistente con la noción de que las células de leucemia aguda tratadas con NRRP sufren apoptosis inmunogénica.

Usando líneas celulares de leucemia linfoblástica y mieloides aguda, así como células primarias de leucemia de pacientes con CML en crisis blástica aguda intensamente pretratados, se demuestra que las NRRPs son al menos agentes citolíticos específicos para la leucemia. A través de los experimentos in vitro e in vivo detallados anteriormente, se confirma que las NRRPs ofrecen una plataforma terapéutica multimodal.

**Ejemplo 8: Actividad de las NRRPs en líneas celulares de mieloma múltiple, cáncer cerebral y cáncer de colon**

Además de los experimentos detallados anteriormente, las NRRPs también mostraron ser citopáticas en líneas celulares de mieloma múltiple MCP-11 y RPMI-8226 (Fig. 20) cuando las líneas celulares fueron tratadas durante 15 horas con PBS o NRRPs derivadas de VSV. Específicamente, la Fig. 21 muestra la viabilidad celular después de un ensayo con resazurina o de citotoxicidad con azul Alamar para líneas celulares de mieloma, medida 72 horas después del tratamiento con las NRRPs administradas a una MOI = 250. En este experimento, SR4987 es una línea de células estromales de médula normal. Como se ve en la Fig. 21, SR4987 demostró resistencia a las NRRPs ya que es una célula no maligna. Cuando se generaron las NRRPs no se encontró replicación genómica de las NRRPs o VSV, ya que no se produjo GFP codificado por el virus (datos no presentados).

En otro ejemplo, la línea celular de mieloma múltiple MCP-11 fue tratada con melfalán 20  $\mu$ M (Fig. 22) o con el compuesto mimético de SMAC LCL161 15  $\mu$ M (Fig. 23) en combinación con las NRRPs. La terapia de combinación aumentó el efecto citopático de las NRRPs en ambos casos. La actividad sinérgica entre el compuesto mimético de SMAC y las NRRPs representa un enfoque prometedor. Se observa que la actividad antitumoral del compuesto mimético de SMAC aumenta significativamente, o en algunos casos es esencialmente dependiente de la coadministración de NRRP.

En aún otro ejemplo, la línea celular de mieloma múltiple RPMI-8226 fue tratada con carfilzomib 5 nM con efecto citotóxico potenciador (Fig. 24). Se demuestra que la coadministración de las NRRPs con un agente alquilante (por ejemplo, melfalán), un inhibidor del proteasoma (como carfilzomib) o un compuesto mimético de SMAC (tal como LCL161) representa una estrategia alternativa de tratamiento para diversos tipos de cáncer, y es particularmente prometedora en los cánceres de base hematopoyética, tal como el mieloma múltiple.

La utilidad de las NRRPs como una terapia anticancerosa se demuestra además por su efecto sobre líneas celulares de tumores cerebrales. Se determinó la citotoxicidad mediada por NRRP en la línea celular de glioblastoma CT2A, línea celular de glioblastoma de tumor cerebral tardío (DBT) (Fig. 25A), líneas celulares de astrocitoma K1491 (Fig. 25B) y K1492, y la línea celular de glioma de ratón (GL261) (Fig. 25C), en comparación con la de células normales HDNF, cuando estas células fueron tratadas durante 24 horas con PBS o NRRP (Fig. 26).

Además, en todavía otro ejemplo, la línea celular de glioblastoma CT2A fue tratada con 10  $\mu$ M del inhibidor de HDAC SAHA en combinación con las NRRPs y se observó un efecto citopático de potenciación en comparación con las NRRPs con PBS (Fig. 27). La inhibición de HDAC ha mostrado ser algo prometedora como un agente anticanceroso. Sin embargo, en combinación con las NRRPs se observó una actividad significativa, lo que representa un enfoque muy prometedor para el tratamiento de tumores malignos que abarcan a los glioblastomas, una necesidad clínica insatisfecha.

Las líneas celulares de cáncer renal (786-0) y de mama (4T1) son igualmente sensibles a los efectos citopáticos de las NRRPs (Figs. 28A, 28B, 28C). En esta serie de experimentos, las líneas celulares fueron tratadas con las NRRPs a una MOI = 250, y la viabilidad se cuantificó mediante ensayos con resazurina durante un período de 72 h. Ensayos de microscopía de fluorescencia realizados durante todo el experimento confirmaron la ausencia de expresión genómica.

En otro ejemplo, células subcutáneas de cáncer de colon CT26 se implantaron en ratones. Los ratones posteriormente fueron tratados con 2E9 NRRP en el día 16, 18 y 21 postimplantación del tumor (Fig. 29). A pesar de la gran carga tumoral que había antes del tratamiento con NRRP, cuando se administraron las NRRPs a través de rutas intratumoral o intravenosa se obtuvieron supervivencias prolongadas y curas. Los ratones tratados con PBS de control alcanzaron todos rápidamente el desenlace fatal. Este modelo representa la prueba adicional de que los tumores sólidos también pueden ser susceptibles a regímenes basados en NRRP.

Los ejemplos anteriores muestran a través de ensayos in silico e in vitro que las NRRPs, de forma análoga al virus vivo, son selectivas para tumores dado que explotan defectos en las rutas inmunitarias innatas que son comunes a la mayoría de los tumores. Sin embargo, el margen de seguridad ofrecido por la plataforma NRRP se ve ejemplificado por la observación de que la administración de un alto título de NRRP por vía intracraneal fue bien tolerada por los receptores murinos.

El desenlace para la mayoría de pacientes adultos que sufren de leucemia linfoblástica aguda o leucemia mieloide aguda sigue siendo desalentador. Para una minoría de los pacientes, el trasplante alogénico de células madre después del acondicionamiento mieloablativo es potencialmente curativo, sin embargo este procedimiento está asociado con frecuentes eventos adversos y una significativa mortalidad relacionada con el tratamiento. Para muchos pacientes con CML en fase crónica, la terapia dirigida con inhibidores de tirosina cinasa ofrece un control excelente de la enfermedad. Cuando se produce la progresión en crisis blástica aguda, existen opciones terapéuticas muy limitadas debido al desarrollo de resistencia a múltiples fármacos y la rápida cinética de esta forma de leucemia recalcitrante.

Las NRRPs exhiben tanto propiedades citolíticas directas como propiedades inmunogénicas en varios modelos murinos de leucemia aguda. Una forma peculiar de muerte celular programada involucra la inducción de una respuesta inmunitaria adaptativa contra la célula moribunda. Este proceso comúnmente conocido como apoptosis inmunogénica, es esencial para la eficacia de varios agentes quimioterapéuticos actuales y es necesaria para la defensa del huésped contra la infección viral incluyendo RV vivos. Los resultados in vivo anteriores indican que las NRRPs inducen un proceso similar y que son un factor determinante para la eficacia del tratamiento.

Más relevantes aún son las observaciones de que los mieloblastos primarios resistentes a múltiples fármacos de pacientes con crisis blásticas de CML son forzados a la apoptosis y son finalmente erradicados mediante el tratamiento con NRRP. Además, los glóbulos blancos no leucémicos procurados desde médula ósea sana no se vieron afectados de manera adversa. Esta observación sugiere que a pesar de la potente actividad tumoricida de las NRRPs, es posible evitar la leucopenia comúnmente observada después de la quimioterapia estándar de inducción y consolidación. Esto puede disminuir significativamente los eventos adversos relacionados con el tratamiento. Además, dado que las NRRPs preservan los glóbulos blancos normales durante la citorreducción leucémica, la mayoría de los pacientes que no son candidatos a altas dosis de la radio-quimioterapia seguida de trasplante alogénico de células madre pueden obtener simultáneamente la inducción de una respuesta inmunitaria anti-leucémica efectiva. Después de la inducción de apoptosis inmunogénica generada por NRRP, se liberan una amplia gama de citocinas inmunomoduladoras y probablemente ayuden al desarrollo de una actividad inmune adaptativa efectiva - un componente crítico para lograr respuestas curativas duraderas.

Los ejemplos demuestran la producción de NRRP con altos títulos. Las NRRPs albergan varias propiedades anticancerosas que se demuestran a través de la inducción de lisis celular principalmente a través de las rutas de muerte celular programada, y respuestas inmunitarias sistémicas e intratumorales, incluyendo la activación de células asesinas naturales así como la activación de células dendríticas, o el cierre de la vasculatura dentro del tumor. Estas características pueden ser explotadas usando las NRRPs solas o como un adyuvante en combinación con terapias de radiación, quimioterapias, inmunoterapias, cirugía, plataformas terapéuticas derivadas de virus oncolíticos u otras plataformas terapéuticas derivadas de virus.

En la descripción anterior, para los fines de explicación, se describen numerosos detalles con el fin de proporcionar una comprensión completa de los ejemplos. Sin embargo, será evidente para un experto en la técnica que estos detalles específicos no son necesarios.

5 Los ejemplos descritos anteriormente están destinados solo a servir de ejemplo. Los expertos en la técnica podrán efectuar alteraciones, modificaciones y variaciones a los ejemplos particulares sin apartarse del alcance, que se define únicamente por las reivindicaciones adjuntas a la presente.

Referencias

1. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100: 57-70.
2. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* 2011; 144: 646-674.
- 10 3. Liu BL, Robinson M, Han Z-, Branston RH, English C, Reay P, et al. ICP34.5 deleted herpes simplex virus with enhanced oncolytic, immune stimulating, and anti-tumour properties. *Gene Ther* 2003; 10: 292-303.
4. Senzer N, Bedell C, Nemunaitis J. OncoVEXGM-CSF. Armed oncolytic virus. *Drugs of the Future* 2010; 35: 449-455.
- 15 5. Park B-, Hwang T, Liu T-, Sze DY, Kim J-, Kwon H-, et al. Use of a targeted oncolytic poxvirus, JX-594, in patients with refractory primary or metastatic liver cancer: a phase I trial. *The Lancet Oncology* 2008; 9: 533-542.
6. Breitbach CJ, Thorne SH, Bell JC, Kim DH. Targeted and armed oncolytic poxviruses for cancer: The lead example of JX-594. *Curr Pharm Biotechnol* 2012; 13: 1768-1772.
7. Breitbach CJ, Burke J, Jonker D, Stephenson J, Haas AR, Chow LQM, et al. Intravenous delivery of a multi-mechanistic cancer-targeted oncolytic poxvirus in humans. *Nature* 2011; 477: 99-104.
- 20 8. Barber GN. VSV-tumor selective replication and protein translation. *Oncogene* 2005; 24: 7710-7719.
9. Stojdl DF, Lichty BD, TenOever BR, Paterson JM, Power AT, Knowles S, et al. VSV strains with defects in their ability to shutdown innate immunity are potent systemic anti-cancer agents. *Cancer Cell* 2003; 4: 263-275.
10. Mahoney DJ, Lefebvre C, Allan K, Brun J, Sanaei C, Baird S, et al. Virus-Tumor Interactome Screen Reveals ER Stress Response Can Reprogram Resistant Cancers for Oncolytic Virus-Triggered Caspase-2 Cell Death. *Cancer Cell* 2011; 20: 443-456.
- 25 11. Saloura V, Wang L-S, Fridlender ZG, Sun J, Cheng G, Kapoor V, et al. Evaluation of an attenuated vesicular stomatitis virus vector expressing interferon- $\beta$  for use in malignant pleural mesothelioma: Heterogeneity in interferon responsiveness defines potential efficacy. *Hum Gene Ther* 2010; 21: 51-64.
12. Brun J, McManus D, Lefebvre C, Hu K, Falls T, Atkins H, et al. Identification of genetically modified maraba virus as an oncolytic rhabdovirus. *Molecular Therapy* 2010; 18: 1440-1449.
- 30 13. Willmon CL, Saloura V, Fridlender ZG, Wongthida P, Diaz RM, Thompson J, et al. Expression of IFN- $\beta$  enhances both efficacy and safety of oncolytic vesicular stomatitis virus for therapy of mesothelioma. *Cancer Res* 2009; 69: 7713-7720.
14. Galivo F, Diaz RM, Wongthida P, Thompson J, Kottke T, Barber G, et al. Single-cycle viral gene expression, rather than progressive replication and oncolysis, is required for VSV therapy of B16 melanoma. *Gene Ther* 2010; 17: 158-170.
- 35 15. Swarna Bais, Eric Bartee, Masmudur M. Rahman, Grant McFadden, Christopher R. Cogle. Oncolytic Virotherapy for Hematological Malignancies. *Advances in Virology* 2012; 8.
16. Zitvogel L, Kepp O, Senovilla L, Menger L, Chaput N, Kroemer G. Immunogenic tumor cell death for optimal anticancer therapy: The calreticulin exposure pathway. *Clinical Cancer Research* 2010; 16: 3100-3104.
- 40 17. Ebert O, Harbaran S, Shinozaki K, Woo SLC. Systemic therapy of experimental breast cancer metastases by mutant vesicular stomatitis virus in immune-competent mice. *Cancer Gene Ther* 2005; 12: 350-358.
18. Finke J, Nagler A. Viewpoint: What is the role of allogeneic haematopoietic cell transplantation in the era of reduced-intensity conditioning - Is there still an upper age limit? A focus on myeloid neoplasia. *Leukemia* 2007; 21: 1357-1362.
- 45 19. Daenen S, Van Der Holt B, Dekker AW, Willemze R, Rijnveld AW, Biemond BJ, et al. Intensive chemotherapy to improve outcome in patients with acute lymphoblastic leukemia over the age of 40: A phase II study for efficacy and feasibility by HOVON. *Leukemia* 2012; 26: 1726-1729.

20. Giles FJ, O'Dwyer M, Swords R. Class effects of tyrosine kinase inhibitors in the treatment of chronic myeloid leukemia. *Leukemia* 2009; 23: 1698-1707.

21. Hehlmann R. How I treat CML blast crisis. *Blood* 2012; 120: 737-747.

Listado de secuencias

- 5 <110> Ottawa Hospital Research Institute  
<120> PARTÍCULAS NO REPLICANTES DERIVADAS DE VIRUS, Y SUS USOS  
<130> PAT 7335W-90  
<150> US 61/740,856  
< 151> 2012-12-21
- 10 <150> US 61/835,310  
< 151> 2013-06-14  
<160> 5  
<170> PatentIn version 3.5  
<210> 1
- 15 < 211> 495  
< 212> PRT  
< 213> Virus de la estomatitis vesicular  
<300>  
< 308> NCBI NP\_955548
- 20 < 309> 2000-12-05  
< 313> (1)..(495)  
<400> 1

ES 2 745 599 T3

Lys Phe Thr Ile Val Phe Pro His Asn Gln Lys Gly Asn Trp Lys Asn  
 1 5 10 15

Val Pro Ser Asn Tyr His Tyr Cys Pro Ser Ser Ser Asp Leu Asn Trp  
 20 25 30

His Asn Asp Leu Ile Gly Thr Ala Ile Gln Val Lys Met Pro Lys Ser  
 35 40 45

His Lys Ala Ile Gln Ala Asp Gly Trp Met Cys His Ala Ser Lys Trp  
 50 55 60

Val Thr Thr Cys Asp Phe Arg Trp Tyr Gly Pro Lys Tyr Ile Thr Gln  
 65 70 75 80

Ser Ile Arg Ser Phe Thr Pro Ser Val Glu Gln Cys Lys Glu Ser Ile  
 85 90 95

Glu Gln Thr Lys Gln Gly Thr Trp Leu Asn Pro Gly Phe Pro Pro Gln  
 100 105 110

Ser Cys Gly Tyr Ala Thr Val Thr Asp Ala Glu Ala Val Ile Val Gln  
 115 120 125

Val Thr Pro His His Val Leu Val Asp Glu Tyr Thr Gly Glu Trp Val

ES 2 745 599 T3

130						135										140
Asp	Ser	Gln	Phe	Ile	Asn	Gly	Lys	Cys	Ser	Asn	Tyr	Ile	Cys	Pro	Thr	
145					150					155					160	
Val	His	Asn	Ser	Thr	Thr	Trp	His	Ser	Asp	Tyr	Lys	Val	Lys	Gly	Leu	
				165					170					175		
Cys	Asp	Ser	Asn	Leu	Ile	Ser	Met	Asp	Ile	Thr	Phe	Phe	Ser	Glu	Asp	
			180					185					190			
Gly	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Gly	Lys	Glu	Gly	Thr	Gly	Phe	Arg	Ser	Asn	
		195					200						205			
Tyr	Phe	Ala	Tyr	Glu	Thr	Gly	Gly	Lys	Ala	Cys	Lys	Met	Gln	Tyr	Cys	
	210					215						220				
Lys	His	Trp	Gly	Val	Arg	Leu	Pro	Ser	Gly	Val	Trp	Phe	Glu	Met	Ala	
225					230						235				240	
Asp	Lys	Asp	Leu	Phe	Ala	Ala	Ala	Arg	Phe	Pro	Glu	Cys	Pro	Glu	Gly	
				245					250						255	
Ser	Ser	Ile	Ser	Ala	Pro	Ser	Gln	Thr	Ser	Val	Asp	Val	Ser	Leu	Ile	
			260					265						270		
Gln	Asp	Val	Glu	Arg	Ile	Leu	Asp	Tyr	Ser	Leu	Cys	Gln	Glu	Thr	Trp	
		275					280						285			
Ser	Lys	Ile	Arg	Ala	Gly	Leu	Pro	Ile	Ser	Pro	Val	Asp	Leu	Ser	Tyr	
	290					295					300					
Leu	Ala	Pro	Lys	Asn	Pro	Gly	Thr	Gly	Pro	Ala	Phe	Thr	Ile	Ile	Asn	
305					310					315					320	
Gly	Thr	Leu	Lys	Tyr	Phe	Glu	Thr	Arg	Tyr	Ile	Arg	Val	Asp	Ile	Ala	
				325					330					335		
Ala	Pro	Ile	Leu	Ser	Arg	Met	Val	Gly	Met	Ile	Ser	Gly	Thr	Thr	Thr	
			340					345						350		
Glu	Arg	Glu	Leu	Trp	Asp	Asp	Trp	Ala	Pro	Tyr	Glu	Asp	Val	Glu	Ile	
		355					360					365				
Gly	Pro	Asn	Gly	Val	Leu	Arg	Thr	Ser	Ser	Gly	Tyr	Lys	Phe	Pro	Leu	
	370					375						380				

ES 2 745 599 T3

Tyr Met Ile Gly His Gly Met Leu Asp Ser Asp Leu His Leu Ser Ser  
385 390 395 400

Lys Ala Gln Val Phe Glu His Pro His Ile Gln Asp Ala Ala Ser Gln  
405 410 415

Leu Pro Asp Asp Glu Ser Leu Phe Phe Gly Asp Thr Gly Leu Ser Lys  
420 425 430

Asn Pro Ile Glu Leu Val Glu Gly Trp Phe Ser Ser Trp Lys Ser Ser  
435 440 445

Ile Ala Ser Phe Phe Phe Ile Ile Gly Leu Ile Ile Gly Leu Phe Leu  
450 455 460

Val Leu Arg Val Gly Ile His Leu Cys Ile Lys Leu Lys His Thr Lys  
465 470 475 480

Lys Arg Gln Ile Tyr Thr Asp Ile Glu Met Asn Arg Leu Gly Lys  
485 490 495

<210> 2

< 211> 422

< 212> PRT

5 < 213> Virus de la estomatitis vesicular

<300>

< 308> NCBI NP\_041712

< 309> 2000-12-05

< 313> (1)..(422)

10 <400> 2

Met Ser Val Thr Val Lys Arg Ile Ile Asp Asn Thr Val Ile Val Pro  
1 5 10 15

Lys Leu Pro Ala Asn Glu Asp Pro Val Glu Tyr Pro Ala Asp Tyr Phe  
20 25 30

Arg Lys Ser Lys Glu Ile Pro Leu Tyr Ile Asn Thr Thr Lys Ser Leu  
35 40 45

Ser Asp Leu Arg Gly Tyr Val Tyr Gln Gly Leu Lys Ser Gly Asn Val  
50 55 60

Ser Ile Ile His Val Asn Ser Tyr Leu Tyr Gly Ala Leu Lys Asp Ile  
65 70 75 80

Arg Gly Lys Leu Asp Lys Asp Trp Ser Ser Phe Gly Ile Asn Ile Gly  
85 90 95

ES 2 745 599 T3

Lys Ala Gly Asp Thr Ile Gly Ile Phe Asp Leu Val Ser Leu Lys Ala  
 100 105 110  
 Leu Asp Gly Val Leu Pro Asp Gly Val Ser Asp Ala Ser Arg Thr Ser  
 115 120 125  
 Ala Asp Asp Lys Trp Leu Pro Leu Tyr Leu Leu Gly Leu Tyr Arg Val  
 130 135 140  
 Gly Arg Thr Gln Met Pro Glu Tyr Arg Lys Lys Leu Met Asp Gly Leu  
 145 150 155 160  
 Thr Asn Gln Cys Lys Met Ile Asn Glu Gln Phe Glu Pro Leu Val Pro  
 165 170 175  
 Glu Gly Arg Asp Ile Phe Asp Val Trp Gly Asn Asp Ser Asn Tyr Thr  
 180 185 190  
 Lys Ile Val Ala Ala Val Asp Met Phe Phe His Met Phe Lys Lys His  
 195 200 205  
 Glu Cys Ala Ser Phe Arg Tyr Gly Thr Ile Val Ser Arg Phe Lys Asp  
 210 215 220  
 Cys Ala Ala Leu Ala Thr Phe Gly His Leu Cys Lys Ile Thr Gly Met  
 225 230 235 240  
 Ser Thr Glu Asp Val Thr Thr Trp Ile Leu Asn Arg Glu Val Ala Asp  
 245 250 255  
 Glu Met Val Gln Met Met Leu Pro Gly Gln Glu Ile Asp Lys Ala Asp  
 260 265 270  
 Ser Tyr Met Pro Tyr Leu Ile Asp Phe Gly Leu Ser Ser Lys Ser Pro  
 275 280 285  
 Tyr Ser Ser Val Lys Asn Pro Ala Phe His Phe Trp Gly Gln Leu Thr  
 290 295 300  
 Ala Leu Leu Leu Arg Ser Thr Arg Ala Arg Asn Ala Arg Gln Pro Asp  
 305 310 315 320  
 Asp Ile Glu Tyr Thr Ser Leu Thr Thr Ala Gly Leu Leu Tyr Ala Tyr  
 325 330 335  
 Ala Val Gly Ser Ser Ala Asp Leu Ala Gln Gln Phe Cys Val Gly Asp  
 340 345 350

ES 2 745 599 T3

Asn Lys Tyr Thr Pro Asp Asp Ser Thr Gly Gly Leu Thr Thr Asn Ala  
 355 360 365

Pro Pro Gln Gly Arg Asp Val Val Glu Trp Leu Gly Trp Phe Glu Asp  
 370 375 380

Gln Asn Arg Lys Pro Thr Pro Asp Met Met Gln Tyr Ala Lys Arg Ala  
 385 390 395 400

Val Met Ser Leu Gln Gly Leu Arg Glu Lys Thr Ile Gly Lys Tyr Ala  
 405 410 415

Lys Ser Glu Phe Asp Lys  
 420

<210> 3

< 211> 265

< 212> PRT

5 < 213> Virus de la estomatitis vesicular

<300>

< 308> NCBI NP\_041713

< 309> 2000-12-05

< 313> (1)..(265)

10 <400> 3

Met Asp Asn Leu Thr Lys Val Arg Glu Tyr Leu Lys Ser Tyr Ser Arg  
 1 5 10 15

Leu Asp Gln Ala Val Gly Glu Ile Asp Glu Ile Glu Ala Gln Arg Ala  
 20 25 30

Glu Lys Ser Asn Tyr Glu Leu Phe Gln Glu Asp Gly Val Glu Glu His  
 35 40 45

Thr Lys Pro Ser Tyr Phe Gln Ala Ala Asp Asp Ser Asp Thr Glu Ser  
 50 55 60

Glu Pro Glu Ile Glu Asp Asn Gln Gly Leu Tyr Ala Gln Asp Pro Glu  
 65 70 75 80

Ala Glu Gln Val Glu Gly Phe Ile Gln Gly Pro Leu Asp Asp Tyr Ala  
 85 90 95

Asp Glu Glu Val Asp Val Val Phe Thr Ser Asp Trp Lys Pro Pro Glu  
 100 105 110

Leu Glu Ser Asp Glu His Gly Lys Thr Leu Arg Leu Thr Ser Pro Glu

ES 2 745 599 T3

115 120 125

Gly Leu Ser Gly Glu Gln Lys Ser Gln Trp Leu Ser Thr Ile Lys Ala  
130 135 140

Val Val Gln Ser Ala Lys Tyr Trp Asn Leu Ala Glu Cys Thr Phe Glu  
145 150 155 160

Ala Ser Gly Glu Gly Val Ile Met Lys Glu Arg Gln Ile Thr Pro Asp  
165 170 175

Val Tyr Lys Val Thr Pro Val Met Asn Thr His Pro Ser Gln Ser Glu  
180 185 190

Ala Val Ser Asp Val Trp Ser Leu Ser Lys Thr Ser Met Thr Phe Gln  
195 200 205

Pro Lys Lys Ala Ser Leu Gln Pro Leu Thr Ile Ser Leu Asp Glu Leu  
210 215 220

Phe Ser Ser Arg Gly Glu Phe Ile Ser Val Gly Gly Asp Gly Arg Met  
225 230 235 240

Ser His Lys Glu Ala Ile Leu Leu Gly Leu Arg Tyr Lys Lys Leu Tyr  
245 250 255

Asn Gln Ala Arg Val Lys Tyr Ser Leu  
260 265

<210> 4

< 211> 229

< 212> PRT

5 < 213> Virus de la estomatitis vesicular

<300>

< 308> NCBI NP\_041714.1

< 309> 2000-12-05

< 313> (1)..(229)

10 <400> 4

Met Ser Ser Leu Lys Lys Ile Leu Gly Leu Lys Gly Lys Gly Lys Lys  
1 5 10 15

Ser Lys Lys Leu Gly Ile Ala Pro Pro Pro Tyr Glu Glu Asp Thr Ser  
20 25 30

Met Glu Tyr Ala Pro Ser Ala Pro Ile Asp Lys Ser Tyr Phe Gly Val  
35 40 45

ES 2 745 599 T3

Asp Glu Met Asp Thr Tyr Asp Pro Asn Gln Leu Arg Tyr Glu Lys Phe  
50 55 60

Phe Phe Thr Val Lys Met Thr Val Arg Ser Asn Arg Pro Phe Arg Thr  
65 70 75 80

Tyr Ser Asp Val Ala Ala Ala Val Ser His Trp Asp His Met Tyr Ile  
85 90 95

Gly Met Ala Gly Lys Arg Pro Phe Tyr Lys Ile Leu Ala Phe Leu Gly  
100 105 110

Ser Ser Asn Leu Lys Ala Thr Pro Ala Val Leu Ala Asp Gln Gly Gln  
115 120 125

Pro Glu Tyr His Thr His Cys Glu Gly Arg Ala Tyr Leu Pro His Arg  
130 135 140

Met Gly Lys Thr Pro Pro Met Leu Asn Val Pro Glu His Phe Arg Arg  
145 150 155 160

Pro Phe Asn Ile Gly Leu Tyr Lys Gly Thr Ile Glu Leu Thr Met Thr  
165 170 175

Ile Tyr Asp Asp Glu Ser Leu Glu Ala Ala Pro Met Ile Trp Asp His  
180 185 190

Phe Asn Ser Ser Lys Phe Ser Asp Phe Arg Glu Lys Ala Leu Met Phe  
195 200 205

Gly Leu Ile Val Glu Lys Lys Ala Ser Gly Ala Trp Val Leu Asp Ser  
210 215 220

Ile Ser His Phe Lys  
225

<210> 5

< 211> 2109

< 212> PRT

5 < 213> Virus de la estomatitis vesicular

<300>

< 308> NCBI NC\_041716.1

< 309> 2000-12-05

< 313> (1)..(2109)

10 <400> 5

Met Glu Val His Asp Phe Glu Thr Asp Glu Phe Asn Asp Phe Asn Glu  
1 5 10 15

ES 2 745 599 T3

Asp Asp Tyr Ala Thr Arg Glu Phe Leu Asn Pro Asp Glu Arg Met Thr  
 20 25 30  
 Tyr Leu Asn His Ala Asp Tyr Asn Leu Asn Ser Pro Leu Ile Ser Asp  
 35 40 45  
 Asp Ile Asp Asn Leu Ile Arg Lys Phe Asn Ser Leu Pro Ile Pro Ser  
 50 55 60  
 Met Trp Asp Ser Lys Asn Trp Asp Gly Val Leu Glu Met Leu Thr Ser  
 65 70 75 80  
 Cys Gln Ala Asn Pro Ile Ser Thr Ser Gln Met His Lys Trp Met Gly  
 85 90 95  
 Ser Trp Leu Met Ser Asp Asn His Asp Ala Ser Gln Gly Tyr Ser Phe  
 100 105 110  
 Leu His Glu Val Asp Lys Glu Ala Glu Ile Thr Phe Asp Val Val Glu  
 115 120 125  
 Thr Phe Ile Arg Gly Trp Gly Asn Lys Pro Ile Glu Tyr Ile Lys Lys  
 130 135 140  
 Glu Arg Trp Thr Asp Ser Phe Lys Ile Leu Ala Tyr Leu Cys Gln Lys  
 145 150 155 160  
 Phe Leu Asp Leu His Lys Leu Thr Leu Ile Leu Asn Ala Val Ser Glu  
 165 170 175  
 Val Glu Leu Leu Asn Leu Ala Arg Thr Phe Lys Gly Lys Val Arg Arg  
 180 185 190  
 Ser Ser His Gly Thr Asn Ile Cys Arg Ile Arg Val Pro Ser Leu Gly  
 195 200 205  
 Pro Thr Phe Ile Ser Glu Gly Trp Ala Tyr Phe Lys Lys Leu Asp Ile  
 210 215 220  
 Leu Met Asp Arg Asn Phe Leu Leu Met Val Lys Asp Val Ile Ile Gly  
 225 230 235 240  
 Arg Met Gln Thr Val Leu Ser Met Val Cys Arg Ile Asp Asn Leu Phe  
 245 250 255  
 Ser Glu Gln Asp Ile Phe Ser Leu Leu Asn Ile Tyr Arg Ile Gly Asp  
 260 265 270

ES 2 745 599 T3

Lys Ile Val Glu Arg Gln Gly Asn Phe Ser Tyr Asp Leu Ile Lys Met  
 275 280 285

Val Glu Pro Ile Cys Asn Leu Lys Leu Met Lys Leu Ala Arg Glu Ser  
 290 295 300

Arg Pro Leu Val Pro Gln Phe Pro His Phe Glu Asn His Ile Lys Thr  
 305 310 315 320

Ser Val Asp Glu Gly Ala Lys Ile Asp Arg Gly Ile Arg Phe Leu His  
 325 330 335

Asp Gln Ile Met Ser Val Lys Thr Val Asp Leu Thr Leu Val Ile Tyr  
 340 345 350

Gly Ser Phe Arg His Trp Gly His Pro Phe Ile Asp Tyr Tyr Thr Gly  
 355 360 365

Leu Glu Lys Leu His Ser Gln Val Thr Met Lys Lys Asp Ile Asp Val  
 370 375 380

Ser Tyr Ala Lys Ala Leu Ala Ser Asp Leu Ala Arg Ile Val Leu Phe  
 385 390 395 400

Gln Gln Phe Asn Asp His Lys Lys Trp Phe Val Asn Gly Asp Leu Leu  
 405 410 415

Pro His Asp His Pro Phe Lys Ser His Val Lys Glu Asn Thr Trp Pro  
 420 425 430

Thr Ala Ala Gln Val Gln Asp Phe Gly Asp Lys Trp His Glu Leu Pro  
 435 440 445

Leu Ile Lys Cys Phe Glu Ile Pro Asp Leu Leu Asp Pro Ser Ile Ile  
 450 455 460

Tyr Ser Asp Lys Ser His Ser Met Asn Arg Ser Glu Val Leu Lys His  
 465 470 475 480

Val Arg Met Asn Pro Asn Thr Pro Ile Pro Ser Lys Lys Val Leu Gln  
 485 490 495

Thr Met Leu Asp Thr Lys Ala Thr Asn Trp Lys Glu Phe Leu Lys Glu  
 500 505 510

Ile Asp Glu Lys Gly Leu Asp Asp Asp Asp Leu Ile Ile Gly Leu Lys

ES 2 745 599 T3

515 520 525

Gly Lys Glu Arg Glu Leu Lys Leu Ala Gly Arg Phe Phe Ser Leu Met  
530 535 540

Ser Trp Lys Leu Arg Glu Tyr Phe Val Ile Thr Glu Tyr Leu Ile Lys  
545 550 555 560

Thr His Phe Val Pro Met Phe Lys Gly Leu Thr Met Ala Asp Asp Leu  
565 570 575

Thr Ala Val Ile Lys Lys Met Leu Asp Ser Ser Ser Gly Gln Gly Leu  
580 585 590

Lys Ser Tyr Glu Ala Ile Cys Ile Ala Asn His Ile Asp Tyr Glu Lys  
595 600 605

Trp Asn Asn His Gln Arg Lys Leu Ser Asn Gly Pro Val Phe Arg Val  
610 615 620

Met Gly Gln Phe Leu Gly Tyr Pro Ser Leu Ile Glu Arg Thr His Glu  
625 630 635 640

Phe Phe Glu Lys Ser Leu Ile Tyr Tyr Asn Gly Arg Pro Asp Leu Met  
645 650 655

Arg Val His Asn Asn Thr Leu Ile Asn Ser Thr Ser Gln Arg Val Cys  
660 665 670

Trp Gln Gly Gln Glu Gly Gly Leu Glu Gly Leu Arg Gln Lys Gly Trp  
675 680 685

Thr Ile Leu Asn Leu Leu Val Ile Gln Arg Glu Ala Lys Ile Arg Asn  
690 695 700

Thr Ala Val Lys Val Leu Ala Gln Gly Asp Asn Gln Val Ile Cys Thr  
705 710 715 720

Gln Tyr Lys Thr Lys Lys Ser Arg Asn Val Val Glu Leu Gln Gly Ala  
725 730 735

Leu Asn Gln Met Val Ser Asn Asn Glu Lys Ile Met Thr Ala Ile Lys  
740 745 750

Ile Gly Thr Gly Lys Leu Gly Leu Leu Ile Asn Asp Asp Glu Thr Met  
755 760 765

ES 2 745 599 T3

Gln Ser Ala Asp Tyr Leu Asn Tyr Gly Lys Ile Pro Ile Phe Arg Gly  
770 775 780

Val Ile Arg Gly Leu Glu Thr Lys Arg Trp Ser Arg Val Thr Cys Val  
785 790 795 800

Thr Asn Asp Gln Ile Pro Thr Cys Ala Asn Ile Met Ser Ser Val Ser  
805 810 815

Thr Asn Ala Leu Thr Val Ala His Phe Ala Glu Asn Pro Ile Asn Ala  
820 825 830

Met Ile Gln Tyr Asn Tyr Phe Gly Thr Phe Ala Arg Leu Leu Leu Met  
835 840 845

Met His Asp Pro Ala Leu Arg Gln Ser Leu Tyr Glu Val Gln Asp Lys  
850 855 860

Ile Pro Gly Leu His Ser Ser Thr Phe Lys Tyr Ala Met Leu Tyr Leu  
865 870 875 880

Asp Pro Ser Ile Gly Gly Val Ser Gly Met Ser Leu Ser Arg Phe Leu  
885 890 895

Ile Arg Ala Phe Pro Asp Pro Val Thr Glu Ser Leu Ser Phe Trp Arg  
900 905 910

Phe Ile His Val His Ala Arg Ser Glu His Leu Lys Glu Met Ser Ala  
915 920 925

Val Phe Gly Asn Pro Glu Ile Ala Lys Phe Arg Ile Thr His Ile Asp  
930 935 940

Lys Leu Val Glu Asp Pro Thr Ser Leu Asn Ile Ala Met Gly Met Ser  
945 950 955 960

Pro Ala Asn Leu Leu Lys Thr Glu Val Lys Lys Cys Leu Ile Glu Ser  
965 970 975

Arg Gln Thr Ile Arg Asn Gln Val Ile Lys Asp Ala Thr Ile Tyr Leu  
980 985 990

Tyr His Glu Glu Asp Arg Leu Arg Ser Phe Leu Trp Ser Ile Asn Pro  
995 1000 1005

Leu Phe Pro Arg Phe Leu Ser Glu Phe Lys Ser Gly Thr Phe Leu  
1010 1015 1020

ES 2 745 599 T3

Gly Val Ala Asp Gly Leu Ile Ser Leu Phe Gln Asn Ser Arg Thr  
 1025 1030 1035

Ile Arg Asn Ser Phe Lys Lys Lys Tyr His Arg Glu Leu Asp Asp  
 1040 1045 1050

Leu Ile Val Arg Ser Glu Val Ser Ser Leu Thr His Leu Gly Lys  
 1055 1060 1065

Leu His Leu Arg Arg Gly Ser Cys Lys Met Trp Thr Cys Ser Ala  
 1070 1075 1080

Thr His Ala Asp Thr Leu Arg Tyr Lys Ser Trp Gly Arg Thr Val  
 1085 1090 1095

Ile Gly Thr Thr Val Pro His Pro Leu Glu Met Leu Gly Pro Gln  
 1100 1105 1110

His Arg Lys Glu Thr Pro Cys Ala Pro Cys Asn Thr Ser Gly Phe  
 1115 1120 1125

Asn Tyr Val Ser Val His Cys Pro Asp Gly Ile His Asp Val Phe  
 1130 1135 1140

Ser Ser Arg Gly Pro Leu Pro Ala Tyr Leu Gly Ser Lys Thr Ser  
 1145 1150 1155

Glu Ser Thr Ser Ile Leu Gln Pro Trp Glu Arg Glu Ser Lys Val  
 1160 1165 1170

Pro Leu Ile Lys Arg Ala Thr Arg Leu Arg Asp Ala Ile Ser Trp  
 1175 1180 1185

Phe Val Glu Pro Asp Ser Lys Leu Ala Met Thr Ile Leu Ser Asn  
 1190 1195 1200

Ile His Ser Leu Thr Gly Glu Glu Trp Thr Lys Arg Gln His Gly  
 1205 1210 1215

Phe Lys Arg Thr Gly Ser Ala Leu His Arg Phe Ser Thr Ser Arg  
 1220 1225 1230

Met Ser His Gly Gly Phe Ala Ser Gln Ser Thr Ala Ala Leu Thr  
 1235 1240 1245

Arg Leu Met Ala Thr Thr Asp Thr Met Arg Asp Leu Gly Asp Gln  
 1250 1255 1260

ES 2 745 599 T3

Asn Phe Asp Phe Leu Phe Gln Ala Thr Leu Leu Tyr Ala Gln Ile  
 1265 1270 1275  
 Thr Thr Thr Val Ala Arg Asp Gly Trp Ile Thr Ser Cys Thr Asp  
 1280 1285 1290  
 His Tyr His Ile Ala Cys Lys Ser Cys Leu Arg Pro Ile Glu Glu  
 1295 1300 1305  
 Ile Thr Leu Asp Ser Ser Met Asp Tyr Thr Pro Pro Asp Val Ser  
 1310 1315 1320  
 His Val Leu Lys Thr Trp Arg Asn Gly Glu Gly Ser Trp Gly Gln  
 1325 1330 1335  
 Glu Ile Lys Gln Ile Tyr Pro Leu Glu Gly Asn Trp Lys Asn Leu  
 1340 1345 1350  
 Ala Pro Ala Glu Gln Ser Tyr Gln Val Gly Arg Cys Ile Gly Phe  
 1355 1360 1365  
 Leu Tyr Gly Asp Leu Ala Tyr Arg Lys Ser Thr His Ala Glu Asp  
 1370 1375 1380  
 Ser Ser Leu Phe Pro Leu Ser Ile Gln Gly Arg Ile Arg Gly Arg  
 1385 1390 1395  
 Gly Phe Leu Lys Gly Leu Leu Asp Gly Leu Met Arg Ala Ser Cys  
 1400 1405 1410  
 Cys Gln Val Ile His Arg Arg Ser Leu Ala His Leu Lys Arg Pro  
 1415 1420 1425  
 Ala Asn Ala Val Tyr Gly Gly Leu Ile Tyr Leu Ile Asp Lys Leu  
 1430 1435 1440  
 Ser Val Ser Pro Pro Phe Leu Ser Leu Thr Arg Ser Gly Pro Ile  
 1445 1450 1455  
 Arg Asp Glu Leu Glu Thr Ile Pro His Lys Ile Pro Thr Ser Tyr  
 1460 1465 1470  
 Pro Thr Ser Asn Arg Asp Met Gly Val Ile Val Arg Asn Tyr Phe  
 1475 1480 1485  
 Lys Tyr Gln Cys Arg Leu Ile Glu Lys Gly Lys Tyr Arg Ser His



ES 2 745 599 T3

Cys Trp Glu Tyr Pro Ser Asp Leu Cys Asp Pro Arg Thr Trp Asp  
 1730 1735 1740  
 Tyr Phe Leu Arg Leu Lys Ala Gly Leu Gly Leu Gln Ile Asp Leu  
 1745 1750 1755  
 Ile Val Met Asp Met Glu Val Arg Asp Ser Ser Thr Ser Leu Lys  
 1760 1765 1770  
 Ile Glu Thr Asn Val Arg Asn Tyr Val His Arg Ile Leu Asp Glu  
 1775 1780 1785  
 Gln Gly Val Leu Ile Tyr Lys Thr Tyr Gly Thr Tyr Ile Cys Glu  
 1790 1795 1800  
 Ser Glu Lys Asn Ala Val Thr Ile Leu Gly Pro Met Phe Lys Thr  
 1805 1810 1815  
 Val Asp Leu Val Gln Thr Glu Phe Ser Ser Ser Gln Thr Ser Glu  
 1820 1825 1830  
 Val Tyr Met Val Cys Lys Gly Leu Lys Lys Leu Ile Asp Glu Pro  
 1835 1840 1845  
 Asn Pro Asp Trp Ser Ser Ile Asn Glu Ser Trp Lys Asn Leu Tyr  
 1850 1855 1860  
 Ala Phe Gln Ser Ser Glu Gln Glu Phe Ala Arg Ala Lys Lys Val  
 1865 1870 1875  
 Ser Thr Tyr Phe Thr Leu Thr Gly Ile Pro Ser Gln Phe Ile Pro  
 1880 1885 1890  
 Asp Pro Phe Val Asn Ile Glu Thr Met Leu Gln Ile Phe Gly Val  
 1895 1900 1905  
 Pro Thr Gly Val Ser His Ala Ala Ala Leu Lys Ser Ser Asp Arg  
 1910 1915 1920  
 Pro Ala Asp Leu Leu Thr Ile Ser Leu Phe Tyr Met Ala Ile Ile  
 1925 1930 1935  
 Ser Tyr Tyr Asn Ile Asn His Ile Arg Val Gly Pro Ile Pro Pro  
 1940 1945 1950  
 Asn Pro Pro Ser Asp Gly Ile Ala Gln Asn Val Gly Ile Ala Ile  
 1955 1960 1965

ES 2 745 599 T3

Thr Gly Ile Ser Phe Trp Leu Ser Leu Met Glu Lys Asp Ile Pro  
 1970 1975 1980

Leu Tyr Gln Gln Cys Leu Ala Val Ile Gln Gln Ser Phe Pro Ile  
 1985 1990 1995

Arg Trp Glu Ala Val Ser Val Lys Gly Gly Tyr Lys Gln Lys Trp  
 2000 2005 2010

Ser Thr Arg Gly Asp Gly Leu Pro Lys Asp Thr Arg Thr Ser Asp  
 2015 2020 2025

Ser Leu Ala Pro Ile Gly Asn Trp Ile Arg Ser Leu Glu Leu Val  
 2030 2035 2040

Arg Asn Gln Val Arg Leu Asn Pro Phe Asn Glu Ile Leu Phe Asn  
 2045 2050 2055

Gln Leu Cys Arg Thr Val Asp Asn His Leu Lys Trp Ser Asn Leu  
 2060 2065 2070

Arg Arg Asn Thr Gly Met Ile Glu Trp Ile Asn Arg Arg Ile Ser  
 2075 2080 2085

Lys Glu Asp Arg Ser Ile Leu Met Leu Lys Ser Asp Leu His Glu  
 2090 2095 2100

Glu Asn Ser Trp Arg Asp  
 2105

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Una partícula no replicante derivada de Rhabdovirus para uso en el tratamiento de leucemia, en el que la partícula es capaz de unirse a la superficie de una célula y ser internalizada, y en el que dicha partícula derivada de Rhabdovirus comprende un polinucleótido de ARN, cuya estructura de ARN está reticulada o escindida para formar segmentos discontinuos de ARN.
2. La partícula derivada de Rhabdovirus para uso según la reivindicación 1, en la que dicha partícula derivada de Rhabdovirus exhibe:
- 10 nucleótidos en la estructura de ARN reticulados a otros nucleótidos de ARN, a aminoácidos en una proteína en la estructura proteica alrededor del ARN, o ambos; o
- la estructura proteica alrededor del ARN incluye una proteína que tiene un aminoácido que está reticulado a otra proteína de otra estructura proteica, o reticulado a otro aminoácido de la misma proteína; reticulado a la estructura de ARN; o cualquier combinación de los mismos.
3. La partícula derivada de Rhabdovirus para uso según la reivindicación 1, en la que dicho ARN reticulado comprende al menos 0,05% de nucleótidos reticulados.
- 15 4. La partícula derivada de Rhabdovirus para uso según la reivindicación 1, en la que dicha partícula derivada de Rhabdovirus exhibe al menos 60 proteínas G funcionales por partícula.
5. La partícula derivada de Rhabdovirus para uso según la reivindicación 1, para uso en el tratamiento de leucemia en combinación con un agente quimioterapéutico.
- 20 6. La partícula derivada de Rhabdovirus para uso según la reivindicación 1, producida mediante el método de someter Rhabdovirus vivo a un agente que daña el ARN para reticular la estructura de ARN del Rhabdovirus, o escindir la estructura de ARN del Rhabdovirus, o ambos.
7. La partícula derivada de Rhabdovirus para uso según la reivindicación 1, en la que se administran al paciente  $1 \times 10^{10}$  a  $1 \times 10^{15}$  partículas.
8. Un método para producir la partícula derivada de Rhabdovirus de la reivindicación 1, que comprende las etapas de:
- 25 someter Rhabdovirus vivo a un agente que daña el ARN para reticular la estructura de ARN del Rhabdovirus, o escindir la estructura de ARN del Rhabdovirus, o ambos.
9. El método de la reivindicación 8, en el que someter el Rhabdovirus vivo a un agente que daña el ARN comprende someter el Rhabdovirus vivo a radiación electromagnética, o exponer el Rhabdovirus vivo a un agente químico que daña el ARN, o ambos.
- 30 10. El método de la reivindicación 9, en el que la radiación electromagnética tiene una longitud de onda menor que alrededor de 1 mm.
- 35 11. El método de la reivindicación 9, en el que la radiación electromagnética está en el espectro UV y en el que el Rhabdovirus vivo se somete a una dosis de radiación electromagnética de entre alrededor de  $100 \text{ mJ/cm}^2$  y alrededor de  $8000 \text{ mJ/cm}^2$ , o en el que la radiación electromagnética es radiación gamma y en el que el Rhabdovirus vivo se somete a una dosis de radiación electromagnética de entre 1 kGy y alrededor de 50 kGy.

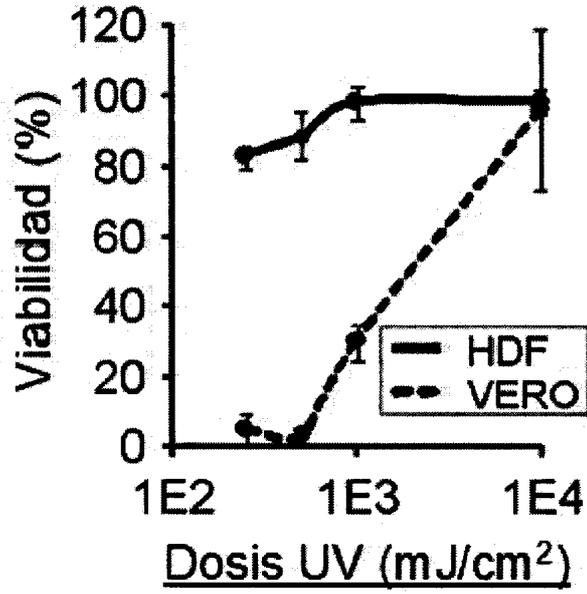


Fig. 1A

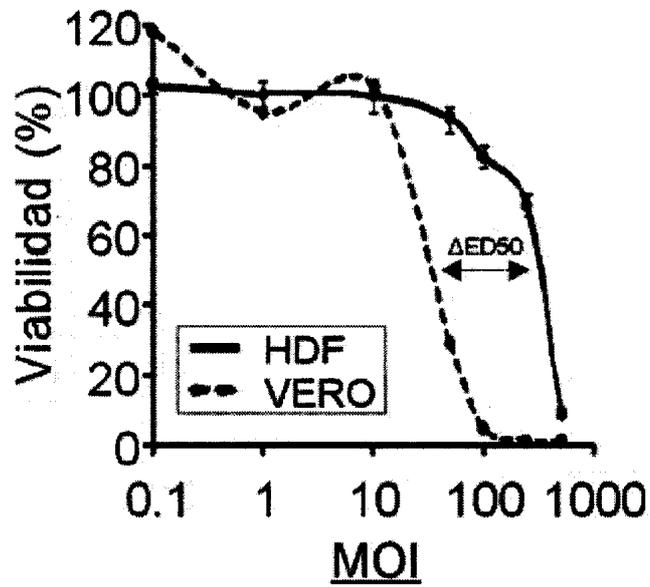


Fig. 1B

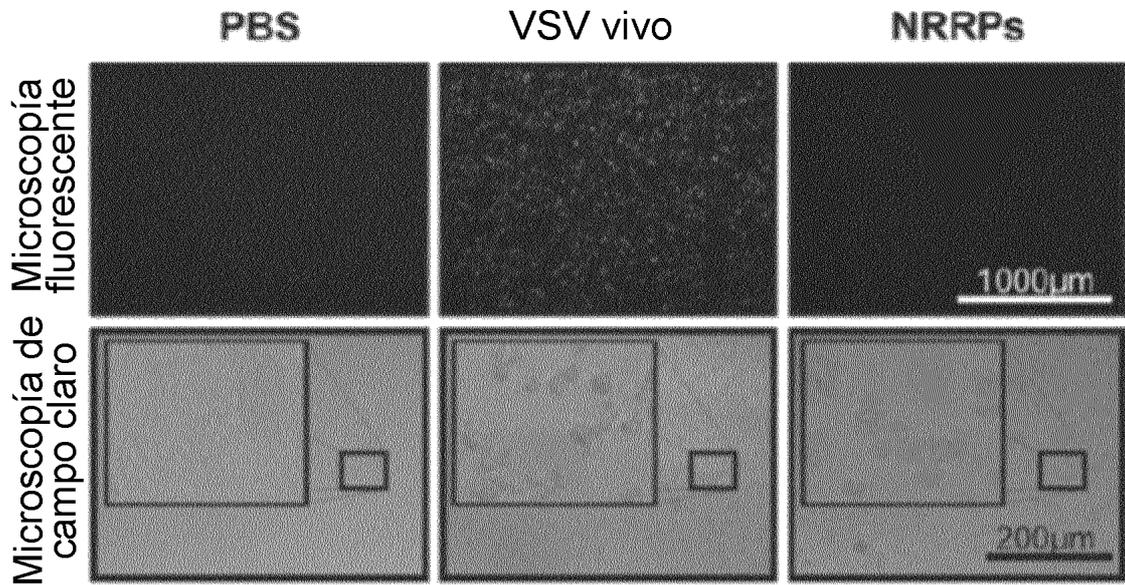


Fig. 2A

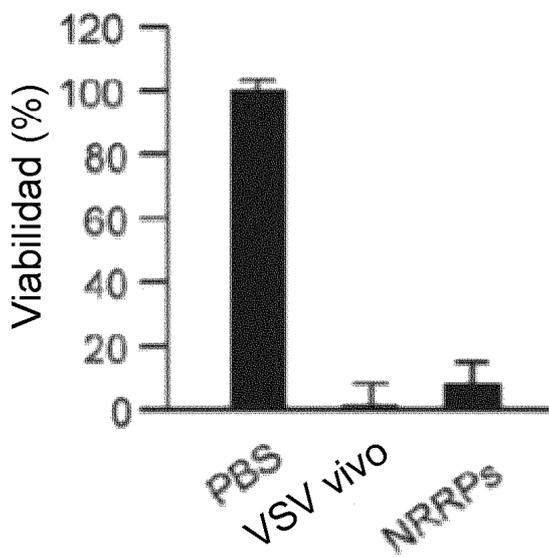


Fig. 2B

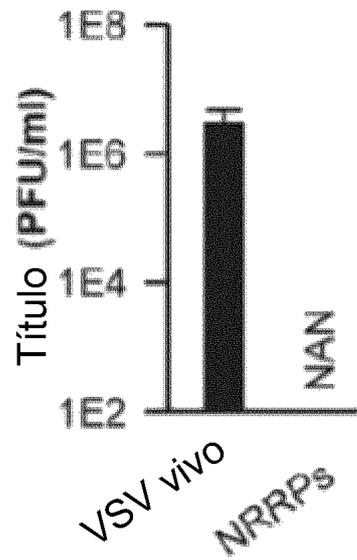


Fig. 2C

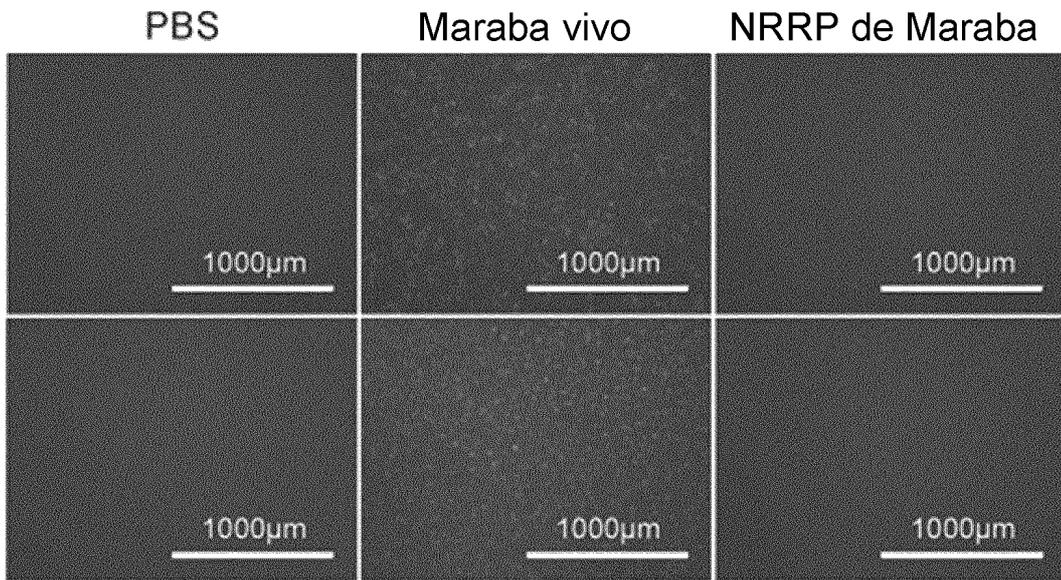


Fig. 3A

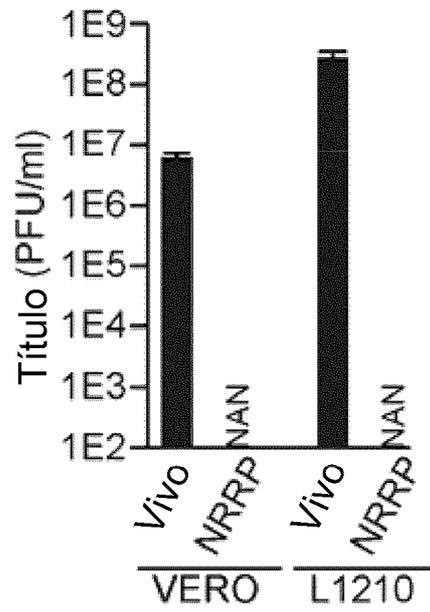


Fig. 3B

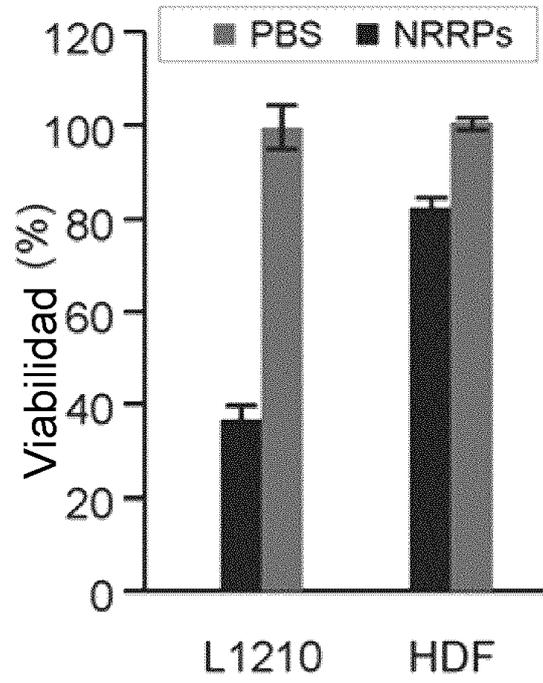


Fig. 3C

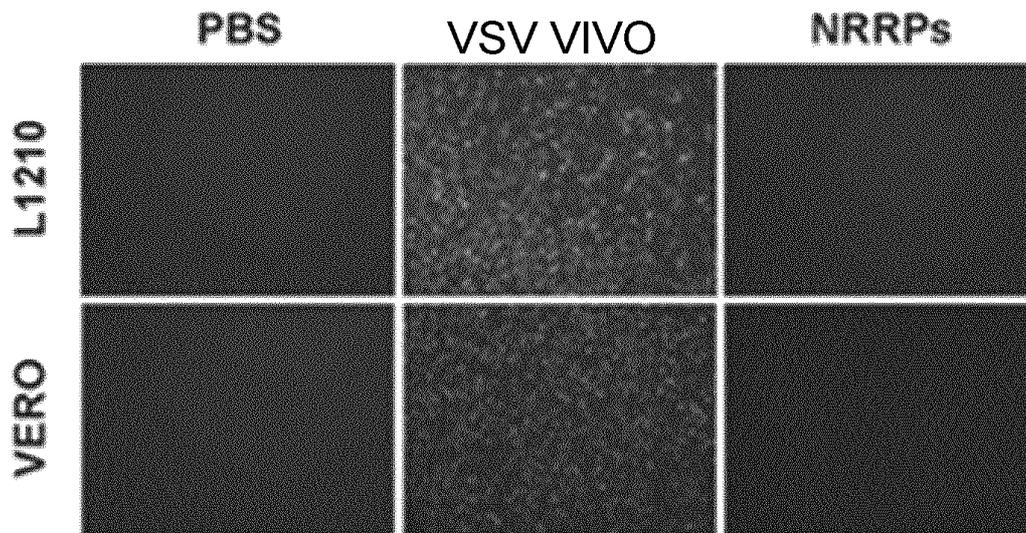


Fig. 4A

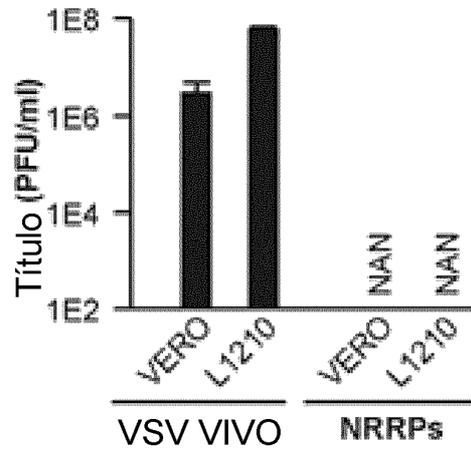


Fig. 4B

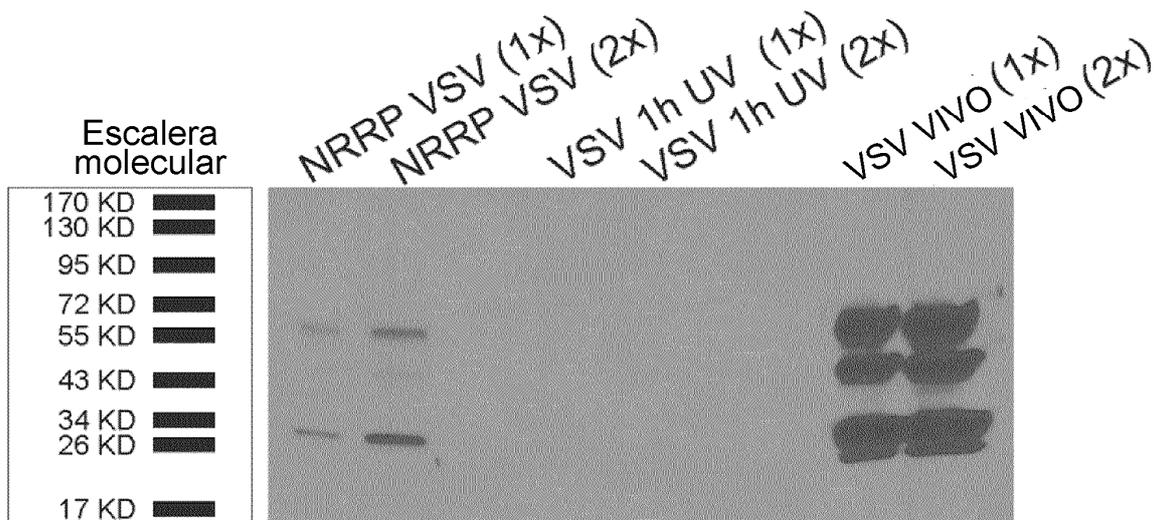
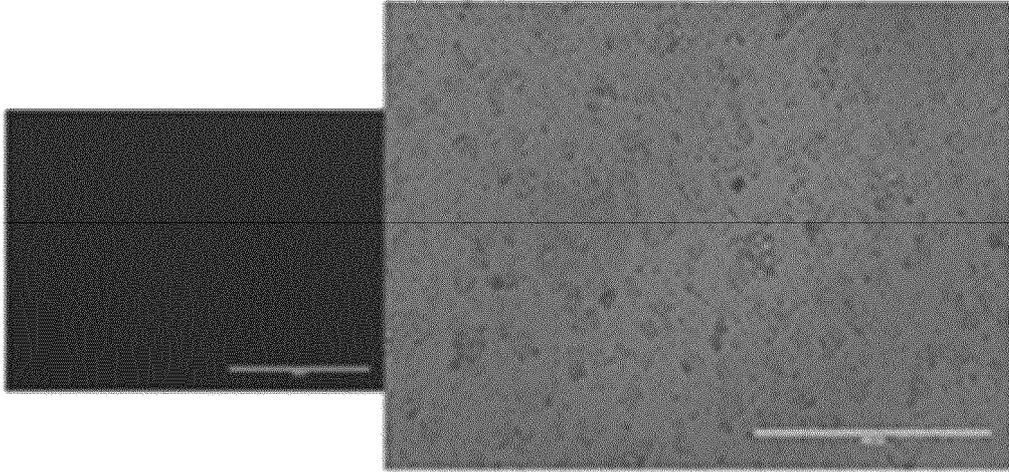
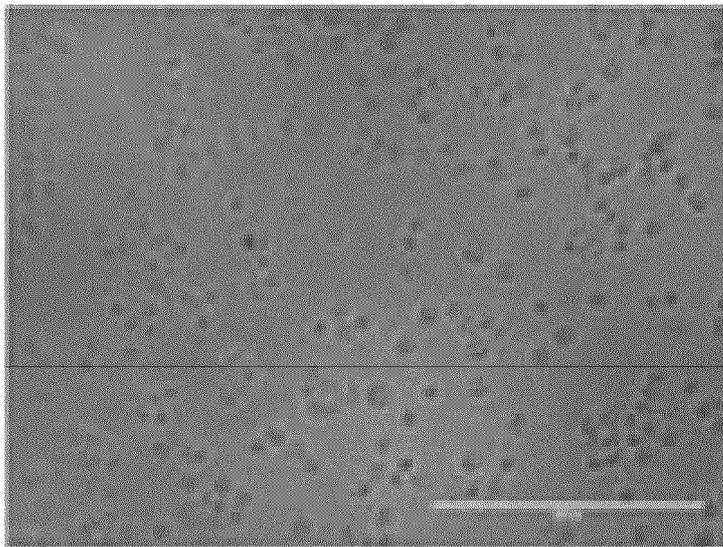


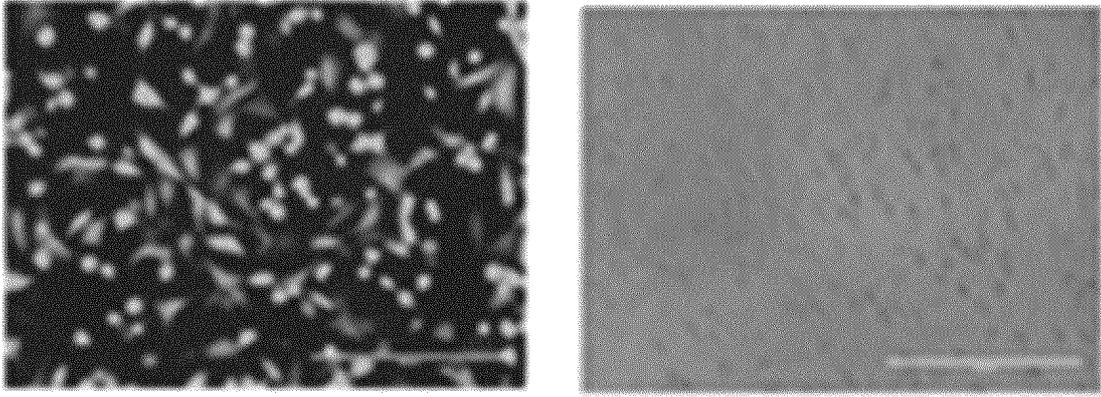
Fig. 5



**Fig. 6A**



**Fig. 6B**



**Fig. 6C**

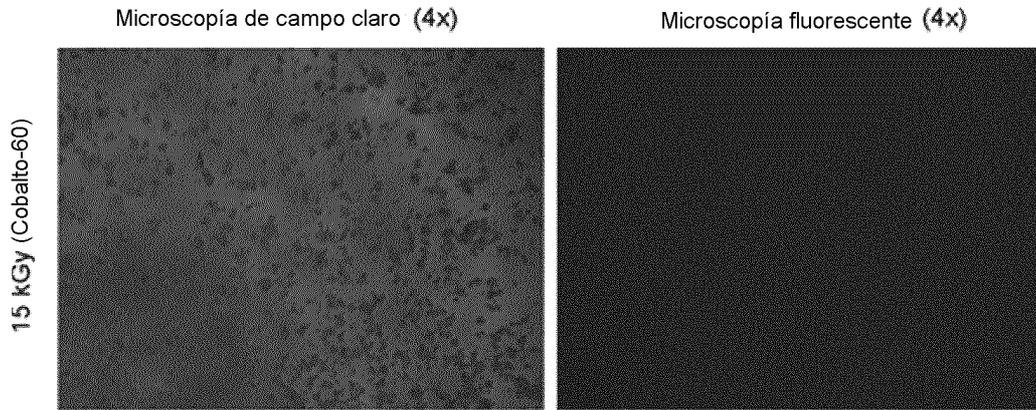


Fig. 7A

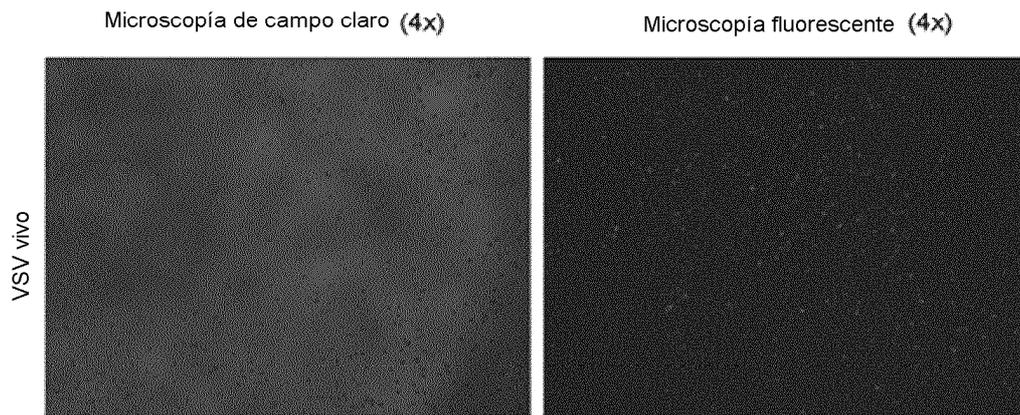


Fig. 7B

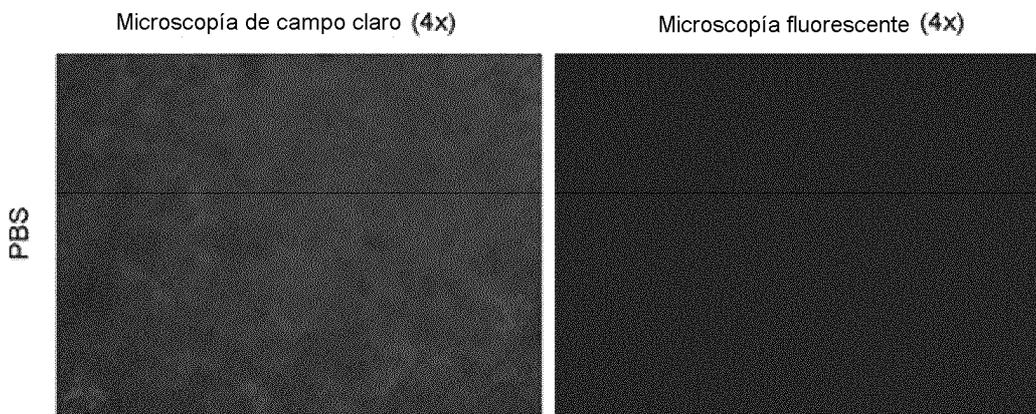


Fig.7C

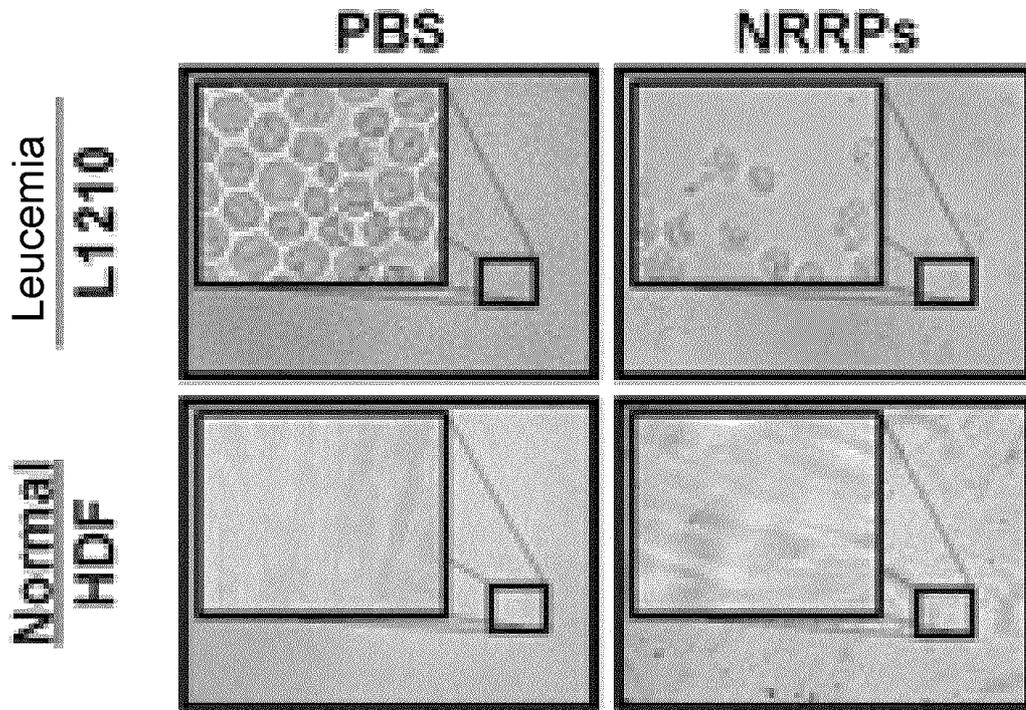


Fig. 8A

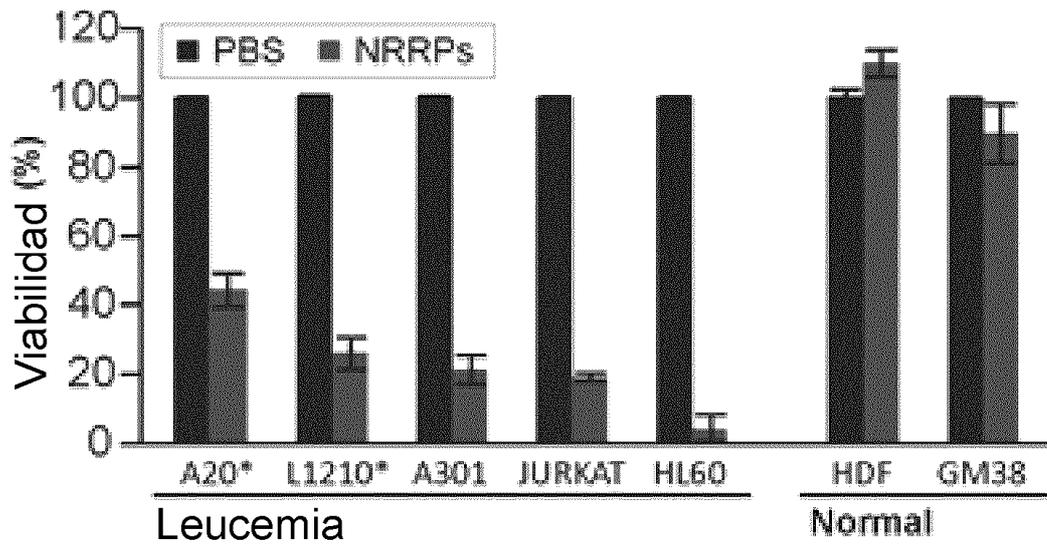


Fig. 8B

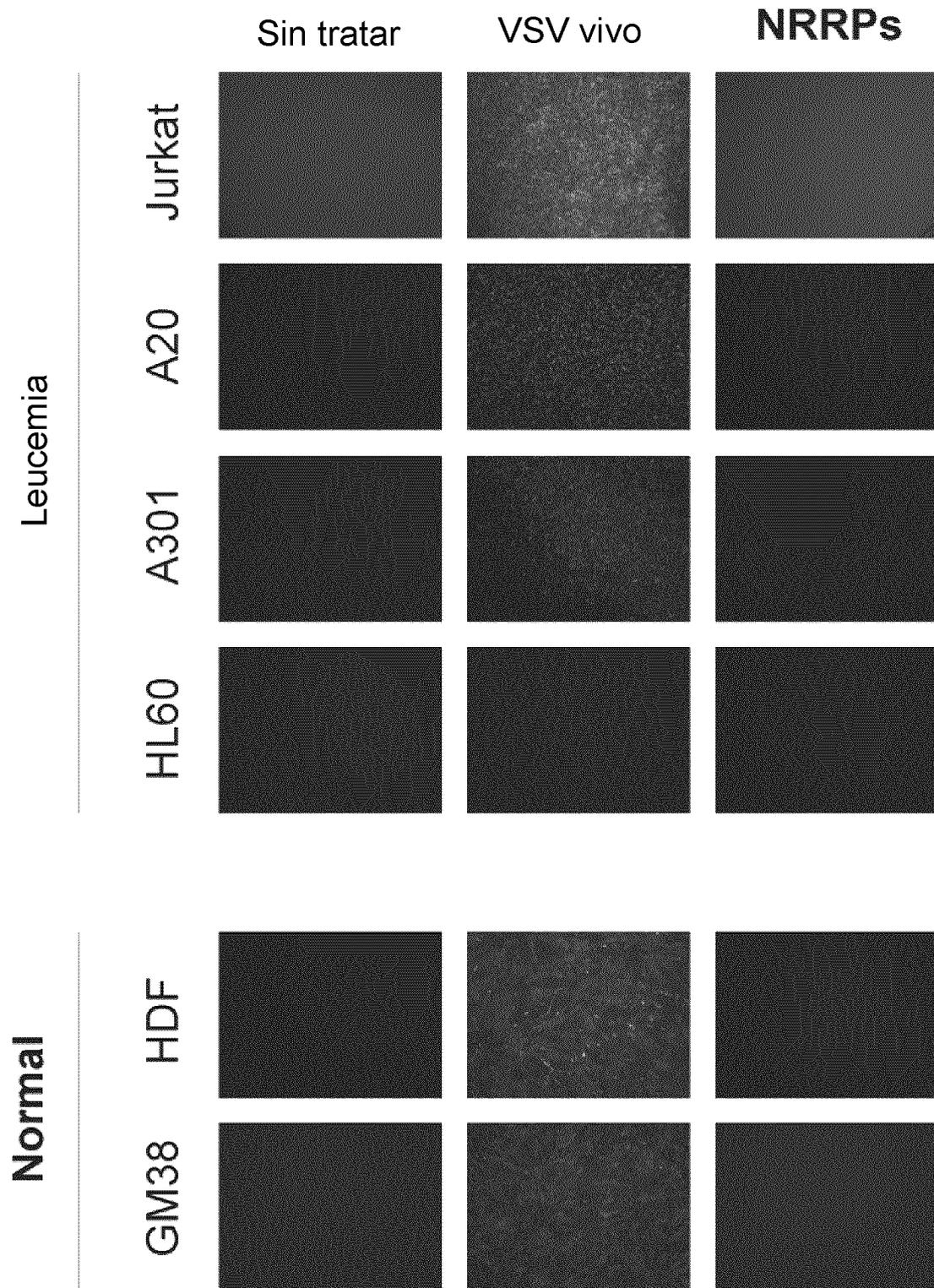


Fig. 8C

Fig. 6

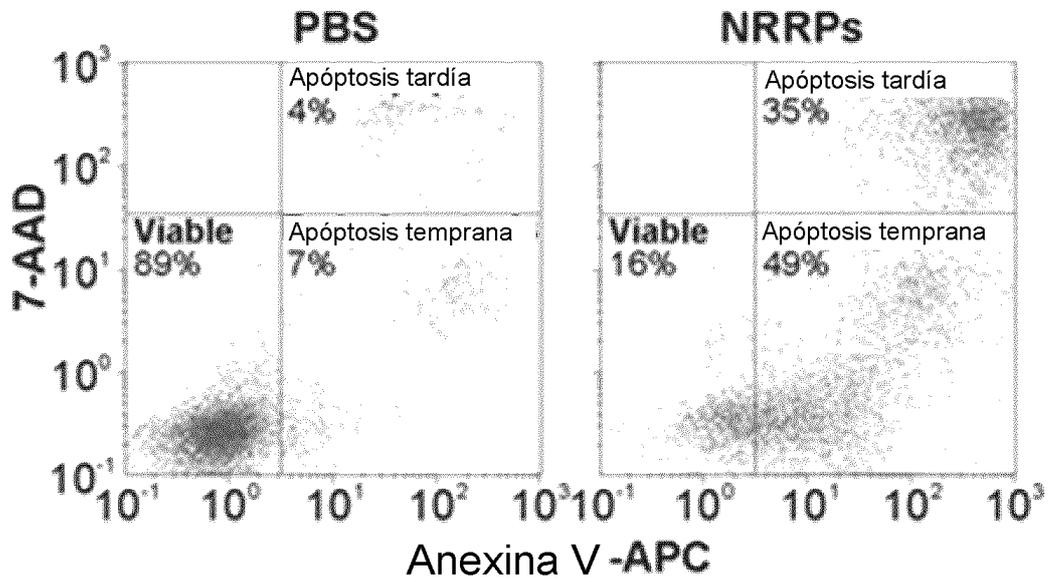


Fig. 9

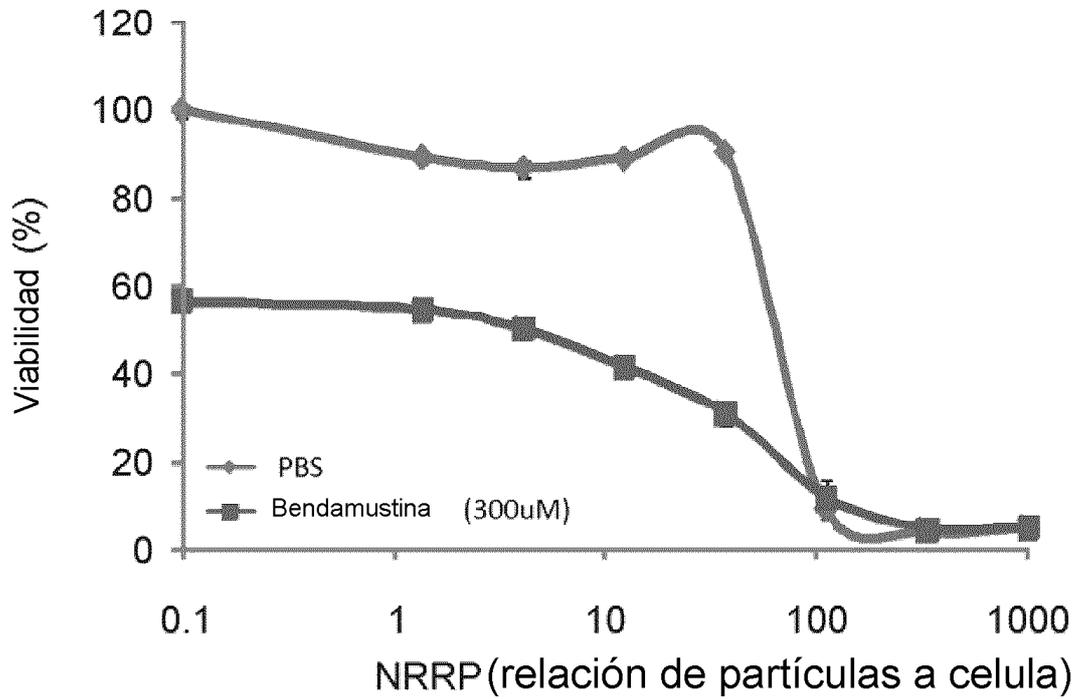


Fig. 10

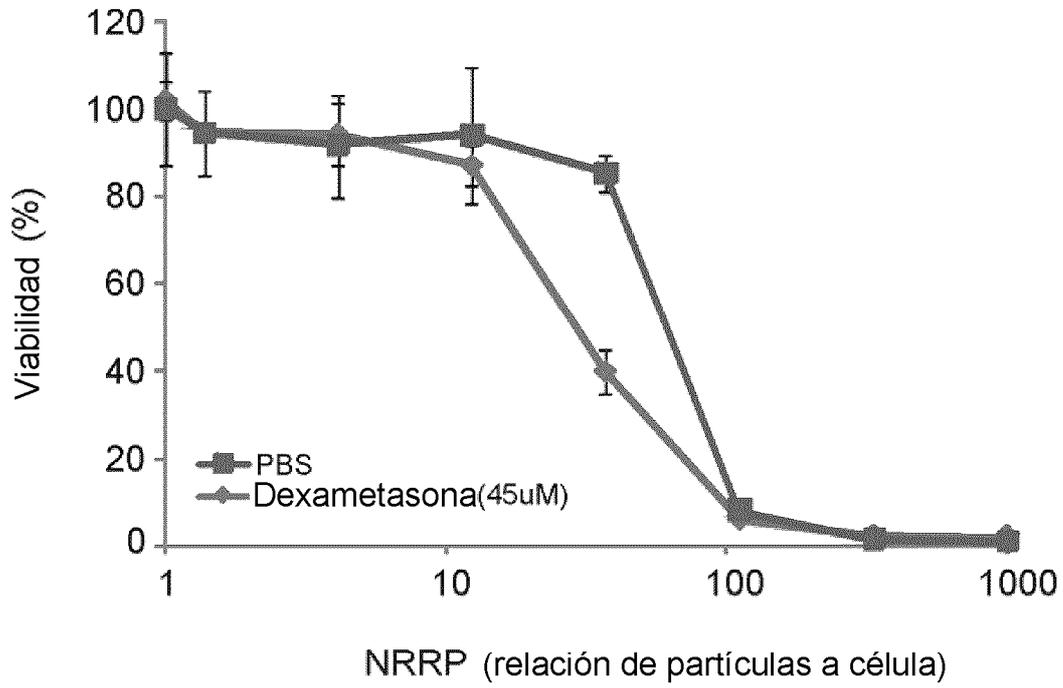


Fig. 11

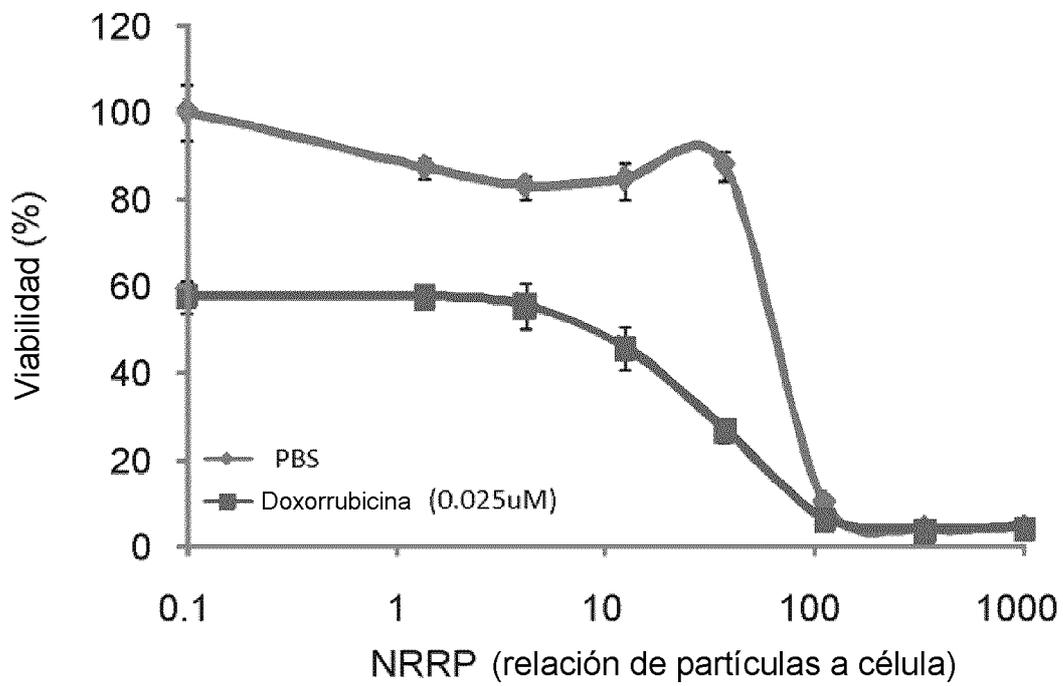


Fig. 12

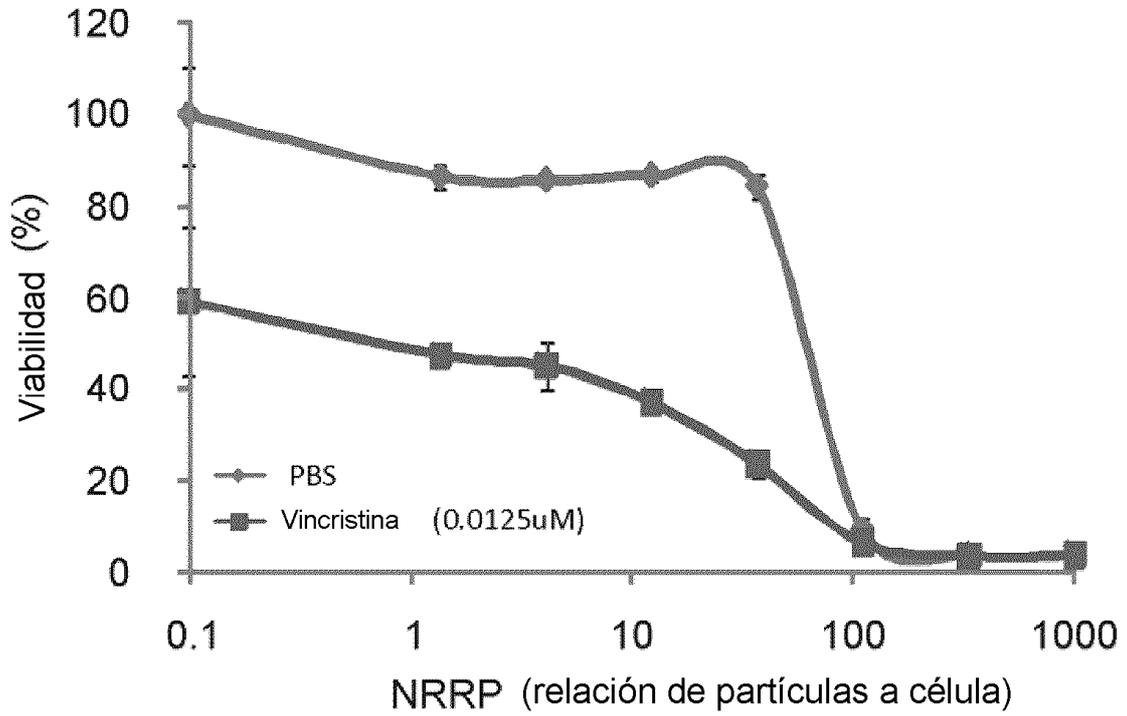


Fig. 13

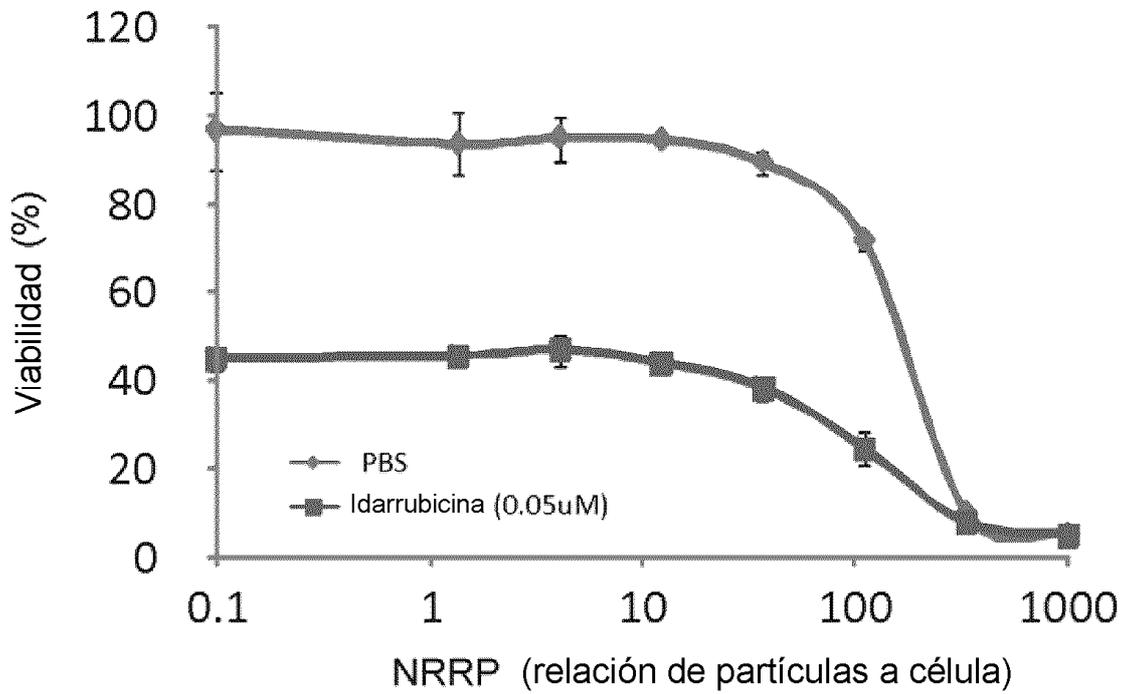


Fig. 14

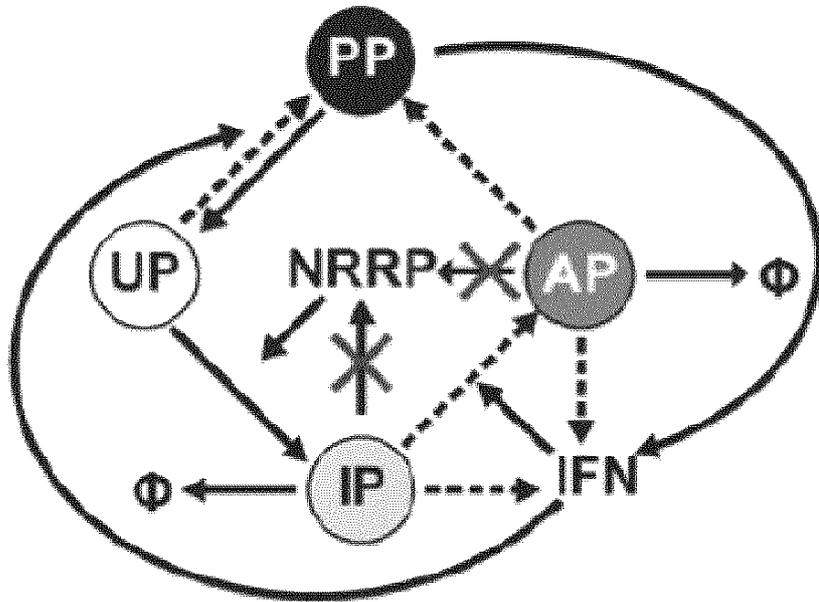


Fig. 15A

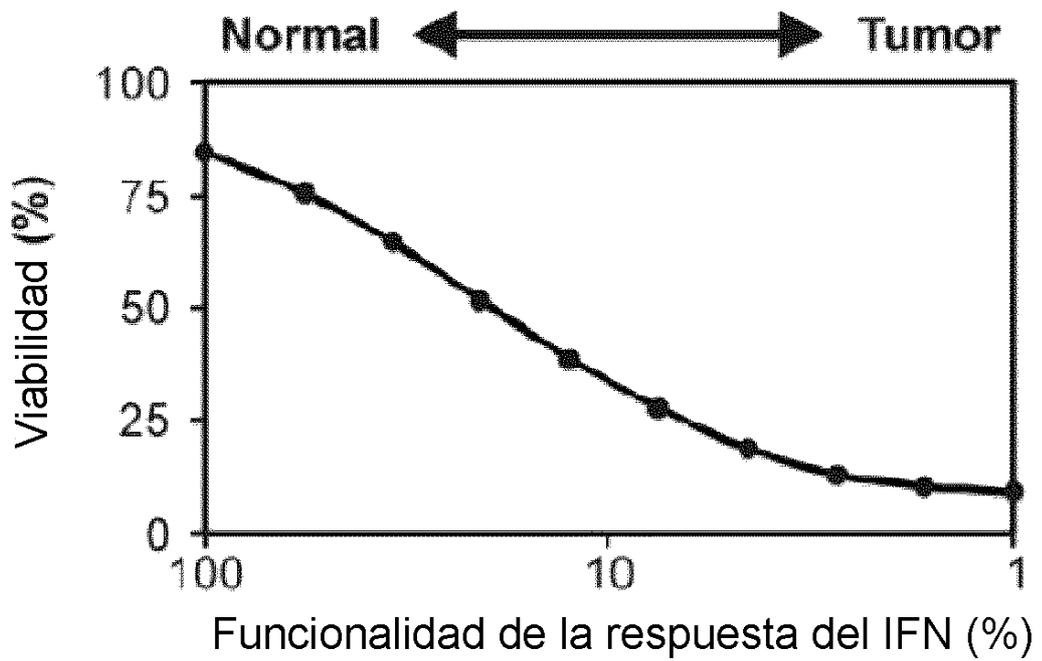


Fig. 15B

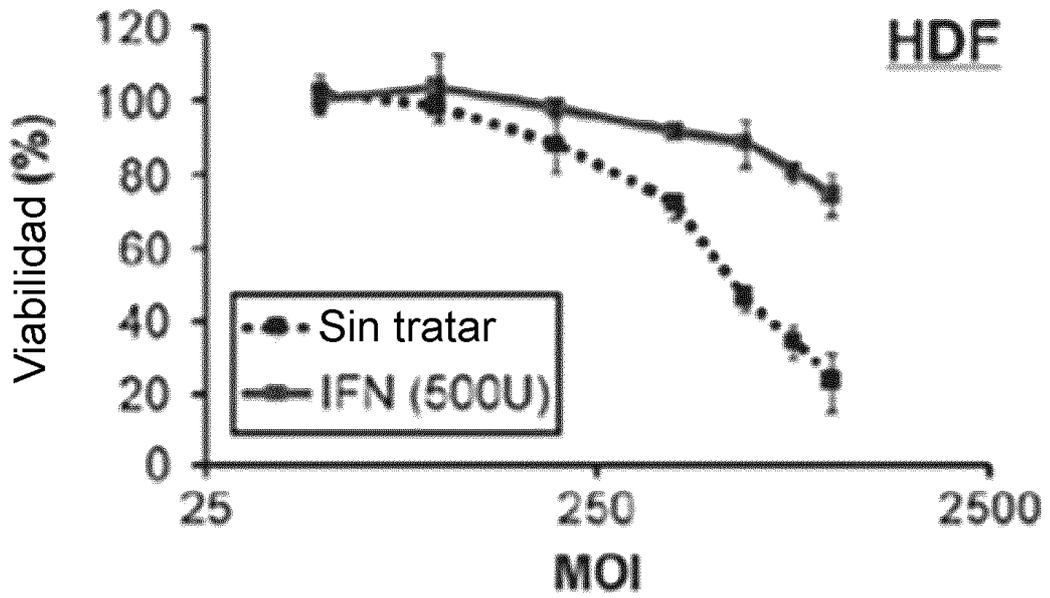


Fig. 15C

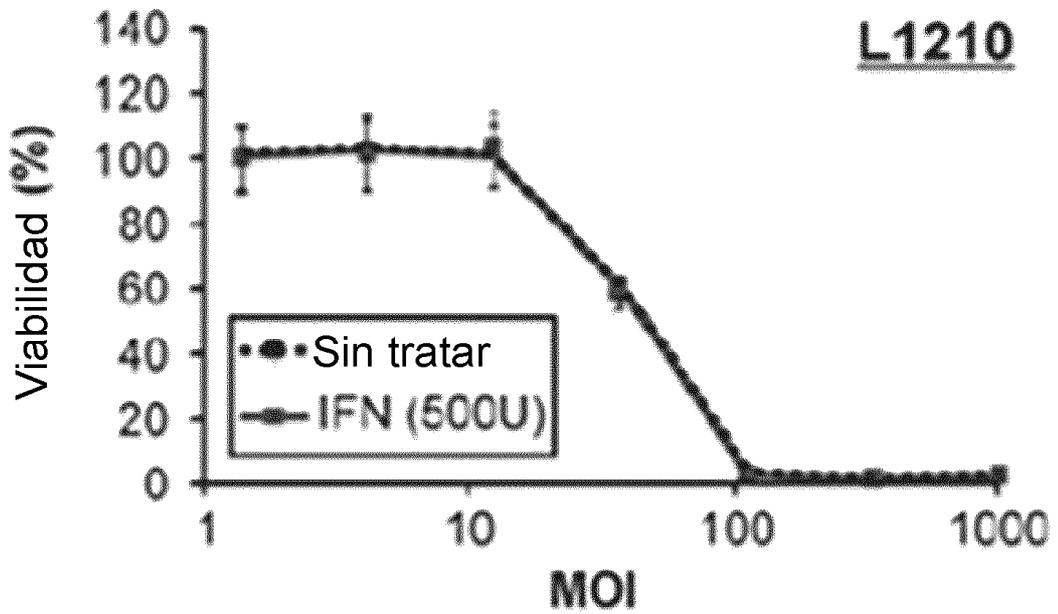


Fig. 15D

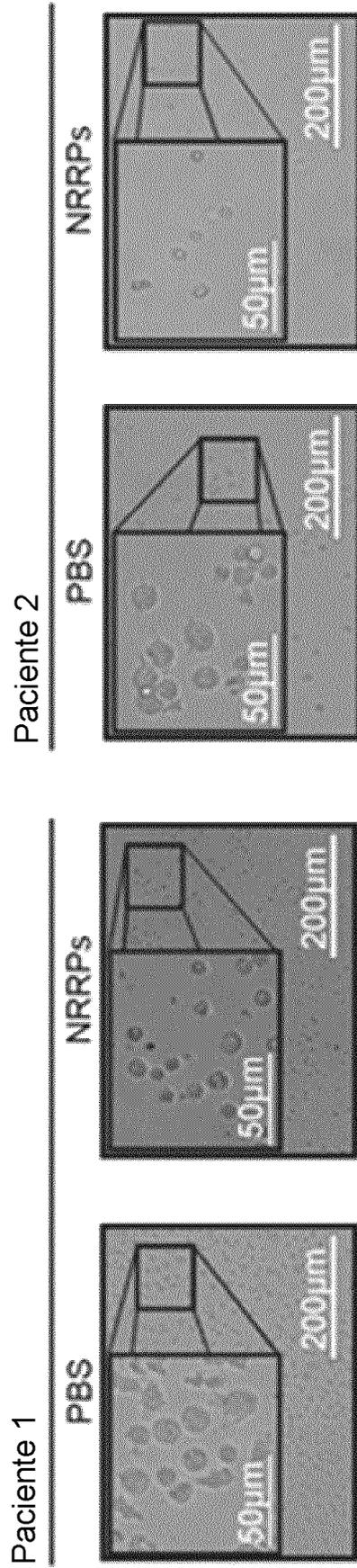
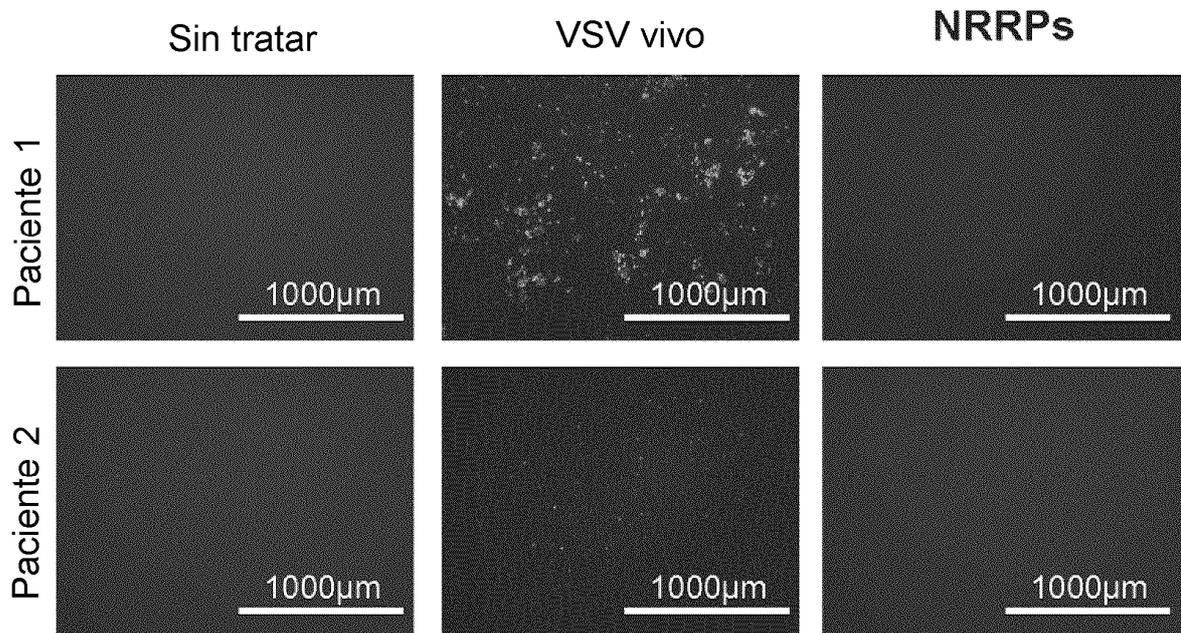


Fig. 16A



**Fig. 16B**

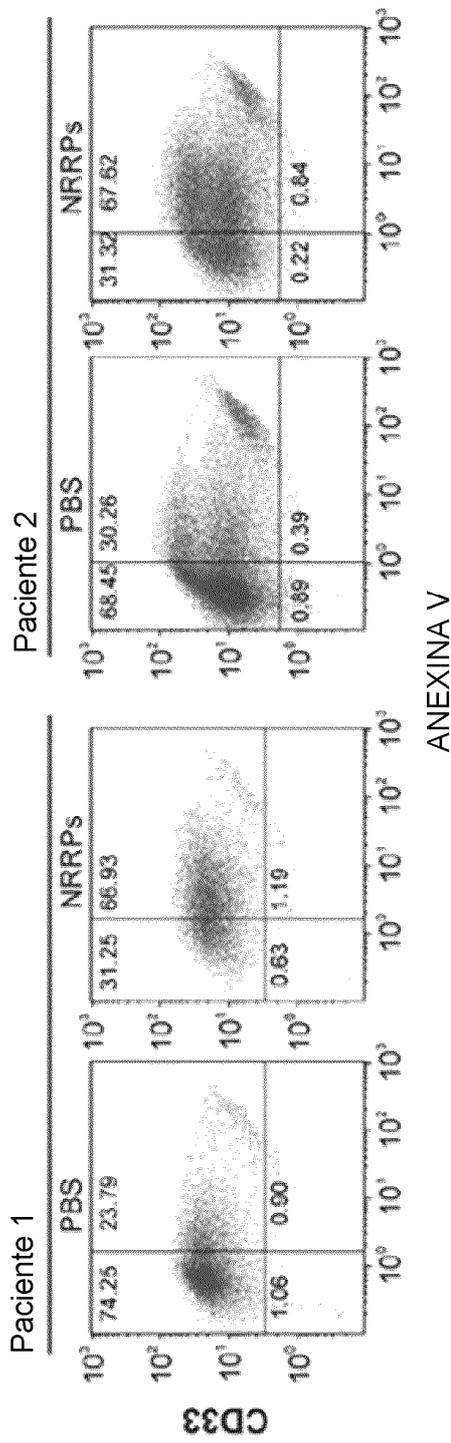


Fig. 16C

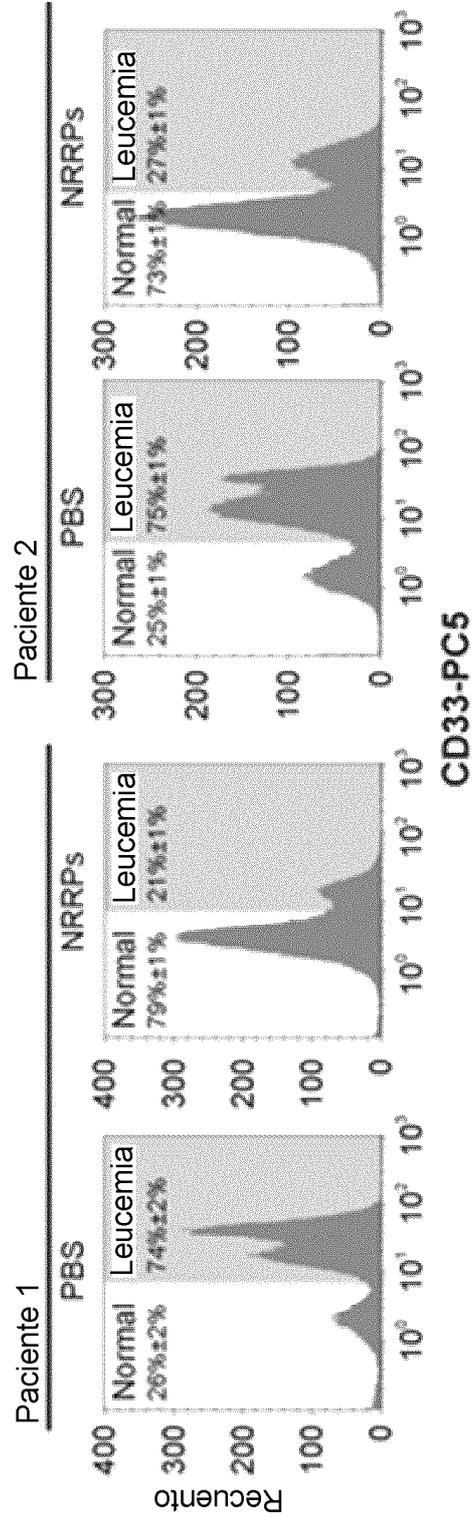


Fig. 16D

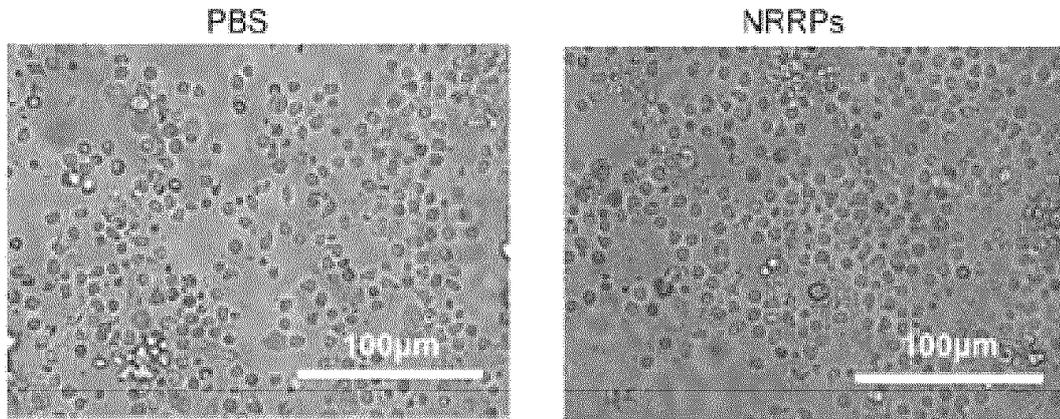


Fig. 17A

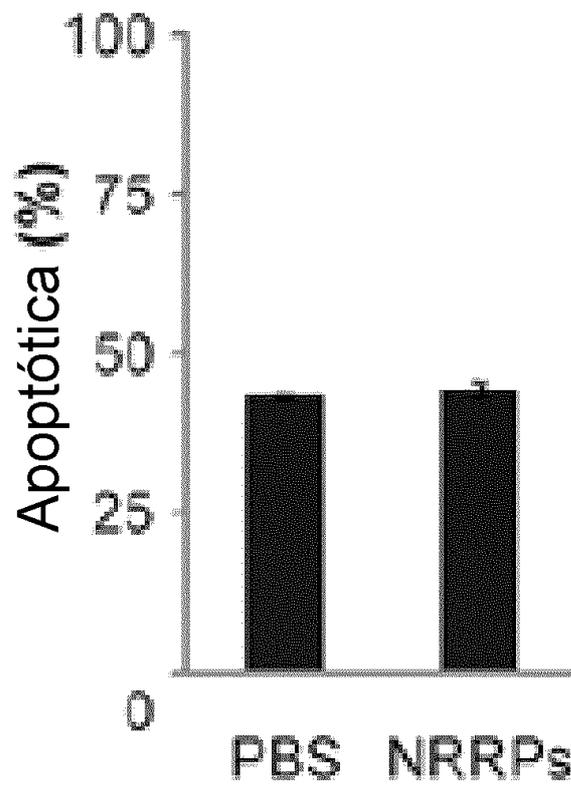


Fig. 17B

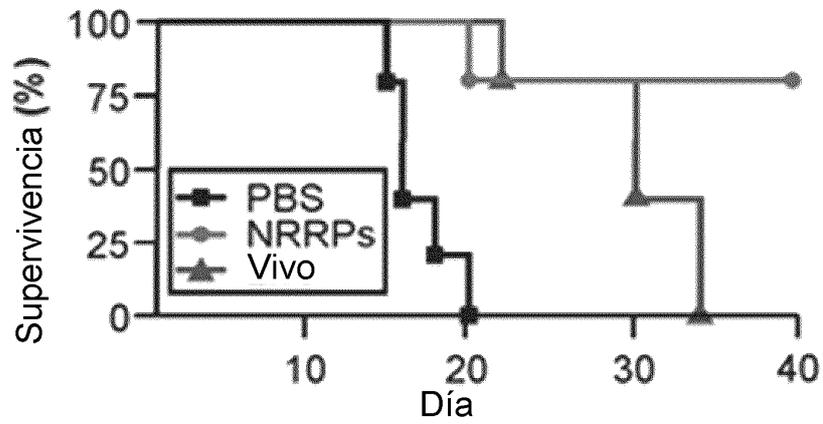


Fig. 18A

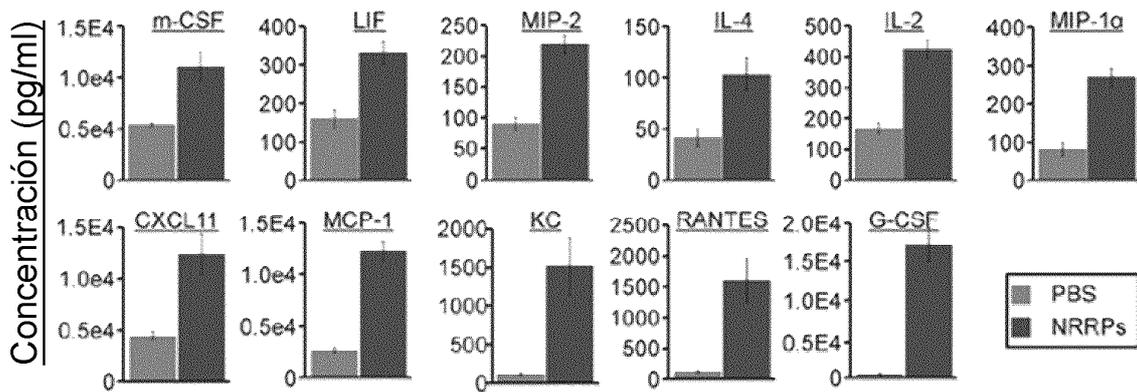


Fig. 18B

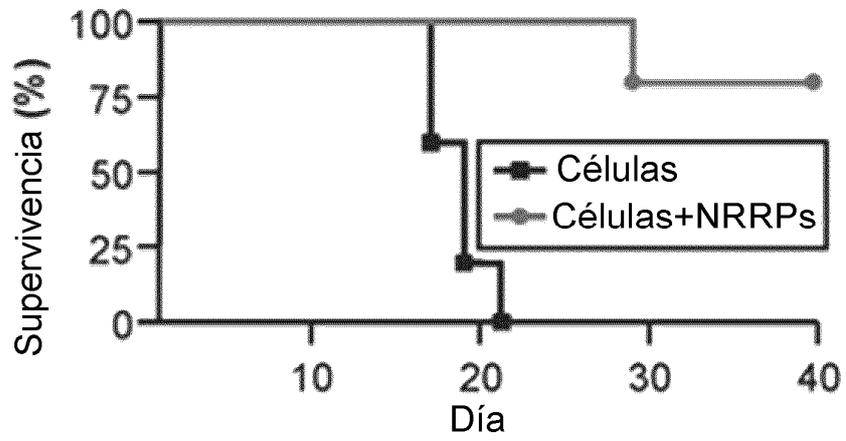


Fig. 19

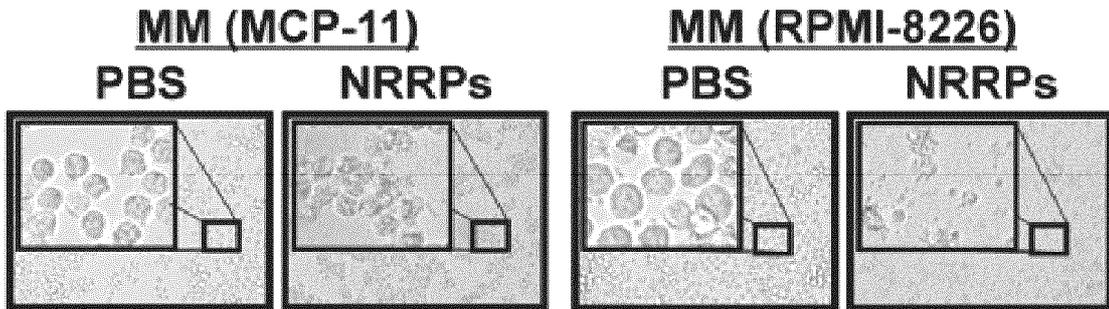


Fig. 20

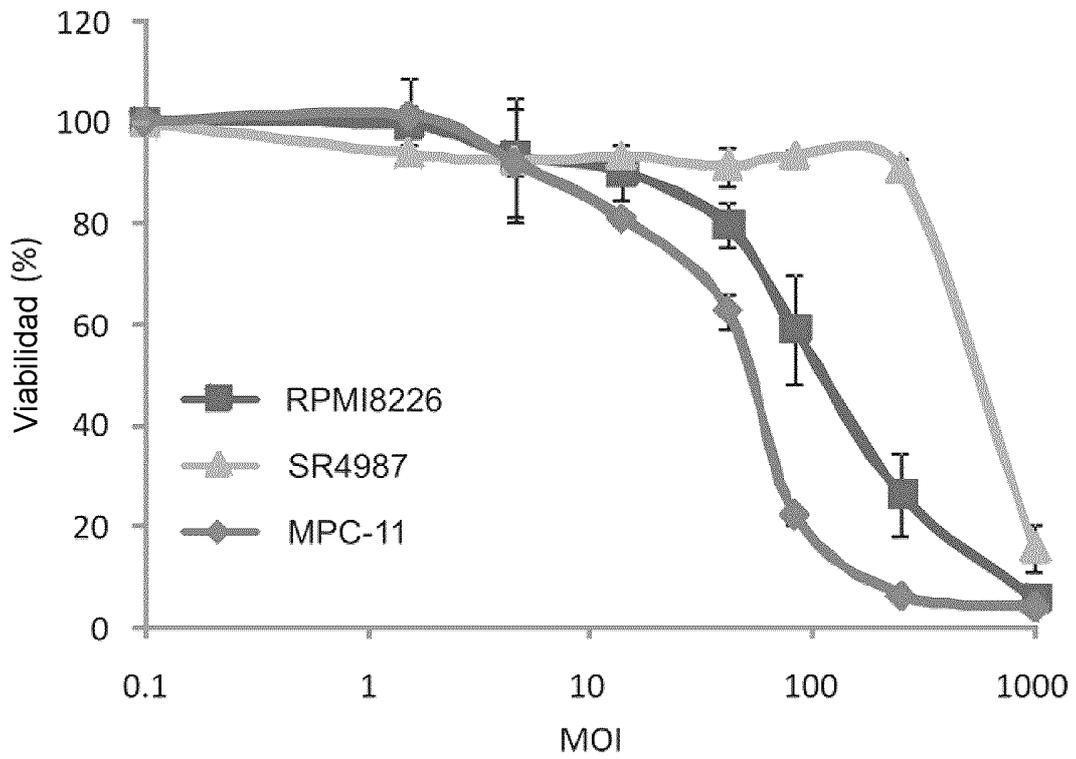


Fig. 21

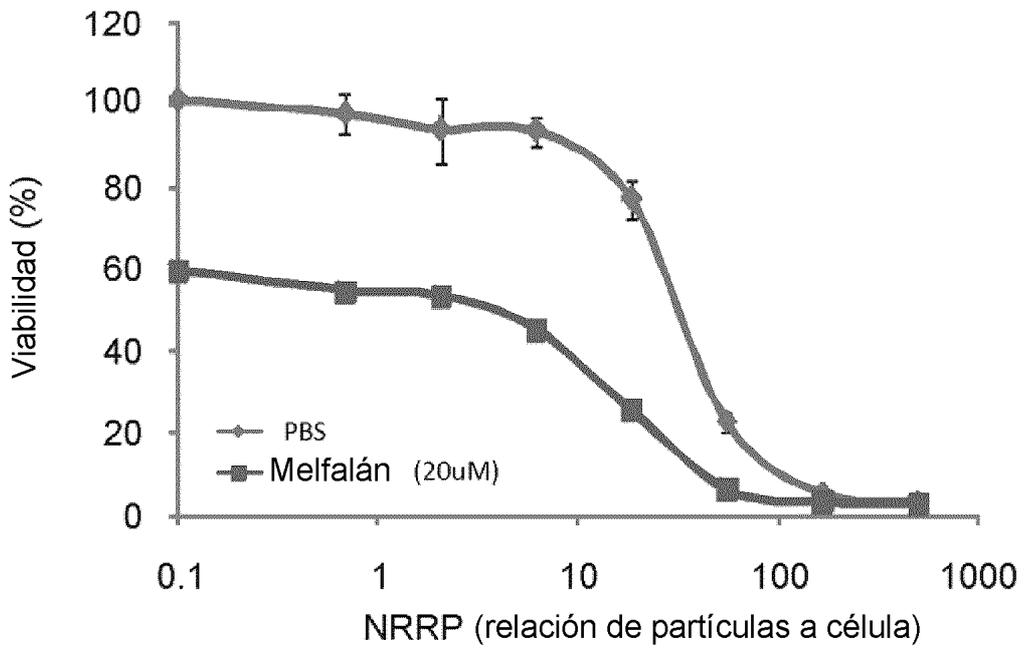


Fig. 22

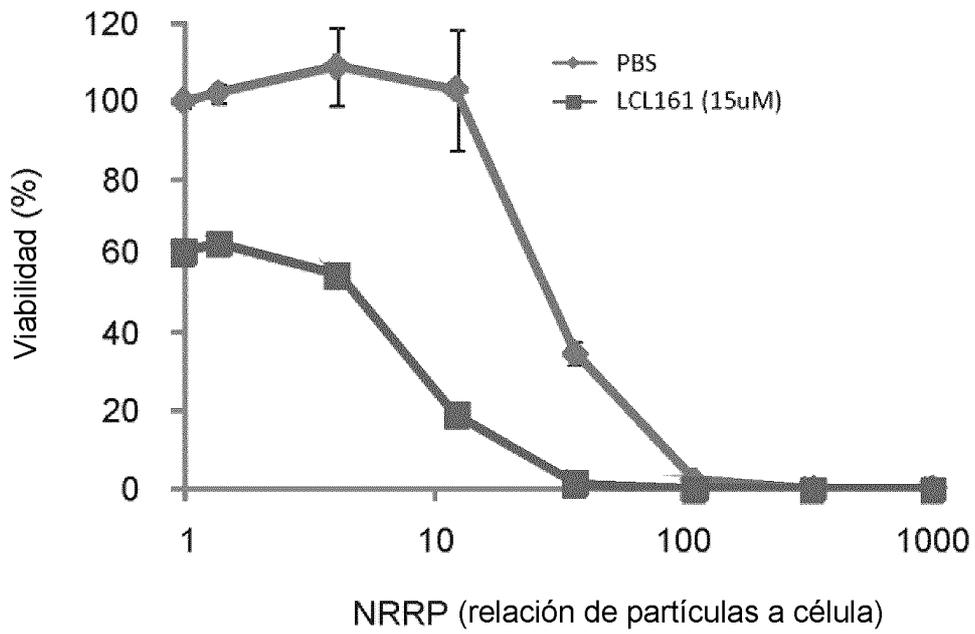


Fig. 23

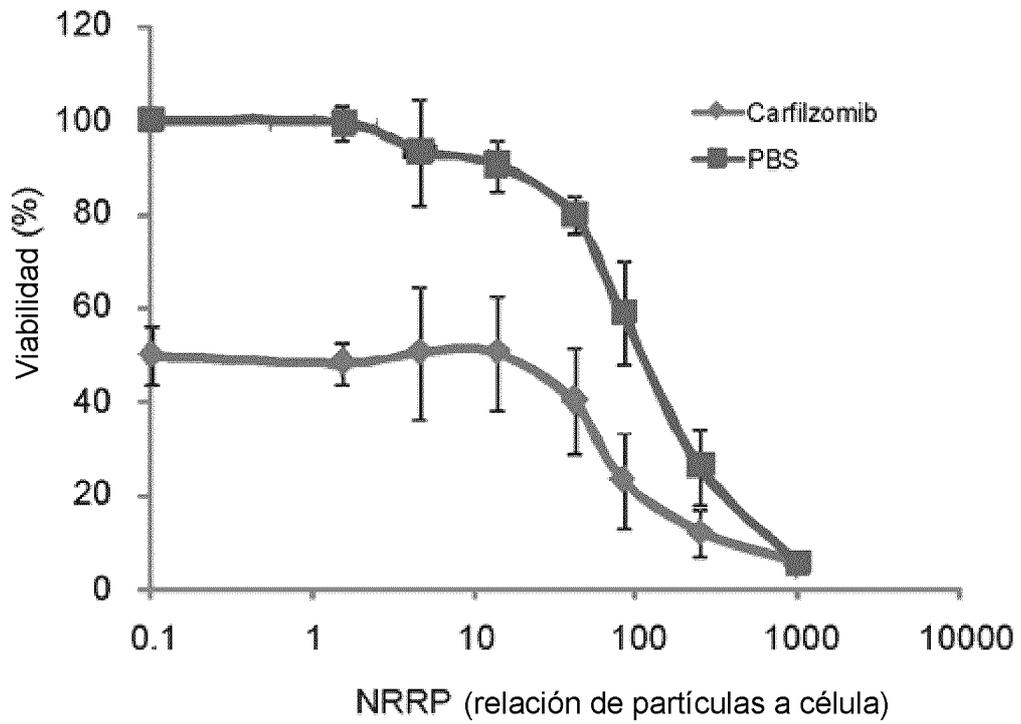
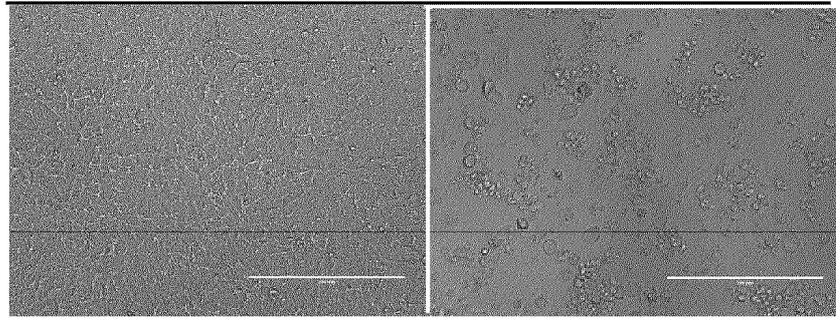


Fig. 24

**DBT**

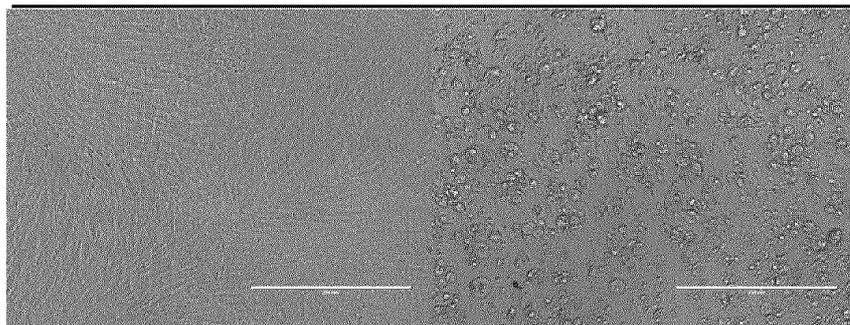


**PBS**

**NRRPs**

**Fig. 25A**

**K1491**

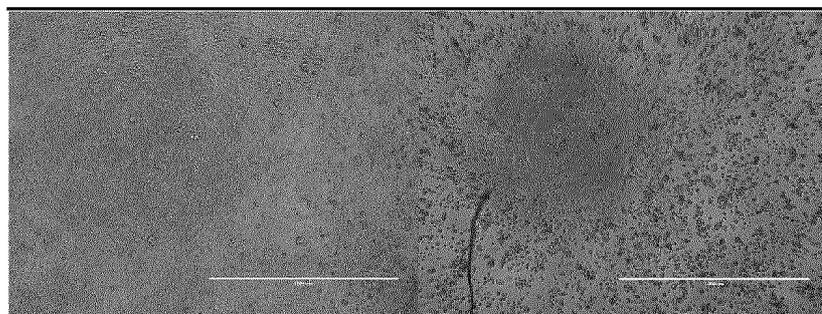


**PBS**

**NRRPs**

**Fig. 25B**

**GL261**



**PBS**

**NRRPs**

**Fig. 25C**

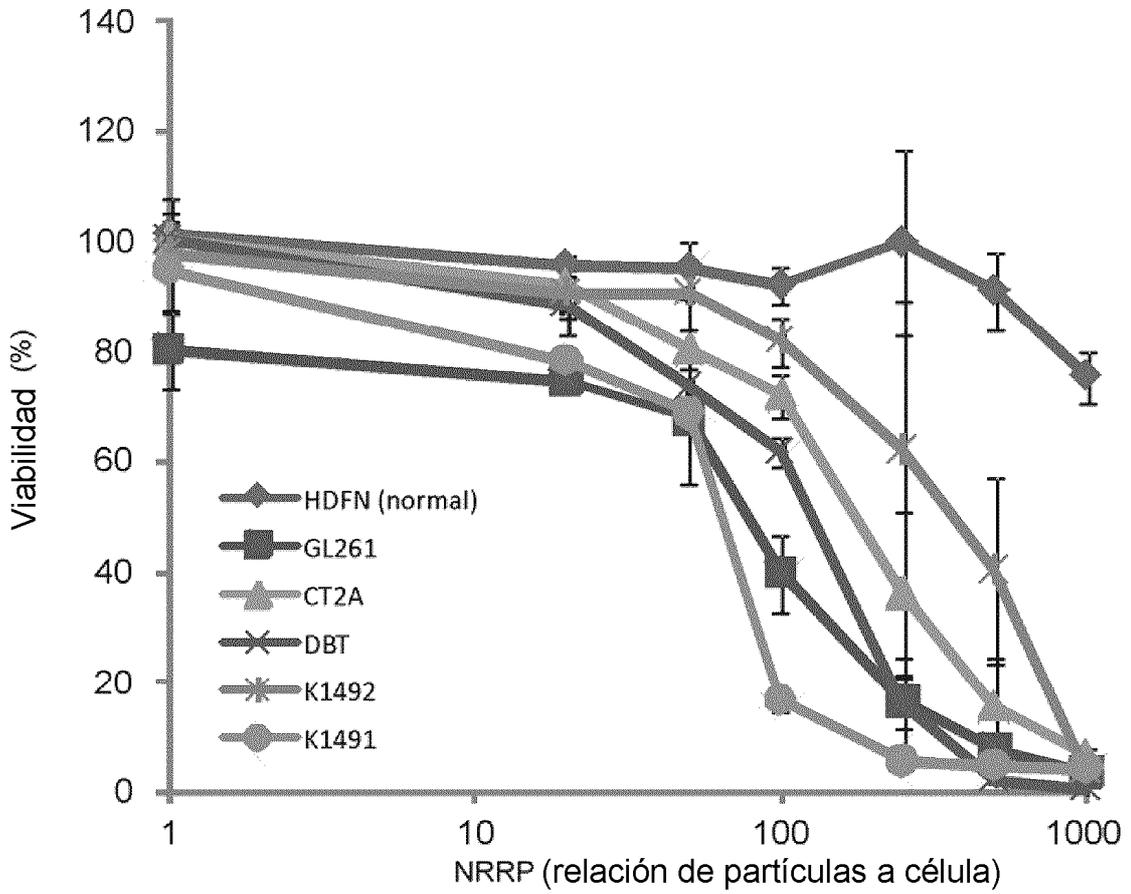


Fig. 26

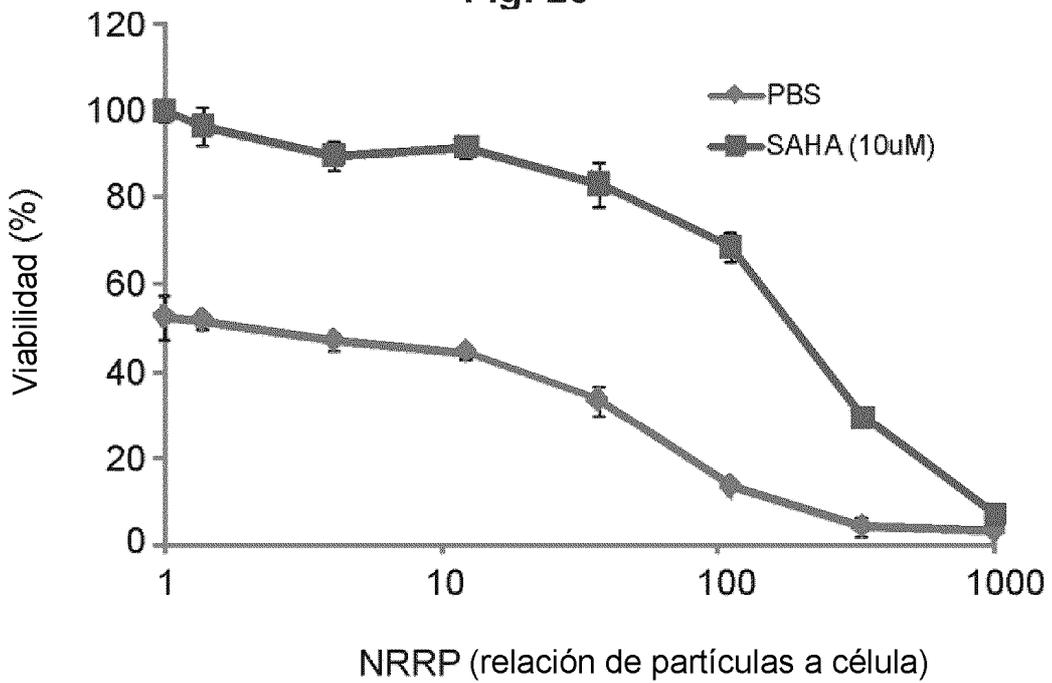
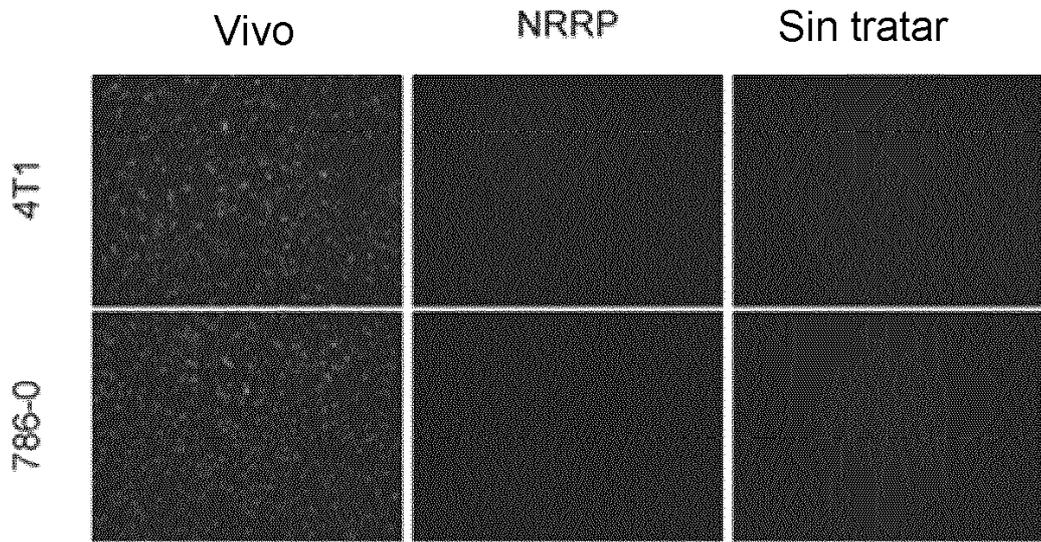
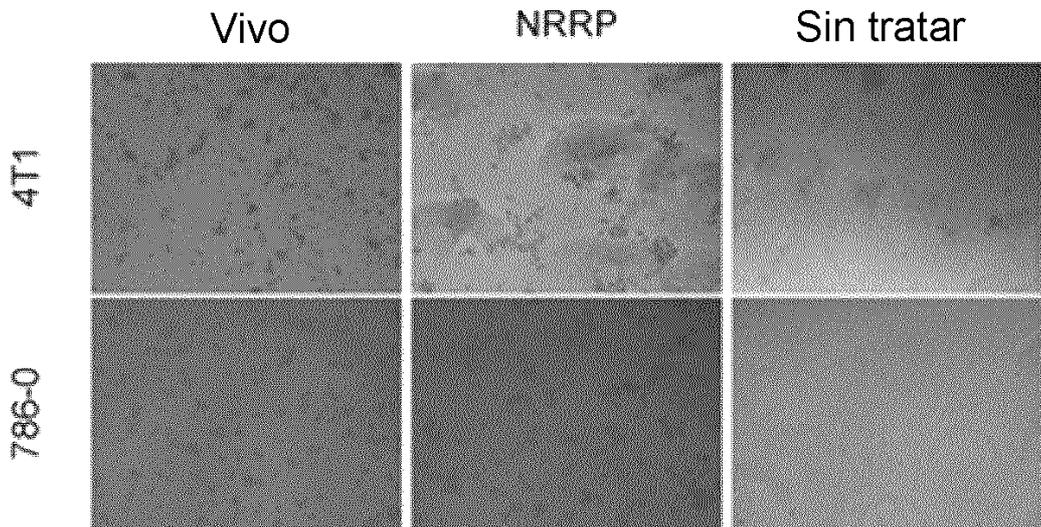


Fig. 27



**Fig. 28A**



**Fig. 28B**

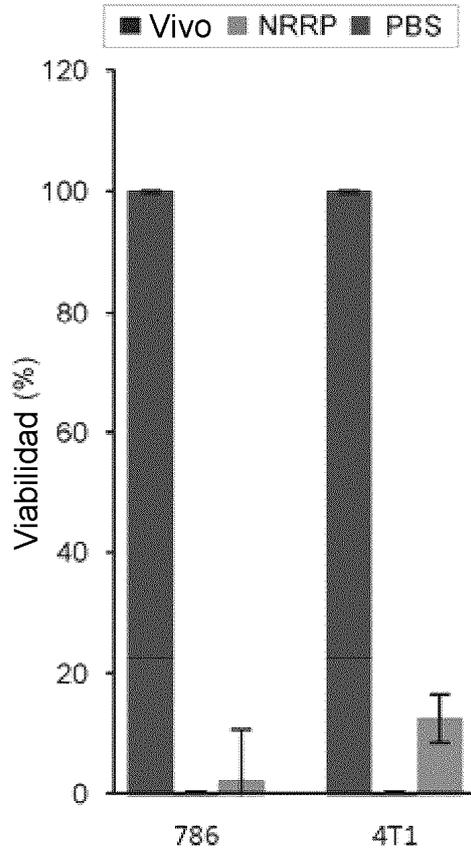


Fig. 28C

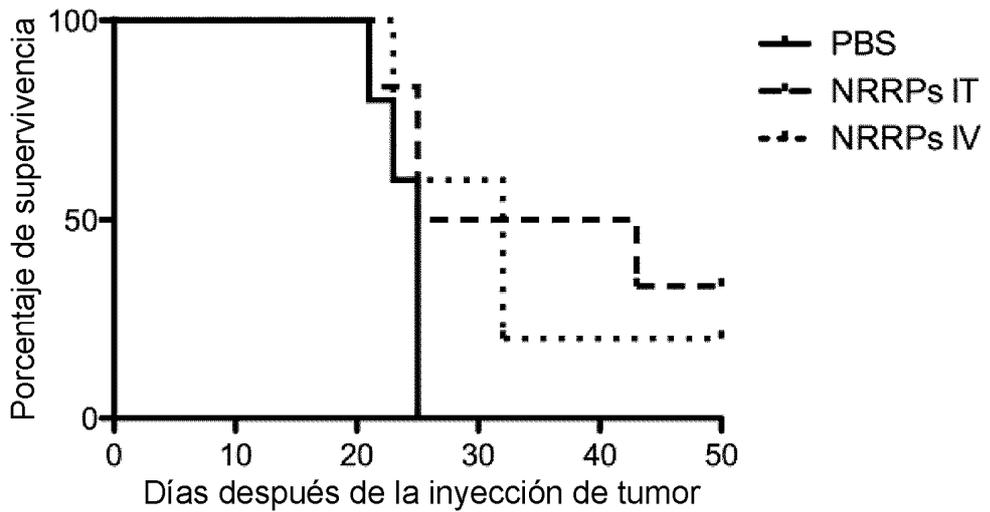


Fig. 29