

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 762 174**

51 Int. Cl.:

C12N 7/01 (2006.01)

C12N 7/04 (2006.01)

C12N 15/86 (2006.01)

A61K 35/768 (2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.10.2014 PCT/EP2014/073120**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.05.2015 WO15063085**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.10.2014 E 14809770 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.10.2019 EP 3063273**

54 Título: **Vector de virus de la influenza para viroterapia**

30 Prioridad:

28.10.2013 EP 13190511

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

22.05.2020

73 Titular/es:

**BLUE SKY VACCINES GMBH (100.0%)
Mariahilfer Strasse 101/1/21
1060 Vienna, AT**

72 Inventor/es:

MUNSTER, THOMAS

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

Observaciones:

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

ES 2 762 174 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

Vector de virus de la influenza para viroterapia

5 La presente invención proporciona un nuevo vector de virus de la influenza recombinante que comprende un gen NS que codifica una proteína NS1 truncada que consta de 106 aminoácidos del extremo N de la respectiva proteína NS 1 de tipo salvaje y una secuencia no viral heteróloga que codifica un polipéptido inmunoestimulador, por medio de lo cual dicho vector se replica eficazmente en células de melanoma sensibles a IFN si bien está atenuado y tiene replicación deficiente en células normales, no tumorales, y expresa un polipéptido inmunoestimulador heterólogo.

10 La invención es específicamente útil en el campo de la vacuna terapéutica contra el cáncer y se refiere a vectores de vacunas terapéuticas, más específicamente a vectores derivados de cepas de virus de la influenza tipo A modificadas genéticamente.

15 Antecedentes

Los cánceres metastásicos avanzados son en gran medida incurables ya que los cánceres han encontrado múltiples formas diferentes de usurpar las vías de señalización para obtener una ventaja de crecimiento. Por lo tanto, es poco probable que el ataque farmacológico a una sola diana molecular afecte significativamente la progresión a largo plazo de la neoplasia maligna (Jones et al., 2008, Science 321: 1801-1806). Además, las células tumorales se vuelven muy heterogéneas a medida que evolucionan bajo la presión selectiva de su microambiente (Subarsky, P y Hill, RP, 2003, Clin Exp Metastasis 20: 237-250).

25 Si bien nuestro sistema inmunitario tiene la capacidad de responder rápidamente y tiene el potencial de reconocer las variaciones antigénicas presentadas por las células tumorales (Cheever et al., 2009, Clin Cancer Res 15: 5323-5337), en particular los tumores avanzados son altamente inmunosupresores. La capacidad de crear un entorno inmunosupresor permite que las células cancerosas eviten la detección por parte del sistema inmunitario. Inhiben la maduración de las células presentadoras de antígenos profesionales locales secretando citocinas y otras moléculas que inhiben la expresión de moléculas coestimuladoras, esenciales para la expansión de las células T (Strobl, H y Knapp, W., 1999, Microbes Infect 1: 1283-1299; Fiorentino, DF et al., 1991, J Immunol 146: 3444-3451). Los tumores también inhiben directamente las células T y, en lugar de las moléculas coestimuladoras, muchos tumores expresan moléculas co-inhedoras. Algunos tumores pueden no expresar moléculas inhibidoras por sí mismas, pero reclutan tipos de células inhibidoras como las células T reguladoras. El hecho de que los tumores avanzados sean altamente inmunosupresores demuestra la importancia del sistema inmunitario en este contexto. Además de crear un entorno inmunosupresor, las células tumorales escapan del sistema inmunitario por una escasa o incluso nula presentación de antígenos tumorales a las células T efectoras (Maeurer, MJ, et al., 1996, Clin Cancer Res 2: 641-652).

Todas estas propiedades hacen que el cáncer sea una enfermedad compleja y difícil de tratar.

40 Los virus tienen dos propiedades importantes para superar tanto la heterogeneidad como los mecanismos de escape inmunitario del tumor:

45 En primero, los virus pueden aprovechar las mismas vías que activan las células tumorales durante la progresión maligna, para su propio crecimiento, lo que da como resultado la destrucción del tumor (Bergmann M, et al., 2001, Cancer Res., 61: 8188-93; Muster T, et al., 2004, Int J Cancer 110: 15-21; Kim, et al., 2010, Oncogene 29: 3990-3996; Mansour M, et al., 2011, J. Virol. 85: 6015-6023).

En segundo lugar, los virus son capaces de activar respuestas inmunitarias innatas y adaptativas contra el tumor (Prestwich, RJ et al., 2009, Clin Cancer Res 15: 4374-4381; Kim et al., 2010; Immunol Cartas, 134(1), 30 de noviembre; 134(1):47-54, Ramírez et al., 2010, Discov Med 10: 387-393).

50 Es importante destacar que estas propiedades inmunogénicas inherentes del virus se pueden mejorar adicionalmente mediante la introducción de moléculas inmunoestimuladoras tales como las citocinas y antígenos asociados a tumores en el virus.

55 Los virus como "terapias contra el cáncer de doble mecanismo", tanto para destruir células cancerosas como para inducir una respuesta inmunitaria antitumoral, representan una de las nuevas estrategias más prometedoras para tratar el cáncer. La viroterapia reduce la mayor parte del tumor y modula el entorno inmunosupresor mediante la activación de receptores tipo Toll y la expresión de citocinas transgénicas potenciadoras del sistema inmunitario. Las citocinas potenciadoras del sistema inmunitario activan y estimulan las células T específicas del cáncer, que posteriormente eliminan las células tumorales residuales y metastásicas que pueden ser resistentes a la lisis viral. Se ha vuelto cada vez más claro que las respuestas inmunitarias innatas y adaptativas desencadenadas por los virus oncolíticos en un entorno de un tumor que de otro modo serían inmunosupresores son componentes críticos del beneficio clínico de estos agentes terapéuticos. El potencial para modular el entorno inmunodepresor del tumor se debe a la capacidad inherente de muchos virus para ser inductores fuertes de las respuestas inmunitarias

mediadas por células T: el número de células T en el organismo se mantiene en un estado estacionario homeostático a menos que se altere mediante infección o linfopenia. Las respuestas inflamatorias a la mayoría de los patógenos resultan del reconocimiento de los patrones moleculares asociados a los patógenos por los receptores en las células del sistema inmunitario innato, como las células dendríticas (DC) y las células asesinas naturales (NK). Por ejemplo, los receptores tipo Toll reconocen estructuras únicas de los patógenos, tales como los ARN de doble hebra, y la ligación de los receptores tipo Toll señala la producción de citocinas y quimiocinas que reclutan e inducen la expansión de las células T específicas para el patógeno infectante. A diferencia de las células tumorales que no expresan patrones moleculares asociados a patógenos y, por lo tanto, no activan el sistema inmunitario innato, la mayoría de los virus codifican varios ligandos de receptores tipo Toll que activan eficazmente la inmunidad innata. En particular, los virus de ARN son inductores fuertes de respuestas inmunitarias innatas, ya que generan ARN de doble hebra durante la replicación que interactúa eficazmente con los receptores de tipo Toll (Diebold et al., 2003, Nature 424: 324-8.; Shi, Z, et al., 2011, J Biol Chem 286: 4517-4524; Ahmed, M, et al., 2009, J Virol 83: 2962-2975; Appledorn et al., 2011, Clin Vaccine Immunol 18: 150-160). Como consecuencia, tras el suministro intratumoral, la mera presencia de un virus dentro de un tumor puede actuar como una "señal de peligro" para alertar y activar el sistema inmunitario (Gallucci y Matzinger, 2001, Curr Opin Immunol 13: 114-119).

Se informó sobre las propiedades oncolíticas del virus de la influenza con deleciones en el gen NS1 y su falta de replicación en células normales. Sin embargo, los mutantes se limitaron a células tumorales con defectos en la vía del interferón (documento WO2009/007244A2). Los mutantes descritos en el documento WO2009/007244A2 se caracterizan por una falta completa de un sitio de unión a ARN funcional.

Otros mutantes no limitados a células tumorales con defectos en la vía del IFN se atenuaron sólo ligeramente (documento WO2004111249A2). Se informó que la replicación y expresión eficaces del gen heterólogo por el vector descrito en el documento WO2004111249A2, no estaban limitadas en las células competentes para IFN ni era sensible a los efectos del IFN.

Sin embargo, el vector del documento WO2004111249A2 también crece eficazmente en células y animales normales (competentes para IFN). Es importante destacar que, en contraste con el vector descrito en la presente invención, este no tiene un fenotipo de replicación condicional óptimo. Por lo tanto, no cumple un requisito importante para un enfoque de viroterapia.

El virión de la influenza consiste en un núcleo interno de ribonucleoproteína (una nucleocápside helicoidal) que contiene el genoma de ARN de hebra sencilla y una envoltura de lipoproteína externa revestida en su interior por una proteína de matriz (M1). El genoma segmentado de los virus de la influenza A y B consta de ocho segmentos, siete para la influenza A, de ARN de hebra sencilla de polaridad negativa y lineal que codifican once, algunas cepas de influenza A diez, polipéptidos, incluidas las proteínas de ARN polimerasa dependientes de ARN (PB2, PB1 y PA) y la nucleoproteína (NP) que forman la nucleocápside; las proteínas de membrana de matriz (M1, M2 o BM2 para la influenza B, respectivamente); dos glicoproteínas de superficie que se proyectan desde la envoltura que contiene lípidos: hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA); la proteína no estructural (NS1) y la proteína de exportación nuclear (NEP). Los virus de la influenza B también codifican NB, una proteína de membrana que podría tener actividad de canal iónico y la mayoría de las cepas de influenza A también codifican una undécima proteína (PB1-F2) que se cree que tiene propiedades proapoptóticas. La transcripción y replicación del genoma se lleva a cabo en el núcleo y el ensamblaje se produce mediante la gemación en la membrana plasmática. Los virus pueden reordenar genes durante infecciones mixtas. El virus de la influenza se adsorbe a través de la HA a los sialiloligosacáridos en las glicoproteínas y glicolípidos de la membrana celular. Después de la endocitosis del virión, se produce un cambio conformacional en la molécula de HA dentro del endosoma celular que facilita la fusión de la membrana, lo que desencadena la eliminación del recubrimiento. La nucleocápside migra al núcleo donde se transcribe el ARNm viral. El ARNm viral se transcribe y procesa mediante un mecanismo único en el que la endonucleasa viral escinde el extremo 5' protegido de los ARNm heterólogos celulares que a continuación sirven como cebadores para la transcripción de moldes de ARN viral mediante la transcriptasa viral. Los transcritos terminan en los sitios de 15 a 22 bases desde los extremos de sus moldes, donde las secuencias de oligo(U) actúan como señales para la adición de tramos de poli (A). De las ocho moléculas de ARN virales del virus de la influenza A así producidas, seis son mensajes monocistrónicos que se traducen directamente a las proteínas que representan HA, NA, NP y las proteínas de la polimerasa viral, PB2, PB1 y PA. Las otras dos transcripciones se someten a empalmes, cada una de las cuales produce dos ARNm que se traducen en diferentes marcos de lectura para producir M1, M2, NS1 y NEP. En la mayoría de los virus de la influenza A, el segmento 2 también codifica una segunda proteína (PB1-F2), expresada a partir de un marco de lectura solapante. En otras palabras, los ocho segmentos de ARN virales codifican once proteínas: nueve proteínas estructurales y 2 no estructurales (NS1, PB1-F2).

Existe una necesidad constante e insatisfecha de viroterapia que destruye eficazmente una amplia variedad de células tumorales y tumores, pero está suficientemente atenuada en células o tejidos normales.

Breve descripción de la invención

La invención se define como en las reivindicaciones.

5 El problema se resuelve mediante la presente invención.

Se proporciona un virus que no se limita al tratamiento de células tumorales con defectos en la vía del IFN. Este virus no solo ha retenido la capacidad de replicación en las células tumorales sensibles a IFN, sino que también está suficientemente atenuado y tiene replicación deficiente en las células normales.

10 Además de las ventajas comunes entre los virus utilizados para la viroterapia, tales como fuertes propiedades inmunoestimuladoras mediante la inducción de IFN tipo I y quimiocinas, y la especificidad del virus para las células cancerosas debido a sus defectos en las vías antivirales y apoptóticas, la presente invención proporciona una viroterapia que está basada en el virus de la influenza que tiene características que permiten explotar completamente el potencial de la viroterapia contra el cáncer al combinar las características funcionales de:

(i) Construcción de virus de la influenza con un gen NS que codifica una proteína NS1 truncada que consta de 106 aminoácidos del extremo N de la proteína NS1 respectiva. La longitud de la proteína NS1 se correlaciona inversamente con el nivel de atenuación. Esta característica del virus del NS1 permite elegir la longitud de la proteína NS1, que está asociada con la destrucción eficaz del tumor, pero aún está lo suficientemente atenuada en el anfitrión como para permitir una aplicación segura del virus. En particular, en contraste con otros enfoques que dependen de células tumorales defectuosas en la ruta del interferón, se definen mutantes NS que permiten también dirigirse a las células cancerosas que no tienen un defecto en la ruta del interferón.

(ii) Para los virus de la influenza, existen múltiples subtipos definidos serológicamente. En esta invención, se pueden obtener diferentes subtipos del virus de la influenza oncolíticos intercambiando las glicoproteínas de superficie antigénicas del virus. La disponibilidad de tales variantes facilita la administración repetida eficaz. Es importante destacar que la disponibilidad de diferentes tipos de virus de la influenza (influenza A, B y C) permite no solo eludir las respuestas inmunitarias mediadas por las células B sino también por las células T al vector.

El mutante de la invención se define como en las reivindicaciones y tiene un fenotipo de replicación condicional óptimo para viroterapia contra el cáncer. Específicamente, aunque la atenuación en las células normales es un requisito previo para un enfoque de viroterapia, este mutante no se limita a ser utilizado contra las células tumorales que son defectuosas en la vía del interferón. Tiene la capacidad de replicarse en células tumorales sensibles a interferón y resistentes a interferón. Es importante destacar que la replicación del vector es esencial para que se exprese la citocina insertada. La inducción de citocinas en el tejido tumoral es beneficiosa para activar respuestas inmunitarias innatas y adaptativas, y la replicación del virus permite la expresión de genes propios y heterólogos y destruir directamente las células cancerosas por lisis.

El vector de virus de la invención para viroterapia se define como en las reivindicaciones y tiene el equilibrio óptimo entre la atenuación en células normales y tiene la capacidad de replicar y expresar genes foráneos de manera eficaz también en células tumorales sensibles a IFN (competentes para IFN), y se caracteriza por que comprende una proteína NS1 que consta de 106 aminoácidos del extremo N-terminal de la proteína NS1 de tipo salvaje respectiva, que (i) retiene el sitio de unión funcional al ARN (aa 1-73) y (ii) carece de partes esenciales del dominio efector (aa 123-207, específicamente 117-207) de acuerdo con la numeración de aminoácidos de la secuencia de tipo salvaje (SEQ ID NO. 1).

La presente invención proporciona así un vector de virus de la influenza recombinante que comprende un gen NS que codifica una proteína NS1 truncada que consta de 106 aminoácidos del extremo N de la proteína NS1 de tipo salvaje respectiva y una secuencia heteróloga no viral que codifica un polipéptido inmunoestimulador, en donde dicho vector

(i) replica en células de melanoma sensibles a IFN y no replica en células normales, no tumorales, y
 (ii) expresa un polipéptido inmunoestimulador heterólogo.

Según una realización específica de la invención, el virus de la influenza es el virus de la influenza tipo A.

En otra realización de la invención, dicho virus de la influenza tiene un fenotipo inductor de IFN.

Según la invención, el virus de la influenza comprende un gen NS que codifica una proteína NS1 que consta de 106 aminoácidos del extremo N de la proteína NS1 y un polipéptido inmunoestimulador heterólogo. En una realización específica, es un virus de la influenza del NS106-GM-CSF, por lo tanto, dicho gen NS del virus de la influenza codifica los 106 aminoácidos N-terminales de la proteína NS1 y GM-CSF.

Según una realización de la invención, las células tumorales sensibles a IFN se seleccionan del grupo que consiste en células de melanoma.

5 Según una realización de la invención, el gen NS1 del vector del virus de la influenza se modifica adicionalmente por mutaciones en la región no codificante.

Según una realización de la invención, el vector del virus de la influenza comprende modificaciones de los genes que codifican las proteínas NA y/o HA.

10 Según una realización adicional de la invención, el virus de la influenza comprende modificaciones de los genes de polimerasa que codifican las proteínas PB1, PB2 y/o PA.

15 Según una realización adicional de la invención, el virus de la influenza comprende modificaciones de los genes que codifican las proteínas M y/o NP.

Según una realización adicional de la invención, el polipéptido heterólogo se selecciona del grupo que consiste en antígenos asociados a tumores, citocinas, IL2, IL15, GM-CSF, IL-15, MIP1 alfa y MIP3 alfa.

20 La presente invención también proporciona una formulación inmunogénica que comprende un virus de la influenza de acuerdo con la invención y un excipiente fisiológicamente aceptable.

Según la invención, el vector del virus de la influenza se puede utilizar en la preparación de un medicamento para el tratamiento terapéutico de un sujeto. Específicamente, se puede utilizar en el tratamiento del cáncer.

25 La invención también proporciona un método in vitro para producir un vector del virus de la influenza de la invención, en donde dicho virus se cultiva en presencia de células tumorales.

30 Como alternativa, se proporciona un método in vitro en donde se produce el virus de la influenza de la invención, en donde dicho virus está expresando una citocina y en donde dicho virus se obtiene al pasar dicho virus de la influenza por las células tumorales.

La invención también proporciona una combinación de al menos dos vectores de virus de la influenza de acuerdo con la invención, en donde dichos virus son de diferentes tipos.

35 La realización de la invención también cubre una combinación del virus de la influenza de la invención para su uso en la inmunización de refuerzo principal, específicamente para su uso combinado con moléculas inmunomoduladoras.

40 La realización de la invención también cubre una combinación de virus de la influenza de la invención, en donde la molécula inmunomoduladora es una proteína, específicamente un anticuerpo, más específicamente antagonistas de CTLA-4, PD-1 o 4-1BB21.

Figuras

45 Figura 1: El antagonista de interferón NS1 se truncó C-terminalmente hasta 106 aminoácidos, haciendo que el virus se atenuara en células competentes para interferón. El marco de lectura abierto de GM-CSF murino se fusionó con el C-terminal de NS106 a través de un péptido 2A derivado del virus de la fiebre aftosa. Tras la traducción de la proteína de fusión NS106-2A-mGM-CSF, el péptido 2A auto-escindible libera mGM-CSF permitiendo que sea secretada a través de la vía ER-Golgi.

50 Figura 2: El antagonista de interferón NS1 se truncó C-terminalmente hasta 106 aminoácidos, haciendo que el virus se atenuara en células competentes para interferón. El marco de lectura abierto de la proteína fluorescente verde (GFP) se fusionó con el C-terminal de NS106 a través de un péptido 2A derivado del virus de la fiebre aftosa. Tras la traducción de la proteína de fusión NS106-2A-mGFP, el péptido 2A autoescindible libera GFP.

55 Figura 3: Inmunotransferencia: mGM-CSF en sobrenadantes de células Vero infectadas con los virus indicados. Calle 1: delNS106-2A-GFP; calle 2: delNS106-2A-mGM-CSF; Calle 3 y 4: 1 ng y 5 ng de mGM-CSF recombinante expresado en E. coli.

60 Figura 4: Análisis mediante RT-PCR de virus sometidos a pases que demuestra la estabilidad genética de los segmentos quiméricos de NS. Los virus quiméricos obtenidos de la transfección se pasaron en serie siete veces en células Vero. La RT-PCR se realizó a partir de ARN viral aislado de sobrenadantes de cultivo celular utilizando oligonucleótidos homólogos al segmento NS. Los controles de PCR se incluyeron utilizando los respectivos ADN de plásmido del virus quimérico delNS106 como moldes. 1: delNS106-2A-GFP; 2: control

delNS106-2A-GFP RT-negativo; 3: control de plásmido pHW-delNS106-2A-GFP; 4: control de plásmido pHW-delNS106-2A-mGM-CSF; 5: delNS106-2A-mGM-CSF; 6: Control negativo para RT delNS106- 2A-mGM-CSF.
 Figura 5: Crecimiento del virus en células de melanoma humano y melanocitos epidérmicos humanos normales. Las células se infectaron con una MOI de 0,1, y los sobrenadantes recolectados 72 horas después se analizaron para detectar títulos infecciosos mediante ensayo TCID₅₀ en células Vero.
 Figura 6: Secuencia de nucleótidos delNS106-2A-mGM-CSF (SEQ ID NO. 2).
 Figura 7: Secuencia de aminoácidos de NS106-2A-mGM-CSF (SEQ ID NO. 3). El NS1 truncado se indica en letras en negrita, el péptido 2A en letras subrayadas y mGM-CSF en letras cursivas.
 Figura 8: Secuencia de nucleótidos de delNS106-2A-GFP (SEQ ID NO. 4).
 Figura 9: Secuencia de aminoácidos de NS106-2A-GFP (SEQ ID NO. 5). El NS1 truncado se indica en letras en negrita, el péptido 2A en letras subrayadas y GFP en letras cursivas.
 Figura 10: Secuencia de aminoácidos del virus de la influenza de tipo salvaje PR8 NS1 (SEQ ID NO. 1).

Descripción detallada de la invención

La invención se define como en las reivindicaciones.

Un virus de la influenza que codifica al menos los primeros 73 aminoácidos del gen NS1 que contiene el sitio de unión al ARN, pero no los aminoácidos N-terminales de la posición de aminoácidos 123 a 161 que contienen el llamado dominio efector, combina fenotipos altamente deseables para un candidato a terapia de viral. Aunque carecen de la capacidad de bloquear la expresión de IFN, estas construcciones conservan la capacidad de replicarse en células tumorales competentes para interferón. Como consecuencia, se induce IFN en el tejido tumoral mientras que la replicación viral permite la expresión de sus genes y la destrucción de las células tumorales. Si bien este mutante aún crece en células tumorales competentes para IFN, muestra al menos 90 veces, específicamente al menos 100 veces, específicamente al menos 110 veces, específicamente al menos 120 veces, específicamente al menos 130 veces, específicamente al menos 140 veces, más específicamente al menos 150 veces menor tasa de replicación en células normales tales como melanocitos o cualquier otra célula no tumoral en comparación con la tasa de replicación en las células tumorales competentes para IFN.

Un vector de virus de la influenza recombinante como se menciona en las reivindicaciones tiene el equilibrio óptimo entre replicarse suficientemente en células tumorales sensibles a IFN e IFN y ser atenuado o incluso tener replicación deficiente en células normales. Esta es una característica de seguridad importante que permite su uso en pacientes.

El término "suficientemente atenuado" de acuerdo con la invención se refiere a una reducción de la tasa de crecimiento de al menos 100 veces entre las células tumorales sensibles a IFN y las células normales tales como, pero sin limitación, melanocitos primarios.

Según la presente descripción, un método para determinar la deficiencia de replicación de un virus de la influenza puede ser el siguiente: la cantidad de virus infeccioso según se determina en el sobrenadante aproximadamente 72 horas (entre 60 y 96 horas) después de la infección (virus de salida) de los melanocitos debe ser menor en comparación con la cantidad de virus infeccioso utilizado en un inóculo para la infección (virus de entrada) de dichas células. Como ejemplo, pero sin limitar el alcance de la descripción, si se utiliza un inóculo de TCID₅₀ 4,7log para la infección por virus y TCID₅₀ 3,4log después de obtener la infección en el sobrenadante de las células infectadas, es una clara indicación de que el virus tiene replicación deficiente.

Por lo tanto, se proporciona un vector de virus de la influenza recombinante que comprende un gen NS aislado que codifica una proteína NS 1 truncada que consta de 106 aminoácidos del extremo N de la respectiva proteína NS1 de tipo salvaje y un marco de lectura abierto consecutivo que codifica una proteína inmunoestimuladora heteróloga, en donde dicho vector

- (i) se replica en células de melanoma sensibles a IFN y no replica o tiene una tasa de replicación muy reducida en células normales, y
- (ii) expresa un polipéptido inmunoestimulador heterólogo.

Por lo tanto, se proporciona un virus de la influenza que permite una alta expresión estable de una proteína heteróloga.

Los vectores virales resultantes de acuerdo con la presente invención son específicamente útiles para múltiples propósitos, tales como vectores virales oncolíticos que expresan un transgén en un microambiente tumoral, vectores antigénicos para inducir una inmunidad contra moléculas patógenas y virus con esqueleto de vacuna genéticamente estables.

El término "aislado" se refiere a una preparación, aislamiento y/o purificación purificada in vitro de una molécula de ácido nucleico tal como un vector, plásmido o un virus de acuerdo con la presente invención, de modo que no se asocie con sustancias in vivo, o esté sustancialmente purificado de sustancias in vitro. Una preparación de virus aislada generalmente se obtiene mediante cultivo y propagación in vitro y está sustancialmente libre de otros agentes infecciosos.

Un virus "recombinante" es aquel que ha sido manipulado in vitro, por ejemplo, utilizando técnicas de ADN recombinante, para introducir cambios en el genoma viral, o generado de otra manera artificialmente.

Según la invención, el término "sensibilidad a IFN" con respecto a las células tumorales sensibles a IFN se define como al menos 25% de reducción de la proliferación celular en presencia de IFN α -2a en comparación con los niveles de proliferación celular en ausencia de IFN α -2a. Para determinar la reducción mediada por IFN α -2a del crecimiento celular de líneas celulares tumorales, se incuban un total de 2.500 células con 5.000 U.I./ml de IFN α -2a durante 4 días. La proliferación celular se determina mediante el ensayo de proliferación WST-1 (Muster et al., 2004).

Como se emplea en la invención, el término "polipéptido" se refiere a un polímero de aminoácidos y no se refiere a una longitud específica del producto; así, los péptidos, oligopéptidos y proteínas se incluyen dentro de la definición de polipéptido. Este término tampoco se refiere o excluye modificaciones posteriores a la expresión del polipéptido, por ejemplo, glicosilaciones, acetilaciones, fosforilaciones y similares. Se incluyen dentro de la definición, por ejemplo, polipéptidos que contienen uno o más análogos de un aminoácido (incluidos, por ejemplo, aminoácidos no naturales, etc.), polipéptidos con enlaces sustituidos, así como otras modificaciones conocidas en la técnica, ambas de origen natural y de origen no natural.

Como se emplea en esta solicitud, el término "aminoácido" significa uno de los ácidos aminocarboxílicos naturales de los que están compuestas las proteínas. El término "polipéptido" como se describe en la presente memoria se refiere a un polímero de residuos de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos, producidos de forma natural o sintética. Los polipéptidos de menos de aproximadamente 10 residuos de aminoácidos se denominan comúnmente "péptidos".

Una "proteína" es una macromolécula que comprende una o más cadenas de polipéptidos. Una proteína también puede comprender componentes no peptídicos, tales como grupos carbohidratados. Los carbohidratos y otros sustituyentes no peptídicos pueden ser añadidos a una proteína por la célula en la que se produce la proteína, y variarán con el tipo de célula. Las proteínas se definen en la presente memoria en términos de sus estructuras principales de aminoácidos; los sustituyentes tales como los grupos carbohidratados generalmente no se especifican, pero pueden estar presentes, no obstante.

Una secuencia de polipéptidos o aminoácidos "derivada de" una secuencia de ácido nucleico designada se refiere a un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos idéntica a la de un polipéptido codificado en la secuencia, o una porción de la misma en la que la porción consiste en al menos 15 aminoácidos, preferiblemente al menos 20 aminoácidos, más preferiblemente al menos 30 aminoácidos, e incluso más preferiblemente al menos 50 aminoácidos, o que es inmunológicamente identificable con un polipéptido codificado en la secuencia. Esta terminología también incluye un polipéptido expresado a partir de una secuencia de ácido nucleico designada. La longitud máxima del polipéptido heterólogo respectivo codificado por la secuencia del gen NS es de 600 aminoácidos, específicamente 500, específicamente 400, específicamente 300, específicamente 200, específicamente 150, específicamente 100 aminoácidos.

En general, se genera una respuesta inmunitaria a un antígeno a través de la interacción del antígeno con las células del sistema inmunitario. Las respuestas inmunitarias se pueden clasificar ampliamente en dos categorías: respuestas inmunitarias humorales y mediadas por células (p. ej., tradicionalmente caracterizadas por mecanismos de protección de anticuerpos y efectores celulares, respectivamente). Estas categorías de respuesta se han denominado respuesta de tipo Th1 (respuesta mediada por células) y respuesta inmunitaria de tipo Th2 (respuesta humoral).

La estimulación de una respuesta inmunitaria puede ser el resultado de una respuesta directa o indirecta de una célula o componente del sistema inmunitario a la exposición a un inmunógeno. Las respuestas inmunitarias se pueden medir de muchas maneras, incluida la activación, proliferación o diferenciación de células del sistema inmunitario (p. ej., células B, células T, células dendríticas, APC, macrófagos, células NK, células NKT, etc.); expresión regulada por incremento o por disminución de marcadores y citocinas; estimulación del título de IgA, IgM o IgG; esplenomegalia (incluido el aumento de celularidad del bazo); hiperplasia e infiltrados celulares mixtos en varios órganos. En la técnica se conocen otras respuestas, células y componentes del sistema inmunitario que pueden evaluarse con respecto a la estimulación inmunitaria.

Se sabe que los perfiles de citoquinas pueden determinar las funciones reguladoras y efectoras de las células T en las respuestas inmunitarias. En algunas realizaciones, se pueden inducir citocinas de tipo Th1 y, por lo tanto, el polipéptido inmunoestimulador de la presente invención puede promover una respuesta inmunitaria específica de antígeno de tipo Th1 que incluye células T citotóxicas. Sin embargo, en otras realizaciones, se pueden inducir citocinas de tipo Th2 promoviendo así una respuesta inmunitaria específica de antígeno de tipo Th2.

El término "polipéptido inmunoestimulante o inmunoestimulador" se refiere a cualquier polipéptido inmunogénico, que puede ser, pero no se limita a, quimiocinas, específicamente a citocinas, factores de crecimiento hematopoyéticos, antígenos asociados a tumores, inmunógenos de melanoma, etc.

El término "citocina" o "quimiocina" se refiere a moléculas bioactivas derivadas de las células y capaces de afectar al comportamiento de las células, p. ej. crecimiento, migración, capacidad de destrucción, diferenciación, secreción, etc.

Las quimiocinas, originalmente derivadas de las citocinas quimioatrayentes, en realidad comprenden más de 50 miembros y representan una familia de proteínas pequeñas, inducibles y secretadas de bajo peso molecular (6-12 kDa en su forma monomérica) que desempeñan un papel decisivo durante los procesos de inmunovigilancia e inflamatorios. Dependiendo de su función en la inmunidad y la inflamación, se pueden distinguir en dos clases. Las quimiocinas inflamatorias son producidas por muchas células de tejido diferentes, así como por leucocitos inmigrantes en respuesta a toxinas bacterianas y citocinas inflamatorias como IL-1, TNF e interferones. Las quimiocinas de referencia, por otro lado, se expresan constitutivamente en áreas definidas de los tejidos linfoides. Dirigen el tráfico y la búsqueda de linfocitos y células dendríticas dentro del sistema inmunitario. Estas quimiocinas, como se ilustra por BCA-1, SDF-1 o SLC, controlan la reubicación y recirculación de linfocitos en el contexto de la maduración, diferenciación, activación y aseguran su correcta localización dentro de los órganos linfoides secundarios.

De acuerdo con la presente invención, se ha demostrado que las citocinas o quimiocinas biológicamente activas o sus derivados o fragmentos pueden ser expresados de manera estable y eficaz por el presente vector del virus de la influenza.

De acuerdo con la invención, las proteínas se pueden seleccionar entre, pero no están limitadas al grupo que consiste en IL2, IL15, GM-CSF, MIP 1 alfa, MIP3 alfa o fragmentos funcionales o derivados de los mismos.

La secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido heterólogo se puede fusionar directamente al extremo 3' del gen que codifica la proteína NS1 truncada a través de secuencias enlazadoras cortas de hasta 20 aminoácidos de longitud. Dichas secuencias enlazadoras pueden ser, entre otras, secuencias virales 2A. Dichos péptidos 2A pueden ser de la familia de virus Picornaviridae, tales como el virus de la fiebre aftosa (FMDV) y el virus de la rinitis equina A (ERAV), y otros virus como tales como el tescovirus-1 porcino y el virus del insecto *Thosea* asigna virus (TaV)³. Las secuencias 2A son péptidos relativamente cortos, de aproximadamente 20 aminoácidos de longitud, dependiendo del virus de origen, y pueden comprender el motivo de consenso Asn-Pro-Gly-Pro.

Específicamente, el virus de la influenza se obtiene a partir del virus de la influenza A, el virus de la influenza B o el virus de la influenza C.

La proteína NS1 del virus de la influenza es una proteína multifuncional que consta de 230 a 280 aminoácidos y se sintetiza temprana y abundantemente en la infección. Contrarresta las actividades antivirales celulares y es un factor de virulencia. Mediante la actividad de su región carboxi terminal, la proteína NS1 puede inhibir los mecanismos de procesamiento del ARNm del anfitrión.

Adicionalmente, facilita la traducción preferente del ARNm viral por interacción directa con el factor de iniciación de la traducción celular. Al unirse al ARNdh e interactuar con las supuestas quinasas celulares, la proteína NS1 puede prevenir la activación de la quinasa activada por ARNdh (PKR) inducible por interferón (IFN), el sistema 2'5'-oligoadenilato sintetasa y los factores de transcripción de citocinas.

La porción N terminal de NS1 se une a RIG-I e inhibe la activación aguas abajo de IRF-3, evitando la inducción transcripcional de IFN- β . Por lo tanto, la proteína NS1 inhibe la expresión de los genes IFN- α o IFN- β , retrasa el desarrollo de la apoptosis en las células infectadas y evita la formación del estado antiviral en las células vecinas.

La proteína NS1 del vector del virus de la influenza según la invención comprende un dominio de unión a ARN funcional. La función principal de este dominio ubicado en el extremo amino de la proteína NS1 (aminoácidos 1-73) es unir ARNdh e inhibir la vía 2'5'oligo (A) sintetasa/ARNasa L (Min J. et al., Proc. Natl. Acad. Sci, 2006, 103: 7100-7105; Chien et al., Biochemistry, 2004, 43(7): 1950-62) así como la activación de una ARN helicasa citoplasmática, RIG-I, proteína I inducible por ácido retinoico (Yoneyama M. et al., Nat. Immunol., 2004, 5: 730-737).

El segmento del gen NS del virus de la influenza tipo A/Puerto Rico/8/34 (PR8) se puede encontrar en GenBank (p. ej., GenBank Núm. AF389122.1 GI21693177). El marco de lectura abierto para NSI de PR8 es de los nucleótidos 27 a 719. En realizaciones específicas, el ORF de NSI es sometido a optimización de codones adicional (sin cambiar la secuencia de la proteína) para, p. ej., evitar secuencias repetitivas, aumentar la expresión de la proteína y/o

5 aumentar la estabilidad del segmento del gen NS. Los mecanismos para la optimización de codones son conocidos en la técnica.

Específicamente, el vector del virus de la influenza de la invención es como se menciona en las reivindicaciones y comprende un gen NS que codifica una proteína NS1 truncada que consta de 106 aminoácidos del extremo N de la proteína NS1 de tipo salvaje respectivo.

10

El vector del virus de la influenza recombinante de la invención es un virus delNS106, que comprende un gen NS que codifica una proteína NS1 truncada que consta de 106 aminoácidos del extremo N de la proteína NS1 y que expresa adicionalmente un polipéptido inmunoestimulador heterólogo, específicamente una citocina o derivado funcional del mismo.

15

Según una realización adicional, el vector del virus de la influenza de la invención comprende un gen NS que codifica la proteína NS1 truncada de 106 aminoácidos y un polipéptido inmunoestimulador heterólogo, en donde dicho polipéptido puede estar dentro del mismo marco de lectura, opcionalmente separado por una secuencia enlazadora de hasta 100 nucleótidos.

20

Según la invención, las partes esenciales del dominio efector, tales como los sitios de interacción PKR (Mok et al., J Virol., 86: 12695) de la proteína NS1 del vector del virus de la influenza se eliminan. El dominio efector interactúa con proteínas celulares para inhibir la exportación nuclear de ARNm. El dominio efector se encuentra en la porción C-terminal de la proteína NS1. Según Schultz et al., el dominio efector se encuentra específicamente entre los residuos de aminoácidos 117 y 161, otra bibliografía ubica el dominio efector entre 134 y 161.

25

De acuerdo con una realización de la invención, los segmentos del gen de la influenza se pueden obtener a partir de la misma o de diferentes cepas de influenza, ya sean pandémicas o interpandémicas. Esto puede dar lugar a una variedad de virus de la influenza que combinan los genes de las glicoproteínas de superficie hemaglutinina (HA) y/o neuraminidasa (NA) de virus interpandémicos actuales con cinco o seis o siete segmentos de ARN que codifican otras proteínas de la cepa maestra atenuada, es decir, combinación 6/2 o reordenamiento 7/1 o reordenamiento 5/3 que contiene segmentos HA, NA y M de una cepa circulante respectivamente.

30

Los ejemplos de virus de la influenza A incluyen los subtipos H10N4, H10N5, H10N7, H10N8, H10N9, HI 1N1, HI 1N13, HI 1N2, HI 1N4, HI 1N6, HI 1N8, HI 1N9, H12N1, H12N4, H12N5, H12N8, H13N2, H13N3, H13N6, H13N7, H14N5, H14N6, H15N8, H15N9, H16N3, H1N1, H1N2, H1N3, H1N6, H1N9, H2N1, H2N2, H2N3, H2N5, H2N7, H2N8, H2N9, H3N1, H3N2, H3N3, H3N4, H3N5, H3N6, H3N8, H3N9, H4N1, H4N2, H4N3, H4N4, H4N5, H4N6, H4N8, H4N9, H5N1, H5N2, H5N3, H5N4, H5N6, H5N7, H5N8, H5N9, H6N1, H6N2, H6N3, H6N4, H6N5, H6N6, H6N7, H6N8, H6N9, H7N1, H7N2, H7N3, H7N4, H7N5, H7N7, H7N8, H7N9, H8N4, H8N5, H9N1, H9N2, H9N3, H9N5, H9N6, H9N7, H9N8, y H9N9. Son específicamente preferidos H1N1, H1N2, H3N2 y H5N1.

35

40

La glicoproteína HA puede ser de cualquier subtipo, específicamente del subtipo HI y H3.

El término "fenotipo inductor de IFN" según la invención significa que se pueden detectar cantidades significativas de IFN en sobrenadantes de células infectadas con el vector viral.

45

Las células tumorales pueden ser cualquier célula implicada en el crecimiento tumoral y la metástasis, obtenidas u originadas específicamente a partir de tumores sólidos. Específicamente, dichas células pueden seleccionarse del grupo de células de melanoma, tales como, pero sin limitación, células SK-Mel 28 y SK-Mel 1, 518A2, células de carcinoma de colon como, por ejemplo, células COCA 2, células de glioma, células de cáncer de pulmón o células de cáncer de mama.

50

Las "células tumorales sensibles a IFN", tales como, pero sin limitarse a, 518A2, presentan reducción del crecimiento celular en presencia de IFN α -2a a más del 50%. Las "células tumorales resistentes a interferón" tales como, entre otras, SK-Mel1 tienen inhibido su crecimiento a menos de 50%. Para determinar el crecimiento celular, las células se incuban en presencia de 5.000 UI/ml de IFN α -2a durante 4 días y se determina la proliferación celular. La proliferación celular en ausencia de IFN- α -2a se considera 100%.

55

Específicamente, las modificaciones en las regiones no codificantes del gen NS1 pueden ser, pero no están limitadas a los primeros 8 nucleótidos en los extremos 5' y 3', sin embargo, no están limitados a las regiones conservadas.

60

- 5 El vector del virus de la influenza puede contener adicionalmente modificaciones de los genes que codifican las proteínas NA y/o HA, M o NP, modificaciones de los genes de polimerasa que codifican las proteínas PB1, PB2 y/o PA. Específicamente, dichas modificaciones dan como resultado la delección o reemplazo o inserción de aminoácidos dentro de dichas proteínas que pueden dar como resultado modificaciones de funcionalidad, antigenicidad, estructura secundaria de las proteínas así modificadas.
- 10 El vector del virus de la influenza de la invención se puede formular como una preparación farmacéutica que opcionalmente contiene aditivos, portadores y/o estabilizadores farmacéuticamente aceptables.
- 10 El término "farmacéuticamente aceptable" significa aprobado por una agencia reguladora del gobierno Federal o Estatal o enumerado en los EE.UU.
- 15 El término "portador" se refiere a un diluyente, coadyuvante, excipiente o vehículo con el que se administra la composición farmacéutica (p. ej., formulación inmunogénica o de vacuna). Las soluciones salinas y las soluciones acuosas de dextrosa y glicerol también se pueden emplear como portadores líquidos, particularmente para soluciones inyectables. Los excipientes adecuados incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, tiza, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche descremada en polvo, glicerol, propileno, glicol, agua, etanol y similares. Los ejemplos de vehículos farmacéuticos adecuados se describen en "Remington's Pharmaceutical Sciences" de E.W. Martin. La formulación debe seleccionarse de acuerdo con el modo de administración. La formulación particular también puede depender de si el virus está vivo o inactivo.
- 20 El término coadyuvante se refiere a un compuesto o mezcla que mejora la respuesta inmunitaria a un antígeno. El término "estabilizadores" se refiere a cualquier agente que pueda aumentar la estabilidad del virus de la invención, por ejemplo, puede ser albúmina de suero bovino, azúcares, quitosano, dextranos, PEG, etc.
- 25 Los métodos de administración incluyen, pero no están limitados a, las vías intratumoral, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, intranasal, epidural u oral.
- 30 En una realización preferida, puede ser deseable introducir el medicamento en los pulmones por cualquier vía adecuada. También se puede emplear la administración pulmonar, utilizando p. ej. un inhalador o nebulizador o se puede formular con un agente aerosolizante.
- 35 La preparación farmacéutica también se puede administrar mediante un sistema de liberación controlada, como una bomba.
- Alternativamente, se proporciona una solución de infusión lista para su uso. Alternativamente, la preparación puede formularse como un polvo que se disuelve en soluciones acuosas apropiadas inmediatamente antes de la aplicación.
- 40 El vector del virus de la influenza de la invención se puede utilizar en la preparación de un medicamento para el tratamiento terapéutico de un sujeto, específicamente se puede utilizar para viroterapia, específicamente para el tratamiento de tumores o el tratamiento oncolítico del cáncer.
- 45 La cantidad de la composición farmacéutica de la invención que será eficaz en el tratamiento de un trastorno o afección concretos dependerá de la naturaleza del trastorno o afección, y se puede determinar mediante técnicas clínicas convencionales. Además, pueden emplear opcionalmente ensayos in vitro para ayudar a identificar intervalos de dosificación óptimos. La dosis precisa que se empleará en la formulación también dependerá de la vía de administración y la gravedad de la enfermedad o trastorno, y se debe decidir de acuerdo con el criterio del profesional y las circunstancias de cada paciente. Sin embargo, la dosis adecuada para la administración oscila generalmente de aproximadamente 10^4 - 5×10^8 ufp y se puede administrar una vez o varias veces con intervalos tan frecuentes como sea necesario. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención que comprenden 10^4 - 5×10^8 ufp de los virus de la invención se pueden administrar por vía intratumoral, intranasal, intratraqueal, intramuscular o subcutánea. Las dosis eficaces se pueden extrapolar a partir de curvas de dosis-respuesta derivadas de sistemas de prueba in vitro o de modelos animales.
- 50 El término "tratamiento oncolítico del cáncer" significa tratar las células cancerosas con un agente tal como un virus que destruye específicamente las células cancerosas, pero no daña las células normales.
- 55 La combinación de al menos dos vectores de virus de la influenza según la invención en donde dichos virus son de diferentes tipos también está cubierta. También está cubierta por la realización de la invención una combinación de tres o más.
- 60 Una combinación específica de vectores de virus puede ser una combinación de virus de la influenza A y B o virus de la influenza A y C o virus de la influenza B y C.

El término "inmunización de sensibilización y refuerzo" significa que se administran inmunizaciones múltiples, es decir, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco inmunizaciones. La inmunización de sensibilización-refuerzo se puede realizar mediante la administración de los mismos vectores de virus de la influenza o combinaciones de los mismos (sensibilización y refuerzo homólogo), sin embargo, como alternativa, se pueden administrar diferentes vectores de virus de la influenza o combinaciones de los mismos como sensibilización y refuerzo heterólogo. Dicho vector del virus de la influenza se puede combinar adicionalmente con moléculas inmunomoduladoras, preferiblemente se seleccionan, pero no se limitan a enzimas, miembros de la superfamilia de inmunoglobulinas, tales como anticuerpos y dominios de anticuerpos o fragmentos tales como Fab, Fv o scFv, citocinas, antígenos de vacunas, factores de crecimiento y péptidos o antagonistas inmunomoduladores como CTLA-4, PD-1 o 4-1BB21.

Para desarrollar reordenamientos y/o expresión de cepas de virus de la influenza modificadas, se puede utilizar un sistema de genética inversa en las células Vero. La tecnología ya es bien conocida en la técnica (Pleschka S. et al., 1996, J. Virol., 70(6), 4188-4192; Neumann y Kawakita, 1999, Adv. Virus Res., 53, 265-300; Hoffmann et al., 2000, Proc Natl Acad Sci U S A., 97: 6108-13). Alternativamente, se puede utilizar la tecnología basada en RNP como describen Enami y Enami (J. Virol, 2000, 74, 12, págs. 5556-5561) para desarrollar reordenamientos.

Un método in vitro para producir un virus de la influenza también está cubierto por la realización de la invención, en donde dicho virus está expresando una citocina y en donde dicho virus se obtiene mediante pase de dicho virus de la influenza por las células tumorales.

Más específicamente, dicho método se puede describir mediante las etapas de pase del virus de la influenza en las células tumorales, selección del vector del virus de la influenza con mayor tasa de propagación y aislamiento y secuenciación el respectivo virus de la influenza de alto crecimiento.

Los ejemplos descritos en la presente memoria son ilustrativos de la presente invención y no se pretende que sean limitaciones a la misma. Se han descrito diferentes realizaciones de la presente invención de acuerdo con la presente invención. Se pueden realizar muchas modificaciones y variaciones a las técnicas descritas e ilustradas en la presente memoria.

Por consiguiente, se debe entender que los ejemplos son únicamente ilustrativos y no limitan el alcance de la invención, que se define como en las reivindicaciones.

Ejemplos

Ejemplo 1

Células y virus

Se desarrollan líneas celulares de melanoma humano SK-MEL 28 (ATCC, Manassas, VA) y 518 A2 en DMEM (Gibco BRL, Rockville, MD) con un suplemento de FCS al 10% (Gibco BRL). La línea celular de melanoma humano SK-MEL 1 (ATCC) se cultiva en medio esencial mínimo (MEM, Eagle) (Gibco BRL) que contiene FCS al 10%, aminoácidos no esenciales 0,1 mM, piruvato sódico 1,0 mM y BBS de Earle. La línea celular melanocítica primaria NHEM (Szabo Scandic, Viena, Austria) se cultiva en medio de crecimiento de melanocitos (Clonetics Cambrex, East Rutherford, NJ). Las células Vero adaptadas para crecer en medio sin suero (ATCC) se mantienen en medio AIMV sin suero (Gibco BRL). El virus de la influenza de tipo salvaje contiene un segmento del gen NS wt transfectedo y codifica una proteína NS1 de tipo salvaje de 230 aminoácidos. NS1-106 contiene un segmento de gen NS con los primeros 106 aminoácidos C-terminales. El virus delNS1 contiene una delección completa en el segmento del gen NS. Para la propagación de los virus, las células Vero se infectan con una multiplicidad de infección (m.o.i.) de 0,1 y se incuban en medio AIMV (Gibco BRL) que contiene 5 µg/ml de tripsina (Sigma) a 37°C durante 3 días. Las concentraciones de virus se determinan mediante ensayos de placa en células Vero.

Replicación viral

Las células se lavan con PBS y se infectan con el virus de tipo salvaje y los mutantes de delección de NS1 correspondientes a una m.o.i. de 0,1. Después de la incubación durante 30 minutos, se retira el inóculo, las células se lavan con PBS, se recubren con medio AIMV sin suero que contiene 2,5 µg/ml de tripsina (Sigma) y se incuban a 37°C durante 48 horas. Los sobrenadantes se analizan para detectar partículas infecciosas de virus en células Vero. Para evaluar el efecto de IFN sobre el crecimiento viral, se incuban 10⁶ células en ausencia o en presencia de 5.000 UI/ml de IFN-2alfa a 37°C durante 16 h. La infección del virus se realiza a partir de entonces. Los títulos de virus se determinan en los sobrenadantes 48 horas después de la infección.

Replicación de mutantes de delección de NS1 en células tumorales competentes para IFN, con deficiencia de IFN y células normales (no malignas)

5 Las líneas celulares tumorales sensibles a IFN y resistentes a IFN, así como las células normales tales como los melanocitos se infectan con diferentes mutantes de delección de NS1 y se determina el título del virus de la progenie en el sobrenadante de las líneas celulares infectadas. Se comparan las propiedades de crecimiento de los diferentes mutantes de delección de NS1. El crecimiento viral se correlaciona bien con la sensibilidad a IFN. En las líneas celulares tumorales más sensibles a IFN (competentes para IFN) 518-A2 y SK-MEL28, el virus delNS1 no crece en absoluto. En contraste, el tipo salvaje y el mutante de delección NS1-106 crecen eficazmente en estas células. En 10 SK-MEL1, que se considera una línea celular resistente a IFN, también creció el mutante delNS1, aunque en menor medida que el tipo salvaje y los otros mutantes de delección de NS. Estos resultados sugieren que la replicación de delNS1 depende de la resistencia a IFN mientras que la replicación de NS1-106 no.

15 Un requisito de un virus que se replica condicionalmente para su uso como agente terapéutico es su crecimiento restringido en células no malignas. Es importante destacar que en los melanocitos NHEM primarios y queratinocitos primarios cultivados que son células presentes en la piel humana normal, solo el tipo salvaje se replica eficazmente pero no el mutante de delección de NS NS 1-106 y delNS 1. En ninguna de estas células, la infección con estos mutantes da como resultado la liberación de partículas infecciosas en el sobrenadante. En contraste, estas líneas celulares apoyan la replicación viral del virus de tipo salvaje.

Sensibilización/refuerzo con candidatos antigénicamente diferentes

25 En el modelo de melanoma de ratón B16 (Overwijk WW, Restifo NP (2001), Current Protocols in Immunology, Capítulo 20), los ratones se tratan 3 veces con un vector de tipo A seguido de tratamiento 3 veces con un vector de tipo B. La actividad antitumoral de la combinación de vectores que pertenecen a diferentes tipos de virus de la influenza es significativamente mejor en comparación con el tratamiento con cualquiera de los dos vectores solos.

Ejemplo 2

30 Se describe la generación y caracterización de un virus con delección de NS1 de influenza A H1N1 que expresa GM-CSF (factor de estimulación de colonias de granulocitos y macrófagos) de ratón. El antagonista de interferón NS1 se truncó C-terminalmente hasta 106 aminoácidos, haciendo que el virus se atenuara en células competentes para interferón.

35 El marco de lectura abierto de GM-CSF murino se fusionó con el extremo C de NS106 a través de un péptido 2A derivado del virus de la fiebre aftosa (Figura 1). Tras la traducción de la proteína de fusión NS106-2A-mGM-CSF, el péptido 2A autoescindible libera mGM-CSF permitiendo que sea secretado a través de la vía ER-Golgi. Alternativamente, el ORF de la proteína verde fluorescente (GFP) se insertó en el segmento delNS106 (Figura 2).

40 El virus delNS106-2A-mGM-CSF y el virus delNS106-2A-GFP se generaron mediante la transfección con ocho plásmidos de células Vero.

45 Los segmentos quiméricos delNS106 demostraron ser genéticamente estables durante siete pases de virus consecutivos en células Vero según se evaluó mediante RT-PCR y secuenciación.

La secreción significativa de mGM-CSF en el sobrenadante de las células Vero infectadas con el virus delNS106-2A-mGM-CSF se demostró mediante ELISA (111 +/- 14 ng/ml) e inmunotransferencia. De forma similar, se observó una fuerte expresión de GFP en células Vero infectadas con el virus delNS106-2A-GFP.

50 Ambos virus crecieron a títulos altos en las células Vero (7,9 +/- 0,3 log10/ml para delNS106-2A-mGM-CSF y 8,6 +/- 0,2 log10/ml para delNS106-2A-GFP) según lo evaluado mediante el ensayo de la dosis infecciosa del 50 por ciento en cultivo de tejido (TCID50).

55 En conclusión, se generaron virus con delección NS1 de Influenza A H1N1 genéticamente estables que expresaban cantidades significativas de GM-CSF murino y GFP y crecían a títulos altos en células Vero.

Cultivo celular

60 Las células Vero se cultivaron en condiciones sin suero en OptiPro SFM (Life Technologies) con un suplemento de GlutaMax I (Life Technologies) 2 mM a 37°C y 5% de CO2. Para la propagación del virus, se añadieron 5 µg/ml de tripsina porcina (Sigma Aldrich) y 250 ng/ml de Anfotericina B (Sigma Aldrich) al medio (Roethl et al., 2011, Antimycotic-antibiotic amphotericin B promotes influenza virus replication in cell culture. J Virol 85, 11139-11145).

Generación y propagación de virus.

Los virus delNS106-2A-mGM-CSF y delNS106-2A-GFP fueron rescatados mediante la transfección de ocho plásmidos de células Vero como se describió anteriormente (Hoffmann et al., 2000, A DNA transfection system for generation of influenza A virus from eight plasmids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 6108-6113; Romanova et al., 2009, Preclinical evaluation of a replication-deficient intranasal DeltaNS1 H5N1 influenza vaccine. *PloS one* 4, e5984; Wacheck et al., 2010, A novel type of influenza vaccine: safety and immunogenicity of replication-deficient influenza virus created by deletion of the interferon antagonist NS1. *The Journal of infectious diseases* 201, 354-362). Los segmentos virales se obtienen de la cepa de vacuna IVR-116 (OMS). Se originan a partir de A/Puerto Rico/8/34 (PA, PB2, NP, M y NS), A/Texas/1/77 (PB1) y A/Nueva Caledonia/20/99 H1N1 (HA, NA). Los segmentos quiméricos delNS106-2A-mGM-CSF y delNS106-2A-GFP se obtuvieron por síntesis génica (Geneart) y se clonaron en pHW2000. Brevemente, las células Vero se tripsinizaron y se resuspendieron en solución Nucleofector. Después de la adición de ocho derivados de pHW2000 (Hoffmann et al., 2000), la codificación de la respectiva electroporación de segmentos virales se realizó con un dispositivo Nucleofector II (Lonza) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células transfectadas se sembraron en placas de 6 pocillos y se incubaron a 37°C y 5% de CO₂. Una vez que se observó un efecto citopático completo, los virus se congelaron a -80°C hasta su uso posterior. El paso de virus en células Vero se realizó en placas de 6 pocillos.

Análisis de la expresión de GM-CSF

Las células Vero se infectaron en medio OptiPro durante 3 horas a 37°C a una multiplicidad de infección de aproximadamente 5. Posteriormente, se añadió suero de ternera fetal a una concentración final de 2,5% v/v para evitar la degradación de GM-CSF.

El análisis de GM-CSF se realizó mediante ELISA (Ebioscience) de acuerdo con las instrucciones del fabricante e inmunotransferencia utilizando un anticuerpo policlonal de conejo anti-GM-CSF de ratón (Abcam) y un producto conjugado de fosfatasa alcalina y anti-IgG de conejo secundario.

Análisis mediante RT-PCR de ARN viral

El ARN viral se aisló de los sobrenadantes de células Vero infectadas utilizando un QIAmp Viral RNA mini kit (Qiagen). El ARN se sometió a transcripción inversa utilizando la transcriptasa inversa Superscript III y el oligonucleótido Uni12 (5'-AGCAAAAGCAGG-3', SEQ ID NO. 6). Como controles negativos, las muestras de ARN se procesaron sin la adición de transcriptasa inversa. La amplificación mediante PCR se realizó con polimerasa Phusion HF (Thermo Scientific) utilizando los oligonucleótidos NSRTLen (5'-AGCAAAAGCAGGGTGACAAAAG-3', SEQ ID NO. 7) y NS834 (5'-CTCTTGCTCCACTTCAAGC-3', SEQ ID NO. 8). Los productos de PCR se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa, se extrajeron en gel utilizando un kit GeneJet (Thermo Scientific) y se secuenciaron a medida en VBC Biotech (Viena, Austria). Se utilizaron los siguientes cebadores para la secuenciación: NSRTLen, NS834, NSGFP383s: 5'-CTTAACTTGCAGGAGATGTG-3', SEQ ID NO. 9 y NSGFP1208as: 5'-GATGAGGACTCCAAGTGC-3', SEQ ID NO. 10)

Titulación de virus

Se determinaron los títulos de virus infecciosos en dosis infecciosas del 50% en cultivo de tejido (TCID₅₀)/ml en células Vero sembradas a una densidad de 1,5x10⁴/pocillo el día antes de la infección. Se prepararon diluciones de virus 1:10. Después de tres días, los pocillos se examinaron microscópicamente y se puntuaron como infectados o no infectados determinando la presencia o ausencia de un efecto citopático. El título del virus se calculó de acuerdo con el método de Reed y Muench (Reed y Muench, 1938).

Resultados y discusión

Las células Vero se transfectaron mediante electroporación de ocho derivados de pHW2000 que contenían cada uno de los segmentos virales. Ya cuatro días después de la transfección, se observó un efecto citopático completo tanto para delNS106-2A-mGM-CSF como para delNS106-2A-GFP, lo que indica un alto potencial de crecimiento de los virus.

Para evaluar la expresión de mGM-CSF, las células Vero se infectaron con el virus delNS106-2A-mGM-CSF o delNS106-2A-GFP a una MOI de aproximadamente cinco y se incubaron durante 24 h. Los sobrenadantes se analizaron mediante ELISA. Si bien para las células infectadas con el virus delNS106-2A-mGM-CSF se midió una concentración de 111 +/- 14 ng/ml de mGM-CSF, no se detectó expresión de mGM-CSF en las células infectadas con el virus delNS106-2A-GFP.

Para verificar el procesamiento correcto de mGM-CSF, los sobrenadantes se analizaron mediante inmunotransferencia utilizando un anticuerpo específico para mGM-CSF.

La Figura 3 muestra una inmunotransferencia: mGM-CSF en sobrenadantes de células Vero infectadas con los virus indicados. Calle 1: delNS106-2A-GFP; calle 2: delNS106-2A-mGM-CSF; Calle 3 y 4: 1 ng y 5 ng de mGM-CSF recombinante expresado en E. coli.

Debido a la glicosilación, mGM-CSF migró como varias bandas en el intervalo de aproximadamente 15 a 25 kDa. En contraste, mGM-CSF derivado de E. coli que carece de glicanos migró como una sola banda a aproximadamente 14 kDa.

Análogamente, se detectó una fuerte expresión de GFP en células Vero infectadas con el virus delNS106-2A-GFP.

Para evaluar la estabilidad genética de los segmentos quiméricos NS, ambos virus se propagaron a través de siete pases consecutivos en células Vero. El ARN viral se aisló y se sometió a RT-PCR utilizando oligonucleótidos específicos para el segmento NS. Como se muestra en la Figura 4, los productos de RT-PCR de NS para ambos virus migraron a la misma altura que sus controles plasmídicos correspondientes, lo que indica la estabilidad genética de los segmentos quiméricos de NS. Los controles negativos para RT fueron negativos para ambos virus, descartando la posibilidad de que los productos de PCR se amplificaran a partir del ADN plasmídico residual derivado de la transfección. La secuencia confirmó la falta de mutaciones en el segmento quimérico delNS para ambos virus (datos no mostrados).

La Figura 4 muestra el análisis mediante RT-PCR de virus sometidos a pase, lo que demuestra la estabilidad genética de los segmentos quiméricos de NS. Los virus quiméricos obtenidos de la transfección se sometieron a pase seriadamente siete veces en células Vero. La RT-PCR se realizó a partir de ARN viral aislado de sobrenadantes de cultivo celular utilizando oligonucleótidos homólogos al segmento NS. Los controles de PCR se incluyeron utilizando los respectivos ADN de plásmido del virus quimérico delNS106 como moldes. 1: delNS106-2A-GFP; 2: control delNS106-2A-GFP negativo para RT; 3: control de plásmido pHW-delNS106-2A-GFP; 4: control de plásmido pHW-delNS106-2A-mGM-CSF; 5: delNS106-2A-mGM-CSF; 6: control delNS106-2A-mGM-CSF negativo para RT.

Es importante destacar que ambos virus son capaces de crecer a títulos altos. Los sobrenadantes obtenidos del pase 7 se analizaron mediante el ensayo TCID₅₀. Para delNS106-2A-mGM-CSF se detectaron 7,9 +/- 0,3 log₁₀ TCID₅₀/ml y para delNS106-2A-GFP 8,6 +/- 0,2 log₁₀ TCID₅₀/ml.

Ejemplo 3

Células

Las líneas celulares de melanoma humano SK-MEL 1 (ATCC, Manassas, VA) y 518 A2 se cultivaron en medio DMEM/F12 (Invitrogen) con un suplemento de FCS al 10% (Invitrogen) y suplemento de GlutaMax I 2 mM (Invitrogen) a 37°C y 5% de CO₂.

Se desarrollaron melanocitos epidérmicos humanos normales adultos (NHEM-Ad; Clonetics) de acuerdo con las instrucciones del fabricante en medio basal MBM-4 complementado (Clonetics) a 37°C y 5% de CO₂.

Las células Vero adaptadas para crecer en medio sin suero (ATCC) se mantuvieron en medio OptiPro sin suero complementado con un suplemento de GlutaMax I 2 mM.

Generación de virus

Para la generación de virus, se utilizaron siete derivados de pHW2000 (Hoffmann et al. 2000, Proc Natl Acad Sci U S A. 97: 6108-13) que contenían los segmentos PA, PB2, M y NP de Puerto Rico/8/34, PB1 de A/Texas/1/77 y HA, NA de A/Nueva Caledonia/20/99 H1N1, así como un plásmido de expresión de proteínas que codificaba NS1 (pCAGGS-NS1 (SAM) de Influenza A PR8; (Salvatore et al. 2002, J Virol. 76: 1206-12)) junto con un derivado pHW2000 que contenía el segmento delNS106-GFP o el segmento delNS1 para la co-transfección de células Vero. Después de la transfección, para apoyar la replicación del virus, se cultivaron células Vero en medio sin suero (OptiPro; Invitrogen) en presencia de tripsina 5 µg/ml. Cuatro días después de la transfección, se observó 100% de CPE y los virus rescatados se congelaron o se amplificaron en células Vero.

Replicación del virus en células de melanoma humano y melanocitos humanos normales

Se sembraron células 518A2 adherentes el día antes de la infección en placas de 6 pocillos. Antes de la infección, las células se lavaron dos veces con PBS y se recubrieron con medio OptiPro sin suero que contenía suplemento de GlutaMax I 2 mM y tripsina 5 µg/ml.

Las células en suspensión SK-Mel-1 se lavaron dos veces con PBS, se resuspendieron en medio OptiPro que contenía suplemento de GlutaMax I 2 mM y tripsina 5 µg/ml y se sembraron en placas de 6 pocillos.

5 Se sembraron NHEM-Ad cuatro días antes de la infección en medio basal MBM-4 complementado, se lavó dos veces con PBS y se recubrió con medio OptiPro que contenía suplemento de GlutaMax I 2 mM y tripsina 0,5 µg/ml.

10 Las células se infectaron a una multiplicidad de infección (MOI) de 0,1 con el virus deINS106-GFP o deINS1 y se incubaron durante 72 horas a 37°C. Los sobrenadantes se analizan para detectar partículas infecciosas de virus en células Vero mediante el ensayo TCID50.

15 En la línea celular tumoral 518-A2 más sensible a IFN (competente para IFN), el virus deINS106-GFP creció a TCID50/ml de más de 4,9 log mientras que el virus deINS1 alcanzó un título de TCID50/ml de solo 1,7 log (Figura 5). En la línea celular resistente a interferón SK-Mel-1, el virus deINS106-GFP creció a TCID50/ml de 6,1 log mientras que deINS1 produjo un título de TCID50/ml de 4,5log.

20 En los melanocitos epidérmicos humanos normales, deINS106-GFP creció a un título de TCID50/ml de 2,8 log, que sorprendentemente es más que una TCID50/ml dos log más baja que en las células 518-A2 sensibles al interferón. Este resultado indica que este virus tiene un fenotipo de replicación condicional óptimo. Dado que en los melanocitos el título del inóculo es mayor que el título en el sobrenadante después de la infección, se considera que este virus tiene replicación deficiente. El virus DeINS1 alcanzó TCID50/ml de 1,6 log, un nivel similar al de las células 518-A2 sensibles al interferón (TCID50/ml de 1,7 log) y, por lo tanto, no se considera que tenga un fenotipo de replicación condicional óptimo.

25 Figura 5: Crecimiento del virus en células de melanoma humano y melanocitos epidérmicos humanos normales. Las células se infectaron con una MOI de 0,1, y se analizaron los sobrenadantes recolectados 72 horas después para detectar títulos infecciosos mediante el ensayo de TCID₅₀ en células Vero.

LISTA DE SECUENCIAS

30 <110> Muster Thomas

<120> NUEVO VECTOR DE VIRUS DE LA INFLUENZA PARA VIROTERAPIA

35 <130> MT001P

<160> 10

<170> BiSSAP 1.3

40 <210> 1

<211> 230

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

45 <220>

<223> NS1 PR8 de tipo salvaje

<400> 1

ES 2 762 174 T3

```

Met Asp Pro Asn Thr Val Ser Ser Phe Gln Val Asp Cys Phe Leu Trp
1          5          10          15
His Val Arg Lys Arg Val Ala Asp Gln Glu Leu Gly Asp Ala Pro Phe
          20          25          30
Leu Asp Arg Leu Arg Arg Asp Gln Lys Ser Leu Arg Gly Arg Gly Ser
          35          40          45
Thr Leu Gly Leu Asp Ile Glu Thr Ala Thr Arg Ala Gly Lys Gln Ile
          50          55          60
Val Glu Arg Ile Leu Lys Glu Glu Ser Asp Glu Ala Leu Lys Met Thr
          65          70          75          80
Met Ala Ser Val Pro Ala Ser Arg Tyr Leu Thr Asp Met Thr Leu Glu
          85          90          95
Glu Met Ser Arg Asp Trp Ser Met Leu Ile Pro Lys Gln Lys Val Ala
          100          105          110
Gly Pro Leu Cys Ile Arg Met Asp Gln Ala Ile Met Asp Lys Asn Ile
          115          120          125
Ile Leu Lys Ala Asn Phe Ser Val Ile Phe Asp Arg Leu Glu Thr Leu
          130          135          140
Ile Leu Leu Arg Ala Phe Thr Glu Glu Gly Ala Ile Val Gly Glu Ile
          145          150          155          160
Ser Pro Leu Pro Ser Leu Pro Gly His Thr Ala Glu Asp Val Lys Asn
          165          170          175
Ala Val Gly Val Leu Ile Gly Gly Leu Glu Trp Asn Asp Asn Thr Val
          180          185          190
Arg Val Ser Glu Thr Leu Gln Arg Phe Ala Trp Arg Ser Ser Asn Glu
          195          200          205
Asn Gly Arg Pro Pro Leu Thr Pro Lys Gln Lys Arg Glu Met Ala Gly
          210          215          220
Thr Ile Arg Ser Glu Val
          225          230

```

<210> 2
 <211> 1259
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> deINS106-2A-mGM-CSF

<400> 2

agcaaaagca gggtgacaaa gacataatgg atccaaacac tgtgtcaagc tttcaggtag

60

5

10

ES 2 762 174 T3

attgctttct ttggcatgtc cgcaaacgag ttgcagacca agaactaggt gatgccccat 120
 tccttgatcg gcttcgccga gatcagaaat ccctaagagg aaggggcagc accctcggtc 180
 tggacatcga gacagccaca cgtgctggaa agcagatagt ggagcggatt ctgaaagaag 240
 aatccgatga ggcacttaa atgacctagg cctctgtacc tgcgtcgcgt tacctaactg 300
 acatgactct tgaggaaatg tcaagggact ggtccatgct cataggggga aatttcgatc 360
 ttctaaaact tgcaggggat gtggaatcaa atccaggacc aatgaagaca gatacacttc 420
 ttctttgggt gctgcttttg tgggttccaa gatcacatgg ggcaccaaca agatcaccaa 480
 ttacagtgac aagaccatgg aaacacgtgg aagcaatcaa agaagcactt aatctgcttg 540
 atgatatgcc agtgacactg aatgaagagg tggaagtggg gtcaaatgag ttcagcttca 600
 aaaaactgac atgctgacag acaagactga aaattttcga acaaggactg aggggaaact 660
 tcacaaaact taaaggggca ctgaatatga cagcaagcta ttatcaaaca tactgcccac 720
 caacaccaga aacagattgc gaaacacaag tgacaacata cgcagatttc atcgacagcc 780
 ttaaaacatt cctgacagat atcccattcg agtgcaaaaa accagggcag aagtgataat 840
 aagcggccgc ccaagcagaa agtggacta accttcttct ctttcttctc ctgacaggac 900
 atactgctga ggatgtcaaa aatgcagttg gagtcctcat cgggggactt gaatggaatg 960
 ataacacagt tcgagtctct gaaactctac agagattcgc ttggagaagc agtaatgaga 1020
 atgggagacc tccactcact ccaaaacaga aacgagaaat ggcgggaaca attaggtcag 1080
 aagtttgaag aaataagatg gttgattgaa gaagtgagac acaaaactgaa gataacagag 1140
 aatagttttg agcaataaac atttatgcaa gccttacatc tattgcttga agtggagcaa 1200
 gagataagaa ctttctogtt tcagcttatt taataataaa aaacaccctt gtttctact 1259

<210> 3
 <211> 269
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> NS106-2A-mGM-CSF

10

<400> 3

Met	Asp	Pro	Asn	Thr	Val	Ser	Ser	Phe	Gln	Val	Asp	Cys	Phe	Leu	Trp
1				5					10					15	
His	Val	Arg	Lys	Arg	Val	Ala	Asp	Gln	Glu	Leu	Gly	Asp	Ala	Pro	Phe
			20					25					30		
Leu	Asp	Arg	Leu	Arg	Arg	Asp	Gln	Lys	Ser	Leu	Arg	Gly	Arg	Gly	Ser
			35				40					45			
Thr	Leu	Gly	Leu	Asp	Ile	Glu	Thr	Ala	Thr	Arg	Ala	Gly	Lys	Gln	Ile
			50			55					60				
Val	Glu	Arg	Ile	Leu	Lys	Glu	Glu	Ser	Asp	Glu	Ala	Leu	Lys	Met	Thr
65					70					75				80	
Met	Ala	Ser	Val	Pro	Ala	Ser	Arg	Tyr	Leu	Thr	Asp	Met	Thr	Leu	Glu
				85					90					95	
Glu	Met	Ser	Arg	Asp	Trp	Ser	Met	Leu	Ile	Gly	Gly	Asn	Phe	Asp	Leu

ES 2 762 174 T3

caccaattgg agatggacca gtgcttctgc cagataatca ttacctttca acacagtcag 1020
 cactgagcaa agatccaaat gagaaaagg atcatatggt gctgcttgaa tttgtgacag 1080
 cagctggaat tacacatgga atggatgagc tgtacaactg ataataagcg gccgcccaag 1140
 cagaaagtgg tactaacctt cttctctttc ttctcctgac aggacatact gctgaggatg 1200
 tcaaaaatgc agttggagtc ctcatcgggg gacttgaatg gaatgataac acagttcgag 1260
 tctctgaaac tctacagaga ttcgcttgga gaagcagtaa tgagaatggg agacctccac 1320
 tcaactccaaa acagaaacga gaaatggcgg gaacaattag gtcagaagtt tgaagaaata 1380
 agatggttga ttgaagaagt gagacacaaa ctgaagataa cagagaatag ttttgagcaa 1440
 ataacattta tgcaagcctt acatctattg cttgaagtgg agcaagagat aagaactttc 1500
 tcgtttcagc ttatttaata ataaaaaaca cccttgtttc tact 1544

<210> 5
 <211> 364
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> NS106-2A-mGM-CSF

10

<400> 5

Met Asp Pro Asn Thr Val Ser Ser Phe Gln Val Asp Cys Phe Leu Trp
 1 5 10 15
 His Val Arg Lys Arg Val Ala Asp Gln Glu Leu Gly Asp Ala Pro Phe
 20 25 30
 Leu Asp Arg Leu Arg Arg Asp Gln Lys Ser Leu Arg Gly Arg Gly Ser
 35 40 45
 Thr Leu Gly Leu Asp Ile Glu Thr Ala Thr Arg Ala Gly Lys Gln Ile
 50 55 60
 Val Glu Arg Ile Leu Lys Glu Glu Ser Asp Glu Ala Leu Lys Met Thr
 65 70 75 80
 Met Ala Ser Val Pro Ala Ser Arg Tyr Leu Thr Asp Met Thr Leu Glu
 85 90 95
 Glu Met Ser Arg Asp Trp Ser Met Leu Ile Gly Gly Asn Phe Asp Leu
 100 105 110
 Leu Lys Leu Ala Gly Asp Val Glu Ser Asn Pro Gly Pro Met Ala Ser
 115 120 125
 Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val Glu Leu
 130 135 140
 Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu Gly Glu
 145 150 155 160
 Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys Thr Thr
 165 170 175
 Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Leu Cys Tyr
 180 185 190
 Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Arg His Asp
 195 200 205
 Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg Thr Ile
 210 215 220
 Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val Lys Phe
 225 230 235 240
 Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile Asp Phe
 245 250 255
 Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn Tyr Asn

ES 2 762 174 T3

			260						265					270			
	Ser	His	Asn	Val	Tyr	Ile	Met	Ala	Asp	Lys	Gln	Lys	Asn	Gly	Ile	Lys	
			275					280					285				
	Val	Asn	Phe	Lys	Thr	Arg	His	Asn	Ile	Glu	Asp	Gly	Ser	Val	Gln	Leu	
		290					295					300					
	Ala	Asp	His	Tyr	Gln	Gln	Asn	Thr	Pro	Ile	Gly	Asp	Gly	Pro	Val	Leu	
		305				310					315					320	
	Leu	Pro	Asp	Asn	His	Tyr	Leu	Ser	Thr	Gln	Ser	Ala	Leu	Ser	Lys	Asp	
				325						330					335		
	Pro	Asn	Glu	Lys	Arg	Asp	His	Met	Val	Leu	Leu	Glu	Phe	Val	Thr	Ala	
			340						345					350			
	Ala	Gly	Ile	Thr	His	Gly	Met	Asp	Glu	Leu	Tyr	Asn					
			355					360									

5 <210> 6
 <211> 12
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Cebador

<400> 6

agcaaaagca gg 12

15 <210> 7
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Cebador

<400> 7

25 agcaaaagca gggtgacaaa g 21

<210> 8
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Cebador

35 <400> 8

ctcttgctcc acttcaagc 19

40 <210> 9
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Cebador

<400> 9

50 cttaaactg caggagatgt g 21

<210> 10
 <211> 18
 <212> ADN

ES 2 762 174 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador

5

<400> 10

gatgaggact ccaactgc 18

10

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un vector de virus de la influenza recombinante que comprende un gen NS que codifica una proteína NS1 truncada que consta de 106 aminoácidos del extremo N de la respectiva proteína NS1 de tipo salvaje y una secuencia no viral heteróloga que codifica un polipéptido inmunoestimulador, con lo que dicho vector se replica en células de melanoma sensibles IFN y está atenuado en células normales, y expresa un polipéptido inmunoestimulador heterólogo.
- 10 2. El virus de la influenza de la reivindicación 1, en donde dicho virus de la influenza tiene un fenotipo inductor de IFN.
3. El vector del virus de la influenza según una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en donde el gen NS1 se modifica adicionalmente por mutaciones en la región no codificante.
- 15 4. El vector del virus de la influenza según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende modificaciones de los genes que codifican las proteínas NA y/o HA.
- 20 5. El vector del virus de la influenza según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende modificaciones de los genes de polimerasa que codifican las proteínas PB1, PB2, PA, M y/o NP.
6. El vector del virus de la influenza según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el polipéptido inmunoestimulador heterólogo se selecciona del grupo que consiste en antígenos asociados a tumores, citocinas, IL2, GM-CSF, IL-15, MIP 1 alfa, MIP3 alfa.
- 25 7. Una formulación farmacéutica que comprende un vector del virus de la influenza según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
8. Una formulación inmunogénica que comprende un vector del virus de la influenza según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, y un excipiente fisiológicamente aceptable.
- 30 9. El vector del virus de la influenza según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para su uso en la preparación de un medicamento para el tratamiento terapéutico de un sujeto.
- 35 10. El vector del virus de la influenza según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para su uso en viroterapia contra el cáncer.
11. Un método in vitro para producir un vector del virus de la influenza que expresa una citocina según las reivindicaciones 1 a 6, en donde dicho virus se ha sometido a pase por células tumorales.

Fig. 1

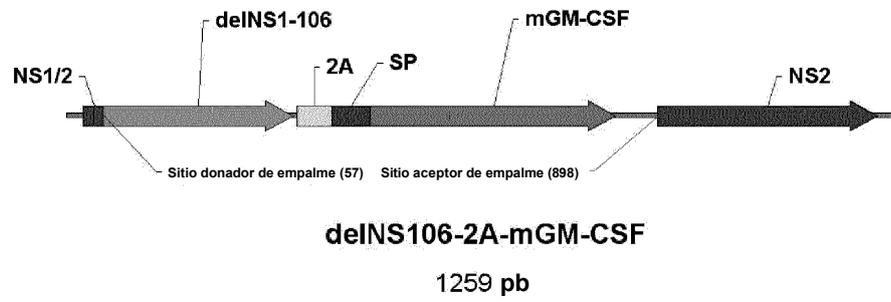


Fig. 2

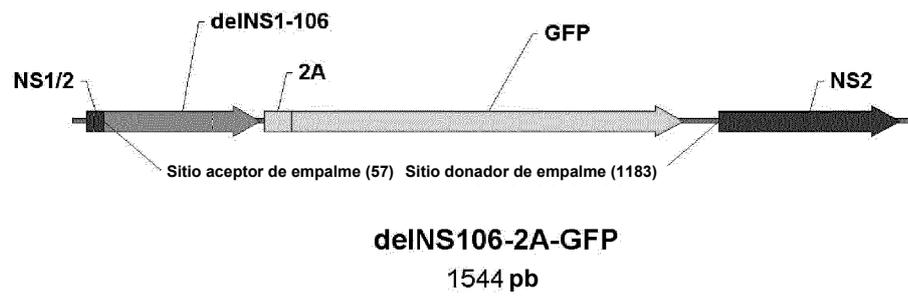


Fig. 3

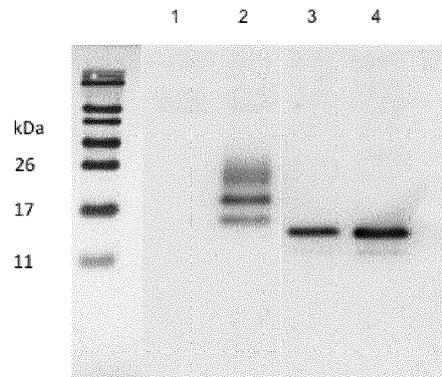


Fig. 4

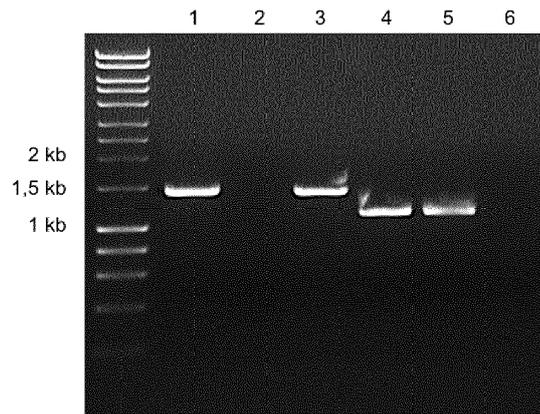


Fig. 5

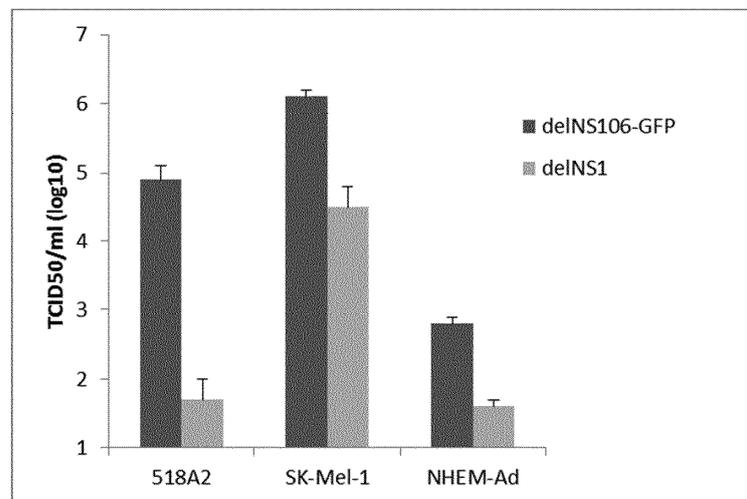


Fig. 6: (SEQ ID NO. 2)

AGCAAAAGCAGGGTGACAAAGACATAATGGATCCAAACACTGTGTCAAGCTTTC
AGGTAGATTGCTTCTTTGGCATGTCCGCAAACGAGTTGCAGACCAAGAAGTAGG
TGATGCCCCATTCTTGATCGGCTTCGCCGAGATCAGAAATCCCTAAGAGGAAGG
GGCAGCACCTCGGTCTGGACATCGAGACAGCCACACGTGCTGGAAAGCAGATA
GTGGAGCGGATTCTGAAAGAAGAATCCGATGAGGCACCTAAAATGACCATGGCC
TCTGTACCTGCGTCGCGTTACCTAACTGACATGACTCTTGAGGAAATGTCAAGGG
ACTGGTCCATGCTCATAGGGGGAAATTTTCGATCTTCTAAAACCTTGACAGGGGATGT
GGAATCAAATCCAGGACCAATGAAGACAGATACACTTCTTCTTTGGGTGCTGCTT
TTGTGGGTCCAAGATCACATGGGGCACCAACAAGATCACCAATTACAGTGACAA
GACCATGGAAACACGTGGAAGCAATCAAAGAAGCACTTAATCTGCTTGATGATA
TGCCAGTGACACTGAATGAAGAGGTGGAAGTGGTGTCAAATGAGTTCAGCTTCA
AAAACTGACATGCGTGCAGACAAGACTGAAAATTTTCGAACAAGGACTGAGGG
GAAACTTCACAAAACCTAAAGGGGCACTGAATATGACAGCAAGCTATTATCAAA
CATACTGCCACCAACACCAGAAACAGATTGCGAAACACAAGTGACAACATAACG
CAGATTTTCATCGACAGCCTTAAACATTCTGACAGATATCCCATTTCGAGTGCAA
AAAACCAGGGCAGAAGTGATAATAAGCGGCCGCCAAGCAGAAAGTGGTACTAA
CCTTCTTCTTTCTTCTCTCTGACAGGACATACTGCTGAGGATGTCAAAAATGCAG
TTGGAGTCTTCATCGGGGACTTGAATGGAATGATAACACAGTTCGAGTCTCTGA
AACTCTACAGAGATTCGCTTGGAGAAGCAGTAATGAGAATGGGAGACCTCCACT
CACTCCAAAACAGAAACGAGAAATGGCGGGAACAATTAGGTCAGAAGTTTGAAG
AAATAAGATGGTTGATTGAAGAAGTGAGACACAACTGAAGATAACAGAGAATA
GTTTTGAGCAAATAACATTTATGCAAGCCTTACATCTATTGCTTGAAGTGGAGCA
AGAGATAAGAACCTTCTCGTTTCAGCTTATTTAATAATAAAAAACACCCTTGTTTC
TACT

Fig. 7: (SEQ ID NO. 3)

MDPNTVSSFQVDCFLWHVRKRVDQELGDAPFLDRLRRDQKSLRGRGSTLGLD
IETATRAGKQIVERILKEESDEALKMTMASVPASRYLTDMTLEEMSRDWSMLIG
GNFDLLKLAGDVESNPGPMKTDLLLWVLLWVPRSHGAPTRSPITVTRPWKHVEAIKEA
LNLDDMPVTLNEEVEVVSNEFSFKKLTQVQTRLKIFEQGLRGNFTKLKGALNMTASYQQT
YCPPTPETDCETQVTTYADFIDSLKTFLTDIPFECKKPGQK

Fig. 8: (SEQ ID NO. 4)

AGCAAAAGCAGGGTGACAAAGACATAATGGATCCAAACACTGTGTCAAGCTTTC
 AGGTAGATTGCTTTCTTTGGCATGTCCGCAAACGAGTTGCAGACCAAGAAGCTAGG
 TGATGCCCCATTCCTTGATCGGCTTCGCCGAGATCAGAAATCCCTAAGAGGAAGG
 GGCAGCACCCCTCGGTCTGGACATCGAGACAGCCACACGTGCTGGAAGCAGATA
 GTGGAGCGGATTCTGAAAGAAGAATCCGATGAGGCACCTTAAAATGACCATGGCC
 TCTGTACCTGCGTCGCGTTACCTAACTGACATGACTCTTGAGGAAATGTCAAGGG
 ACTGGTCCATGCTCATAGGGGGAAATTTGATCTTCTAAAACCTGCAGGGGATGT
 GGAATCAAATCCAGGACCAATGGCATCAAAGGGGAAGAAGCTTTTACAGGGGT
 GGTGCCAATACTTGTGGAACCTTGATCGGGATGTGAATGGACACAAATTCTCAGTT
 AGCGGAGAGGGAGAAGGAGATGCAACATACGGAAAACCTTACACTGAAATTCATC
 TGCACAACCTGGAAAACCTCCAGTTCCATGGCCAACACTTGTGACAACACTTTGTT
 ATGGGGTGCAATGCTTCTCAAGATACCCAGATCATATGAAGAGGCACGATTTCTT
 CAAATCAGCAATGCCAGAGGGATACGTGCAAGAGAGAACAATATCTTCAAAGA
 CGACGGGAACTACAAGACAAGAGCAGAAAGTGAATTCGAGGGGGATACACTTGT
 GAATAGAATAGAAGTGAAGGGAATCGACTTCAAAGAGGATGGAAATATTCTGGG
 ACACAAGCTCGAGTACAACATAAGCCATAATGTGTACATCATGGCCGACAA
 GCAGAAAAACGGAATCAAAGTGAACCTTCAAGACTAGGCATAATATTGAGGATGG
 ATCAGTGCAACTGGCAGATCATTATCAACAAAACACACCAATTGGAGATGGACC
 AGTGTCTTCTGCCAGATAATCATTACCTTTCAACACAGTCAGCACTGAGCAAAGAT
 CCAAATGAGAAAAGGGATCATATGGTGCTGCTTGAATTTGTGACAGCAGCTGGA
 ATTACACATGGAATGGATGAGCTGTACAACCTGATAATAAGCGGCCGCCAAGCA
 GAAAGTGGTACTAACCTTCTTCTTCTTCTCCTGACAGGACATACTGCTGAGGA
 TGTCAAAAATGCAGTTGGAGTCCTCATCGGGGGACTTGAATGGAATGATAACACA
 GTTCGAGTCTCTGAAACTCTACAGAGATTCGCTTGGAGAAGCAGTAATGAGAATG
 GGAGACCTCCACTACTCCAAAACAGAAAACGAGAAATGGCGGGAACAATTAGGT
 CAGAAGTTTGAAGAAATAAGATGGTTGATTGAAGAAGTGAGACACAACTGAAG
 ATAACAGAGAATAGTTTTGAGCAAATAACATTTATGCAAGCCTTACATCTATTGC
 TTGAAGTGGAGCAAGAGATAAGAAGCTTTCTCGTTTCAGCTTATTTAATAATAAAA
 AACACCCTTGTTTCTACT

Fig. 9: (SEQ ID NO. 5)

MDPNTVSSFQVDCFLWHVRKRVADQELGDAPFLDRLRRDQKSLRGRGSTLGLD
IETATRAGKQIVERILKEESDEALKMTMASVPASRYLTDMTLEEMSRDWSMLIG
G*NFDLLKLAGDVESNPGPMASKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATY*
KLTLKFICTTGKLPVPWPTLVITLICYGVQCFSRYPDHMKRHDFFKSAMPEGYVQERTIFF
KDDGNYKTRAEVKKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKILEYNYNSHNVYIMADKQKNG
IKVNFKTRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHLYSTQSALSKDPNEKRDMVL
LEFVTAAGITHGMDELYN

Fig. 10 (SEQ ID NO. 1)

MDPNTVSSFQVDCFLWHVRKRVADQELGDAPFLDRLRRDQKSLRGRGSTLGLDIET
 ATRAGKQIVERILKEESDEALKMTMASVPASRYLTDMTLEEMSRDWSMLIPKQKVA
 GPLCIRMDQAIMDKNILKANFSVIFDRLETLILLRAFTEEGAIVGEISPLPSLPGHTAED
 VKNVAVGLIGGLEWINDNTVRVSETLQRFQAWRSSNENGRPPLTPKQKREMAGTIRSE
 V