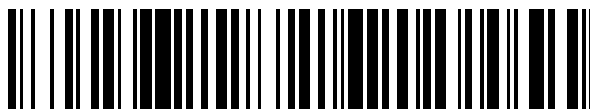


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 768 292**

51 Int. Cl.:

C12N 7/04 (2006.01)

C12N 7/01 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.04.2013 PCT/CN2013/074028**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.10.2014 WO14166084**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.04.2013 E 13881492 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.12.2019 EP 2984167**

54 Título: **Cepas de virus vaccinia mutante, usos de estas y método para producirlas**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
22.06.2020

73 Titular/es:

**TOT SHANGHAI R&D CENTER CO., LTD. (100.0%)
Room 317, Building 1, 720 Cailun Road,
Zhangjiang Hi-Tech Park., Pudong New Area
Shanghai 201203, CN**

72 Inventor/es:

**QIN, LI;
LIANG, MIN y
EVANS, DAVID H.**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

Observaciones:

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

ES 2 768 292 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

Cepas de virus vaccinia mutante, usos de estas y método para producirlas

5 Campo de la invención

Esta divulgación se refiere a cepas de virus vaccinia mutantes nuevas, usos de estas y métodos para producirlas.

Antecedentes

10

La terapia génica ha llamado mucho la atención en cuanto a los estudios para el tratamiento del cáncer. La eficiencia de la transducción y la expresión de genes terapéuticos en células tumorales es crítica para los métodos de terapia génica. Diversos enfoques se han desarrollado para mejorar las eficiencias de la transducción y la expresión de genes en células tumorales. Se han estudiado y evaluado diversos virus en cuanto a su potencial de uso como

15

vectores para transportar genes de interés a células tumorales. Sin embargo, la seguridad y la selectividad de un vector viral para células tumorales son cuestiones de interés principales cuando se seleccionan vectores virales como candidatos para terapia génica.

20

El virus vaccinia se relaciona estrechamente con el virus que causa viruela y se ha usado como una vacuna viva en el programa de erradicación de la viruela. Se ha convertido recientemente en un objeto de estudio como un vector para transporte y entrega de genes de interés a un sujeto bajo tratamiento en terapia génica.

25

El virus vaccinia contiene dos copias de los genes del factor de crecimiento del virus vaccinia (VGF) que se localizan en la repetición terminal invertida (ITR) del genoma del virus vaccinia. La proteína VGF es un polipéptido similar al factor de crecimiento epidérmico (EGF) de 77 residuos altamente glicosilado. La proteína VGF se expresa y se secreta de manera temprana en la infección viral y actúa como un mitógeno para cebar células circundantes para infección por vaccinia y ha demostrado desempeñar un papel crítico en la infección por virus vaccinia (Buller et al. J. Virol. 62 (1988): 866-74).

30

El virus vaccinia contiene además genes de serpina y genes de anquirina. Los genes de serpina son una familia de genes que codifican inhibidores de proteasa de serina. Las serpinas están potencialmente involucradas en múltiples funciones biológicas tales como regulación de coagulación, fibrinólisis, respuesta inmune, inflamación, invasión tumoral y apoptosis (véase Kummer et al. Methods 32 (2004): 141-9). Los genes de anquirina codifican una familia de proteínas que poseen sitios de unión para diferentes proteínas integrales de membrana y desempeñan un papel

35

crítico en procesos biológicos que involucran interacción proteína-proteína (véase Li et al. Biochemistry 45 (2006): 15168-78).

Sumario de la invención

40

En un aspecto, la presente divulgación se refiere a una cepa de virus vaccinia mutante que puede replicarse de manera selectiva en células tumorales. En determinadas realizaciones, la cepa de virus mutante ha disminuido la virulencia.

45

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona una cepa de virus vaccinia mutante, en la que las secuencias de codificación de los genes del VGF en el genoma del virus se truncan por completo o en parte.

50

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona una cepa de virus vaccinia mutante, en la que las secuencias de codificación de los genes de serpina en el genoma del virus se truncan por completo o en parte.

55

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método para producir una cepa de virus vaccinia mutante, que incluye truncar las secuencias de codificación de los genes del VGF de manera completa o parcial a partir del genoma del virus de manera tal que el virus no puede expresar proteínas VGF funcionalmente activas. El método divulgado incluye truncar las secuencias de codificación de los genes del VGF, los genes de serpina y los genes de anquirina, de manera completa o parcial, a partir del genoma del virus de manera tal que el virus no puede expresar proteínas VGF, proteínas serpina y proteínas anquirina funcionalmente activas.

60

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona usos de un virus vaccinia mutante como un vector para suministrar un gen diana a una célula tumoral de manera selectiva y para expresar el gen diana en la célula tumoral.

65

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método para producir un producto génico recombinante, que comprende insertar un gen diana en el genoma de un virus vaccinia mutante de la presente divulgación. En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un producto génico recombinante que comprende las secuencias de

ácido nucleico de un virus vaccinia mutante que se describe en la presente y las secuencias de ácido nucleico de un gen diana.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra placas que se forman mediante virus que se clonan a partir de una reserva de cepa de virus vaccinia TianTan. Cada uno de los virus purificados en placas se colocó en placas por separado en células BSC-40, que se cultivaron durante dos días, se fijaron, se tiñeron con violeta cristal, y se fotografiaron. Luego se usó ImageJ (Schneider et al. Nat. Methods 9 (2012): 671-5) para medir los tamaños de área de 20 placas que se seleccionaron al azar de cada plato para cada clon de virus. La reserva original parece contener una mezcla de tanto placas grandes como placas pequeñas. Los virus purificados en placas se separaron en dos grupos, de los cuales, un grupo (por ejemplo, TP03, TP11 y TP12) genera placas más pequeñas, y el otro grupo (por ejemplo, TP05, TP13 y TP18) genera placas más grandes. La diferencia entre los tamaños de placas de los dos grupos es significativa desde el punto de vista estadístico ($P < 0,001$).

La Figura 2 muestra los títulos del virus vaccinia tipo TP03 y del virus vaccinia tipo TP05 después de la infección con células BSC-40. Las células BSC-40 se infectaron respectivamente con los virus TP03 y TP05 con la multiplicidad de infección (MOI) de 0,01 (a saber, $MOI = 0,01$), se incubaron a 37 °C, se recolectaron por congelación-descongelación, y se determinó el rendimiento de virus por titulación en células BSC-40. Los virus TP03 crecen más lentamente, y con títulos más bajos, en comparación con los virus TP05. La diferencia de tasa de crecimiento entre las dos cepas es significativa desde el punto de vista estadístico ($P < 0,01$).

La Figura 3 muestra resultados de PCR y transferencia Southern para confirmar la presencia de eliminaciones teloméricas. Se usaron las TT004F (SEQ ID NO:1), TT011R (SEQ ID NO:2) y TT010F (SEQ ID NO:3) como cebadores para la PCR. La Figura 3A muestra los sitios de unión de los cebadores de PCR a las regiones de telómero izquierdo de TP03 y TP05. La Figura 3B muestra los resultados de PCR de TP03, TP05, TP11, TP12, TP13, TP18, TP05 y el conjunto (reserva de virus no purificado) usando TT010F y TT011R, o TT004F y TT011R como pares cebadores, respectivamente. La Figura 3C muestra los resultados de transferencia Southern de ADN digeridos por Scal que codifican las TIRs izquierdas y derechas en TP03, TP11, TP05, TP13 y el conjunto.

La Figura 4 muestra una comparación de las ubicaciones de eliminaciones de genes en las regiones de telómero izquierdo de 12 cepas de VACV comunes. Las barras verticales marcadas con un círculo representan la unión de TIR izquierda. TP03 incluye una eliminación que se extiende en los genes del VGF en la región de telómero izquierdo del genoma de virus.

La Figura 5 muestra una comparación de las ubicaciones de eliminaciones de genes en las regiones de telómero derecho de 12 cepas VACV comunes. Las barras verticales con un círculo representan la unión de TIR derecha. TP03 incluye una eliminación que se extiende en los genes del VGF en la región de telómero derecho del genoma de virus.

La Figura 6 muestra una tabla que enumera los genes que se ubican en un fragmento de 5,7 kpb en las repeticiones terminales invertidas del virus tipo TP05 mientras que falta fragmento de 5,7 kpb del virus tipo TP03.

Descripción detallada de la invención

Cepas de virus vaccinia mutante

Los inventores de la presente divulgación han identificado y aislado una cepa de virus vaccinia mutante con seguridad y selectividad tumoral mejoradas a partir de la cepa de virus vaccinia TianTan. Los inventores descubrieron que el virus vaccinia de cepa Tian-Tan produjo placas con diversos tamaños de área cuando se cultivó en células de riñón de mono BSC-40. Las placas pueden dividirse de manera general en dos tipos, un tipo tiene un tamaño de área significativamente más pequeño con respecto al otro. A través de la clonación y la exploración, los inventores pudieron separar los virus en dos cepas, una es del tipo TP03 que tiene un tamaño de área de placa más pequeño, y la otra es del tipo TP05 que tiene un tamaño de área de placa más grande. En determinadas realizaciones, el tipo TP03 tiene placas con un tamaño de área de aproximadamente la mitad del tamaño de área de las placas del tipo TP05 (Figura 1). En determinadas realizaciones, el tamaño de las placas pequeñas que se forman mediante el virus vaccinia tipo TP03 puede ser menor que aproximadamente 30%, aproximadamente 35%, aproximadamente 40%, aproximadamente 45%, aproximadamente 50%, aproximadamente 55%, aproximadamente 60%, aproximadamente 65%, aproximadamente 70%, aproximadamente 75%, o aproximadamente 80% de aquel de las placas grandes del virus vaccinia tipo TP05. El tamaño de área de una placa puede determinarse por medición del radio, diámetro, o área media de la placa que se forma mediante el virus según se describe en la patente de E.E.U.U. nro. 4,213,965, patente de E.E.U.U. nro. 5,690,940 y patente de E.E.U.U. nro. 7,037,508.

Se descubrió además que el tipo TP03 tiene una multiplicidad de infección más baja en células huésped sin dividir en comparación con el tipo TP05. En determinadas realizaciones, la multiplicidad de infección del tipo TP03 es menor que aproximadamente 90%, aproximadamente 80%, aproximadamente 70%, aproximadamente 60%, o

aproximadamente 50% de la multiplicidad de infección del tipo TP05 (Figura 2). La multiplicidad de infección más baja puede indicar virulencia reducida. La multiplicidad de infección de un virus puede determinarse por medición de títulos virales o resultados de inmunohistoquímica de células o tejidos que se infectan con el virus. Una reducción de los títulos virales o resultados de inmunohistoquímica mejorados puede indicar una reducción de virulencia. La descripción detallada de evaluación de virulencia puede encontrarse en la patente de E.E.U.U. nro. 7,740,867 y la patente de E.E.U.U. nro. 7,732,188.

Además, la virulencia de un virus puede evaluarse por otros métodos que se usan comúnmente en la técnica, por ejemplo, el estudio de crecimiento de célula huésped o supervivencia animal. Para el estudio de supervivencia animal, los virus pueden inyectarse en animales y el porcentaje de animales que sobreviven después de la infección con diferentes virus se registrará para generar una curva de supervivencia y/o para determinar la LD₅₀. Un virus que da como resultado una tasa de supervivencia más alta o tiempo de supervivencia más prolongado o LD₅₀ más alta puede considerarse como que tiene virulencia reducida y, por lo tanto, seguridad mejorada.

Las secuencias de genes del virus tipo TP03 y tipo TP05 se determinaron usando métodos de secuenciación convencionales que se conocen en la técnica (vease, por ejemplo, Qin et al. J. Virol. 85 (2011): 13049-60; Chen et al. Virology 317 (2003): 165-86.). Los resultados de secuenciación revelaron que el tipo TP03 es una cepa mutante que contiene eliminaciones grandes en el genoma del virus mientras que el tipo TP05 contiene un genoma casi completo de un virus vaccinia que es representativo de la cepa de virus TianTan original. Las Figuras 4 y 5 muestran diagramas esquemáticos del telómero izquierdo y el telómero derecho de los virus tipo TP03 y tipo TP05. La eliminación de genes del tipo TP03 es una eliminación de 5,7 kpb simétrica en las repeticiones invertidas teloméricas izquierda y derecha (TIRs) del virus, en la que los promotores y N-terminales de ambas copias de los genes del VGF se eliminan, eliminándose también el gen de serpina (SPI-1), gen de anquirina y otros genes determinados. Las eliminaciones de genes en los virus tipo TP03 y los genes homólogos correspondientes en los virus tipo TP05 se enumeran en la tabla que se muestra en la Figura 6.

La cepa de virus tipo TP03 se depositó el 8 de abril, 2013 en el China Center for Type Culture Collection (CCTCC) con número de depósito CCTCC v201307, conforme a las disposiciones del Tratado de Budapest.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona además un virus vaccinia mutante recombinante con los genes del VGF que se truncan artificialmente de manera tal que el virus no expresa proteínas VGF funcionalmente activas. La expresión "funcionalmente activa" cuando se usa con respecto a una molécula tal como una proteína, significa que la molécula es capaz de realizar al menos una función o actividad en su estado activo. La función o actividad se refiere a, por ejemplo, pero sin limitación, función o actividad biológica, fisiológica, inmunológica.

En determinados aspectos de la divulgación, ambos genes del VGF en el genoma del virus vaccinia se truncan de manera completa o parcial, por ejemplo, más del 99%, se truncan más del 98%, más del 95%, más del 90%, más del 85%, más del 80%, más del 75%, más del 70%, más del 65%, más del 60%, más del 55%, más del 50%, más del 45%, más del 40%, más del 35%, más del 30%, más del 25%, más del 20%, más del 15%, más del 10% de los genes del VGF. En un aspecto preferido de la divulgación, ambos genes del VGF se truncan de manera completa. En determinados aspectos de la divulgación, los genes del VGF se truncan por eliminaciones de al menos 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 150, 200 o más nucleótidos contiguos en cada gen del VGF, ya sea contiguo o no contiguo.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona además un virus vaccinia mutante recombinante con los genes de serpina que se truncan artificialmente de manera tal que el virus no puede expresar proteínas serpina funcionalmente activas. En determinados aspectos de la divulgación, los genes de serpina en el genoma del virus vaccinia se truncan de manera completa o parcial, por ejemplo, se trunca más del 99%, más del 98%, más del 95%, más del 90%, más del 85%, más del 80%, más del 75%, más del 70%, más del 65%, más del 60%, más del 55%, más del 50%, más del 45%, más del 40%, más del 35%, más del 30%, más del 25%, más del 20%, más del 15%, más del 10% del gen de serpina. En un aspecto preferido de la divulgación, los genes de serpina se truncan de manera completa. En determinados aspectos de la divulgación, los genes de serpina se truncan por eliminaciones de al menos 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 150, 200, 300, 400, 500, 700, 900 o más nucleótidos contiguos en cada gen de serpina, ya sea contiguo o no contiguo.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona además un virus vaccinia mutante recombinante con los genes de anquirina que se truncan artificialmente de manera tal que el virus no puede expresar proteínas anquirina funcionalmente activas. En determinados aspectos de la divulgación, los genes de anquirina en el genoma del virus vaccinia se truncan de manera completa o parcial, por ejemplo, se trunca más del 99%, más del 98%, más del 95%, más del 90%, más del 85%, más del 80%, más del 75%, más del 70%, más del 65%, más del 60%, más del 55%, más del 50%, más del 45%, más del 40%, más del 35%, más del 30%, más del 25%, más del 20%, más del 15%, más del 10% del gen de anquirina. En un aspecto preferido de la divulgación, los genes de anquirina se truncan de manera completa. En determinados aspectos de la divulgación, los genes de anquirina se truncan por eliminaciones de al menos 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 150, 200, 300, 400, o más nucleótidos contiguos en cada gen de anquirina, ya sea contiguo o no contiguo.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un virus vaccinia mutante recombinante con los genes del VGF y los genes de serpina que se truncan artificialmente de manera tal que el virus no puede expresar proteínas VGF y proteínas serpina funcionalmente activas. En determinados aspectos de la divulgación, los genes del VGF y los genes de serpina en el genoma del virus vaccinia se trunca de manera completa o parcial, por ejemplo, se truncan más del 99%, más del 98%, más del 95%, más del 90%, más del 85%, más del 80%, más del 75%, más del 70%, más del 65%, más del 60%, más del 55%, más del 50%, más del 45%, más del 40%, más del 35%, más del 30%, más del 25%, más del 20%, más del 15%, más del 10% de cada uno de los genes del VGF y de los de serpina. En un aspecto preferido de la divulgación, todos los genes del VGF y los genes de serpina en el genoma de virus vaccinia se truncan de manera completa.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un virus vaccinia mutante recombinante con los genes del VGF y los genes de anquirina que se truncan artificialmente de manera tal que el virus no puede expresar proteínas VGF y proteínas anquirina funcionalmente activas. En determinados aspectos de la divulgación, los genes del VGF y los genes de anquirina en el genoma del virus vaccinia se truncan de manera completa o parcial, por ejemplo, se trunca más del 99%, más del 98%, más del 95%, más del 90%, más del 85%, más del 80%, más del 75%, más del 70%, más del 65%, más del 60%, más del 55%, más del 50%, más del 45%, más del 40%, más del 35%, más del 30%, más del 25%, más del 20%, más del 15%, más del 10% de cada uno de los genes del VGF y de los de anquirina. En un aspecto preferido de la divulgación, todos los genes del VGF y los genes de anquirina en el genoma de virus vaccinia se truncan de manera completa.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un virus vaccinia mutante recombinante con los genes de anquirina y los genes de serpina que se truncan artificialmente de manera tal que el virus no puede expresar proteínas anquirina y proteínas serpina funcionalmente activas. En determinados aspectos de la divulgación, los genes de anquirina y los genes de serpina en el genoma del virus vaccinia se truncan de manera completa o parcial, por ejemplo, se trunca más del 99%, más del 98%, más del 95%, más del 90%, más del 85%, más del 80%, más del 75%, más del 70%, más del 65%, más del 60%, más del 55%, más del 50%, más del 45%, más del 40%, más del 35%, más del 30%, más del 25%, más del 20%, más del 15%, más del 10% de cada uno de los genes anquirina y de los de serpina. En un aspecto preferido de la divulgación, todos los genes de anquirina y los genes de serpina en el genoma del virus vaccinia se truncan de manera completa.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un virus vaccinia mutante recombinante con los genes del VGF, los genes de serpina y los genes de anquirina que se truncan artificialmente de manera tal que el virus no puede expresar proteínas VGF, serpina y anquirina funcionalmente activas. En determinados aspectos de la divulgación, los genes del VGF, los genes de serpina y los genes de anquirina en el genoma del virus vaccinia se truncan de manera completa o parcial, por ejemplo, se trunca más del 99%, más del 98%, más del 95%, más del 90%, más del 85%, más del 80%, más del 75%, más del 70%, más del 65%, más del 60%, más del 55%, más del 50%, más del 45%, más del 40%, más del 35%, más del 30%, más del 25%, más del 20%, más del 15%, más del 10% de cada uno de los genes del VGF, los genes de serpina y los genes de anquirina. En un aspecto preferido de la divulgación, todos los genes del VGF, los genes de serpina y los genes de anquirina en el genoma del virus vaccinia se truncan de manera completa.

El truncamiento de genes en el genoma del virus puede producirse mediante diversos métodos que se conocen en la técnica, por ejemplo, recombinación homóloga. La recombinación homóloga es un tipo de recombinación genética en la que las secuencias de nucleótidos se intercambian entre dos moléculas de ácido nucleico similares o idénticas. La recombinación homóloga puede llevarse a cabo mediante las etapas de creación de un plásmido transportador de vaccinia, en primer lugar, que contiene un gen reportero para recombinación homóloga en la región diana, de infección de una célula huésped adecuada con un virus vaccinia nativo, de transfección del virus vaccinia nativo con el plásmido transportador de vaccinia para permitir la recombinación homóloga del plásmido transportador en la región diana, y de aislamiento de las placas positivas de acuerdo con el producto de gen reportero. El método para designar un vector transportador de virus vaccinia se conoce en la técnica, según se describe en Du et al. J. Virol. Methods 185 (2012): 175-83; Blasco et al. Gene 158 (1995): 157-62; Coupar et al. Gene 68 (1988): 1-10; Falkner et al. J. Virol. 64 (1990): 3108-11.

En otro aspecto, la presente divulgación se refiere a un método para producir una cepa de virus vaccinia mutante que incluye el truncamiento de las secuencias de codificación de los genes del VGF de manera completa o parcial a partir del genoma del virus de manera tal que el virus no puede expresar proteínas VGF funcionalmente activas. En determinados aspectos de la divulgación, el método incluye además el truncamiento de las secuencias de codificación de los genes de serpina de manera completa o parcial a partir del genoma del virus de manera tal que el virus no puede expresar proteínas serpina funcionalmente activas. En determinados aspectos de la divulgación, el método incluye además el truncamiento de las secuencias de codificación de los genes de anquirina de manera completa o parcial a partir del genoma del virus de manera tal que el virus no puede expresar proteínas anquirina funcionalmente activas. En determinados aspectos de la divulgación, el método incluye el truncamiento de las secuencias de codificación de los genes del VGF, los genes de serpina y los genes de anquirina de manera completa o parcial a partir del genoma del virus de manera tal que el virus no puede expresar proteínas VGF, proteínas serpina y proteínas anquirina funcionalmente activas.

Los virus vaccinia incluyen, pero sin limitación, Western Reserve (WR), Copenhagen, Tashkent, TianTan, Lister, Wyeth (también conocido como Dryvax), 1HD-J, y IHDW, Brighton, Ankara, MVA, Dairen I, LIPV, LC16M8, LC16MO, LIVP, WR 65-16, y Connaught.

5 Usos de las cepas de virus mutantes

Los virus vaccinia mutante que se describen en la presente pueden replicarse de manera selectiva en células tumorales y pueden resultar útiles para infectar, de manera selectiva, las células tumorales. Según se usa en la presente, "replicar de manera selectiva" significa que la tasa de replicación del virus mutante en un tipo de células (por ejemplo, células tumorales) es significativamente más alta en comparación con aquella de otro tipo de células (por ejemplo, células normales). En determinadas realizaciones, un virus vaccinia mutante muestra multiplicidad de infección mayor en al menos 1 vez, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 10 veces, 50 veces, 100 veces o 1000 veces en células tumorales en comparación con células normales. En determinadas realizaciones, el virus vaccinia mutante muestra multiplicidad de infección mayor en al menos 50%, 60%, 70%, 80% o 90% en células tumorales en comparación con células normales.

En determinadas realizaciones, los virus vaccinia mutantes de la presente divulgación pueden replicarse de manera selectiva en células de cáncer de hígado (por ejemplo, células Hepal-6, células Hep3B, células 7402, y células 7721), células de cáncer de la mama (por ejemplo, células MCF-7), células cáncer de la lengua (por ejemplo, células TCa8113), célula de cáncer adenoide quístico (por ejemplo, células ACC-M), células de cáncer de próstata (por ejemplo, células LNCaP), célula de riñón de embrión humano (por ejemplo, células HEK293), células de cáncer de pulmón (por ejemplo, células A549), y células de cáncer cervical (por ejemplo, células Hela).

En otro aspecto, los virus vaccinia mutantes de la presente divulgación han reducido la virulencia a células normales. En determinadas realizaciones, los virus vaccinia mutantes muestran menos del 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10% de la multiplicidad de infección en células normales en comparación con el virus vaccinia de tipo salvaje.

En otro aspecto, un virus vaccinia mutante que se describe en la presente puede usarse como un vector para suministrar un gen diana a una célula tumoral de manera selectiva y para expresar el gen diana en la célula tumoral. El término "que expresa" según se usa en la presente se refiere a un proceso en el que una secuencia de ADN se lee mediante una ARN polimerasa para producir una cadena de ARN complementaria a la secuencia de ADN, y/o un proceso en el que una secuencia de ARN se lee mediante un ribosoma para producir un péptido que se codifica mediante la secuencia de ADN y la secuencia de ARN.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método para producir un producto génico recombinante, que comprende insertar un gen diana en el genoma de un virus vaccinia mutante de la presente divulgación. En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un producto génico recombinante que comprende las secuencias de ácido nucleico de un virus vaccinia mutante que se describe en la presente y las secuencias de ácido nucleico de un gen diana.

En determinadas realizaciones, dichos genes diana pueden incluir, sin limitación, genes que pueden eliminar o inhibir células tumorales, genes que pueden mejorar respuestas inmunes contra células tumorales, genes que pueden reparar o reemplazar genes mutados o alterados de células tumorales, o genes que pueden producir células tumorales más sensibles a la quimioterapia o terapia de radiación. En determinadas realizaciones, los genes diana son citocinas, tales como factores estimulantes de colonia (por ejemplo, factores estimulantes de colonia de granulocitos y macrófagos (GM-CSFs), factores estimulantes de colonia de macrófagos (M-CSFs), factores estimulantes de colonia de granulocitos (G-CS-Fs)), factores de células madre, eritropoyetina, interferonas (IFNs), factores de necrosis tumoral (TNFs) y quimiocinas. En determinadas realizaciones, los genes diana codifican para antígeno presentando polipéptidos tales como proteínas de choque térmico. En determinadas realizaciones, los genes diana codifican para anticuerpos monoclonales en contra de proteínas que pueden asociarse con tumores, por ejemplo, anticuerpos monoclonales en contra de los factores de crecimiento endotelial vascular o los factores de necrosis tumoral.

Un gen diana puede insertarse en los virus vaccinia mutantes usando métodos convencionales que se conocen en la técnica. Por ejemplo, el gen diana puede producirse mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y transportar sitios enzimáticos específicos en cada extremo del gen diana, cuyos sitios enzimáticos son complementarios con respecto a los mismos sitios enzimáticos, o similares, en el virus vaccinia mutante, y el gen diana se liga con el virus a través de la unión en los sitios enzimáticos. Para mayores detalles, véase, por ejemplo, Sambrook et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. (1989)).

En otro aspecto, un virus vaccinia mutante de la presente divulgación y un producto génico recombinante que contiene el virus vaccinia mutante puede resultar útil para impedir y tratar tumores. Ejemplos de tumores incluyen, sin limitaciones, cáncer de ano, cáncer del conducto biliar, cáncer de vejiga, cáncer de hueso, cáncer de intestino (cáncer de colon, cáncer rectal), cáncer de cerebro, cáncer de mama, cáncer carcinoide, cáncer de cuello uterino, cáncer endocrino, cáncer de ojo, cáncer de vesícula biliar, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de sarcoma de Kaposi, cáncer de riñón, cáncer de laringe, leucemia, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, cáncer de linfoma, cáncer de

melanoma, cáncer de mesotelioma, cáncer de mieloma, cáncer neuroendocrino, cáncer de esófago, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de pene, cáncer de próstata, cáncer de piel, cáncer de sarcomas de partes blandas, cáncer de médula espinal, cáncer de estómago, cáncer de testículos, cáncer de tiroides, cáncer de vagina, cáncer de vulva o cáncer de útero.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se establecen para ayudar a la comprensión de la presente divulgación, y no deberían interpretarse como limitantes del alcance de la invención de ninguna manera según se define en las reivindicaciones que se contienen en la presente.

Ejemplo 1. Aislamiento de virus y caracterización

Los virus vaccinia (cepa TianTan) se obtuvieron del China Center for Type Culture Collection (Wuhan, Hubei) y las células BSC-40 de riñón de mono se obtuvieron del American Type Culture Collection (Manassas, VA). Las células y los virus se cultivaron en medio de Eagle modificado (MEM, Gibco) que se complementó con 5% de suero fetal bovino, 1% de aminoácidos no esenciales, 1% de L-glutamina, y 1% de antibiótico a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5%.

24 clones de virus de una reserva de cepa de VACV TianTan se seleccionaron al azar y se purificaron en placas en células BSC-40. Cada uno de los virus purificados en placas se cultivaron usando células BSC-40 con una multiplicidad de infección baja (MOI=0,01) durante dos días, se fijaron, se tiñeron con violeta de cristal, y se fotografiaron. Luego se usó ImageJ (Schneider et al. Nat. Methods 9 (2012): 671-5) para medir los tamaños de área de 20 placas para cada clon de virus, seleccionándose las placas al azar a partir de cada plato. Estos virus produjeron dos clases de placas. Según se muestra en la Figura 1, los virus del tipo TP03 más abundante (21/24 clones) (clones representativos: TP03, TP11, TP12) formaron placas pequeñas con un tamaño de área de aproximadamente la mitad de los virus del tipo TP05 (3/24 clones) (clones representativos: TP05, TP13, TP18). Los resultados del aislamiento del virus sugirieron que la reserva de virus contenía al menos dos formas variantes de virus, a saber, el tipo TP03 y el tipo TP05.

Los títulos de TP03 y TP05 se trazaron, además, en el tiempo mediante la infección de células BSC-40 con TP03 y TP05 con MOI=0,01. Los virus se incubaron a 37 °C, se recolectaron mediante congelación-descongelación, y el rendimiento del virus en cada punto temporal se determinó mediante titulación en células BSC-40. Según se muestra en la Figura 2, los títulos de TP03 en cada punto temporal son más bajos en comparación con los títulos de TP05, lo que indica que la tasa de crecimiento de TP03 es más lenta que aquella de TP05.

Ejemplo 2. Análisis de las eliminaciones de 5,7 kpb en el virus tipo TP03.

Los materiales de ADN del tipo TP03 y del tipo TP05 se purificaron y secuenciaron. De acuerdo con los resultados de la secuenciación, el tipo TP03 es diferente del tipo TP05 en dos eliminaciones de 5,7 kpb que se ubican en las repeticiones invertidas teloméricas izquierda y derecha (TIRs) del virus tipo TP03, respectivamente.

La presencia de las eliminaciones de 5,7 kpb en las TIRs del tipo TP03 se confirmó mediante PCR. Los resultados de la PCR se muestran en la Figura 3, en la que la Figura 3A muestra los sitios de unión de cebadores que se usan en PCR (TT004F, TT010F y TT011R) en un mapa de telómeros izquierdos de TP03 y TP05. Cuando el cebador directo TT010F (5' TTTTGTAGGAAGGAGGC 3' (SEQ ID NO:3)) y el cebador inverso TT011R (5' CCGGGAGATGGGATATATGA 3' (SEQ ID NO:2)) se usaron en PCR, no se observó amplificación de ADN del tipo TP03 (TP03, TP11, TP12) (Figura 3B), que se debe a que el sitio de unión del cebador TT010F se elimina debido a las eliminaciones de 5,7 kpb en el tipo TP03. Cuando se usaron el cebador directo TT004F (5' TGGATGGCCGTATTGATT 3' (SEQ ID NO:1)) y el cebador inverso TT011R en PCR, se observó amplificación de ADN del tipo TP03 (Figura 3B).

En cambio, cuando se usaron TT010F y TT011R como el par cebador en PCR, se observó amplificación de ADN del tipo TP05 (Figura 3B), esto se debe a que el sitio de unión del cebador TT010F se retiene en el tipo TP05. Cuando TT004F y TT011R se usaron como el par cebador en PCR, no se observó amplificación de ADN del tipo TP05 (Figura 3B) debido a la distancia entre el par cebador en el tipo TP05 es demasiado alejada como para permitir que los cebadores sirvan como cebadores de PCR. Las eliminaciones de 5,7 kpb en el tipo TP03 se confirmaron también mediante transferencia Southern, en el que los ADNs de virus fueron digeridos con Scal, continuando con fraccionamiento en un gel de agarosa al 0.7%, fueron transferidos a membranas de nailon, y transferidos con una sonda etiquetada con biotina. Los resultados de transferencia Southern de ADNs digeridos por Scal del tipo TP03 (TP03, TP11), el tipo TP05 (TP05, TP13) y el conjunto se muestran en la Figura 3C. La sonda que se usa en la transferencia Southern codifica ADNs que abarcan el lado derecho del límite de eliminación (Figura 3A), de este modo, las eliminaciones de 5,7 kb en el tipo TP03 acortan en gran medida los fragmentos de Scal que codifican las TIRs izquierda y derecha en comparación con el tipo TP05. La reserva no purificada de virus (conjunto en Figura 3C) se muestra para contener virus de ambos tipos, tipo TP03 y tipo TP05 (Figura 3C).

Ejemplo 3. Análisis genómico de virus

Las secuencias génicas de diversos virus vaccinia se comparan una con respecto a la otra para verificar similitud o diferencia de secuencias. Las cepas de virus vaccinia que se analizaron incluyen CL3, ACAM2K, RPXV, Duke, Lister, CVA, Cop, WR, HPXV y TianTan (TP03 y TP05). "TP00" se refiere a la secuencia de virus TianTan anteriormente publicada (AF095689).

Los montajes genómicos se prepararon usando CLC Genomics Workbench (v4.6) y se anotaron usando GATU (Tcherepanov et al. BMC Genomics 7 (2006): 150) según se describe anteriormente (Qin et al. J. Virol. 85 (2011): 13049-60). Los análisis bioinformáticos se llevaron a cabo usando organizador genómico viral (Lefkowitz et al. Nucleic Acids Res. 33 (2005): D311-6; Upton et al. Virus Res. 70 (2000): 55-64) y agrupaciones de poxvirus ortólogos (Ehlers et al. Bioinformatics 18 (2002): 1544-5). Se puede acceder a estas y otras herramientas adicionales en <http://www.virology.ca>. Se preparó un alineamiento de secuencias de virus que yace entre los homólogos génicos de genes DVX058 a DVX155 (genes de VACV Copenhagen F9L-a-A24R) para los virus indicados.

La búsqueda BLASTN se corrió usando ~20 kpb de secuencia que abarcan el telómero izquierdo de las cepas de virus vaccinia comunes (Figura 4). La ubicación del límite de TIR izquierda (barras verticales con un círculo en la Figura 4) varía entre las cepas debido a la presencia de diferentes eliminaciones en la región que rodea el límite de TIR izquierda. TP05 se asemejan a las cepas de VACV más completas, y las TIRs de TP05 se asemejan más a aquellas de otras cepas de VACV.

Un patrón similar de eliminaciones de genes se encontró también en el telómero derecho de los genomas de VACV diferentes (Figura 5). La cepa TP05 codifica un complemento de genes en el telómero derecho similar a la mayoría de las otras cepas de VACV, mientras que TP03 codifica una eliminación única a la derecha del límite de TIR (círculo en barra en la Figura 5) que se extiende al gen del VGF en comparación con otras cepas de VACV.

Los genes que se ubican en la eliminación de 5,7 kpb simétrica del virus tipo TP03 se comparan con los genes homólogos del virus tipo TP05 y la cepa Copenhagen. Según se muestra en la tabla en la Figura 6, en comparación con TP05 y la cepa Copenhagen, el virus tipo TP03 tiene el gen de serpina (SPI-1), el gen de anquirina y varios otros genes que se retiran completamente de las TIRs en ambos extremos del genoma del virus. De manera adicional, el promotor y la región N-terminal del gen del VGF se retira además de ambos extremos del ADN de TP03, dejándose solo una región C-terminal de 253 pb del gen del VGF en cada extremo del ADN de TP03.

Listado de secuencias

<110> TOTBIOPHARM Shanghai R&D Center

<120> Cepas de virus vaccinia mutante, usos de estas y método para producirlas

<130> 033843-8002WO01

<160> 3

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 18

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> TT004F, cebador directo

<400> 1

tggatggccg tattgatt

18

<210> 2

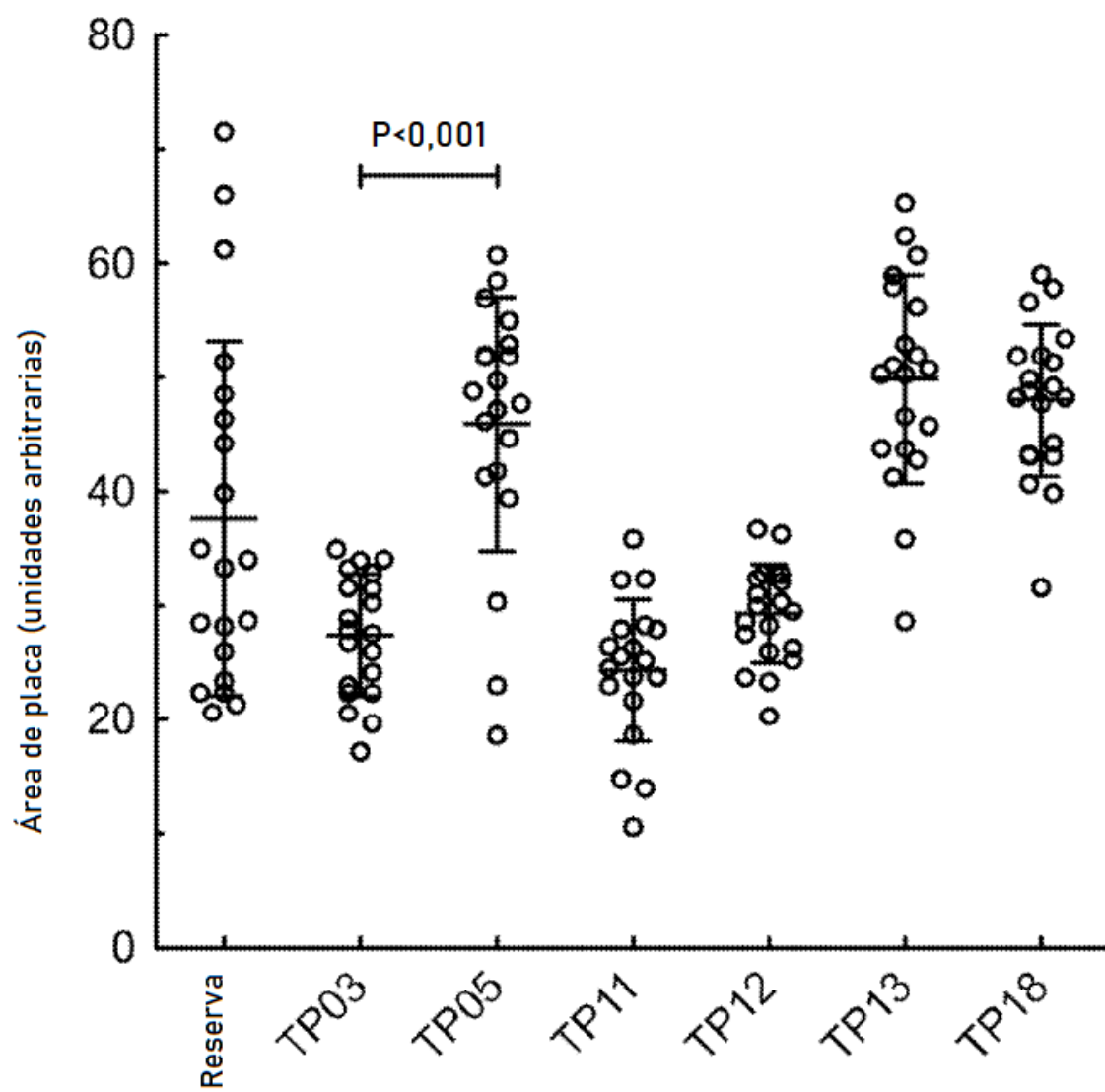
<211> 20

<212> ADN

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> TT011R, cebador inverso	
	<400> 2	
	ccgggagatg ggatatatga	20
10	<210> 3	
	<211> 18	
	<212> ADN	
15	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
20	<223> TT010F, cebador directo	
	<400> 3	
	ttttgtagg aaggaggc	18

REIVINDICACIONES

1. Una cepa de virus vaccinia mutante que puede replicarse de manera selectiva en células tumorales, y que ha disminuido la virulencia a células normales, en la que las secuencias de codificación de los dos genes del factor de crecimiento del virus vaccinia (VGF), los genes de serpina y los genes de anquirina en el genoma del virus se truncan de manera completa o parcial de manera tal que el virus no puede expresar proteínas VGF, proteínas serpina y proteínas anquirina funcionalmente activas, en la que la cepa se deposita con el número de depósito de CCTCC, v201307.
2. La cepa de virus vaccinia mutante de la reivindicación 1, en la que la cepa produce placas más pequeñas en comparación con el virus vaccinia no mutante correspondiente, en la que el tamaño de las placas más pequeñas que se forman mediante el virus vaccinia mutante es menor que aproximadamente 30%, aproximadamente 35%, aproximadamente 40%, aproximadamente 45%, aproximadamente 50%, aproximadamente 55%, aproximadamente 60%, aproximadamente 65%, aproximadamente 70%, aproximadamente 75%, o aproximadamente 80% de aquel de las placas más grandes del virus vaccinia no mutante correspondiente.
3. La cepa de virus vaccinia mutante de la reivindicación 1, en la que las células tumorales se seleccionan a partir del grupo que consiste en células Hepal-6, MCF-7, TCa8113, ACC-M, LNCaP, HEK293, Hep3B, A549, 7402, 7721 y Hela.
4. Un vector para suministrar un gen diana a una célula tumoral de manera selectiva y para expresar el gen diana en la célula tumoral, en el que el vector es el virus vaccinia mutante de cualquiera de las reivindicaciones 1-2.
5. Un método para producir un virus vaccinia mutante, que comprende insertar un gen diana en el genoma de un virus vaccinia mutante de cualquiera de las reivindicaciones 1-2.
6. Un virus vaccinia recombinante que comprende las secuencias de ácido nucleico de un virus vaccinia mutante de cualquiera de las reivindicaciones 1-2 y la secuencia de ácido nucleico de un gen diana.
7. Una cepa de virus vaccinia mutante de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, para uso como un medicamento.
8. Una cepa de virus vaccinia mutante de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, para uso en el tratamiento del cáncer.

**Figura 1**

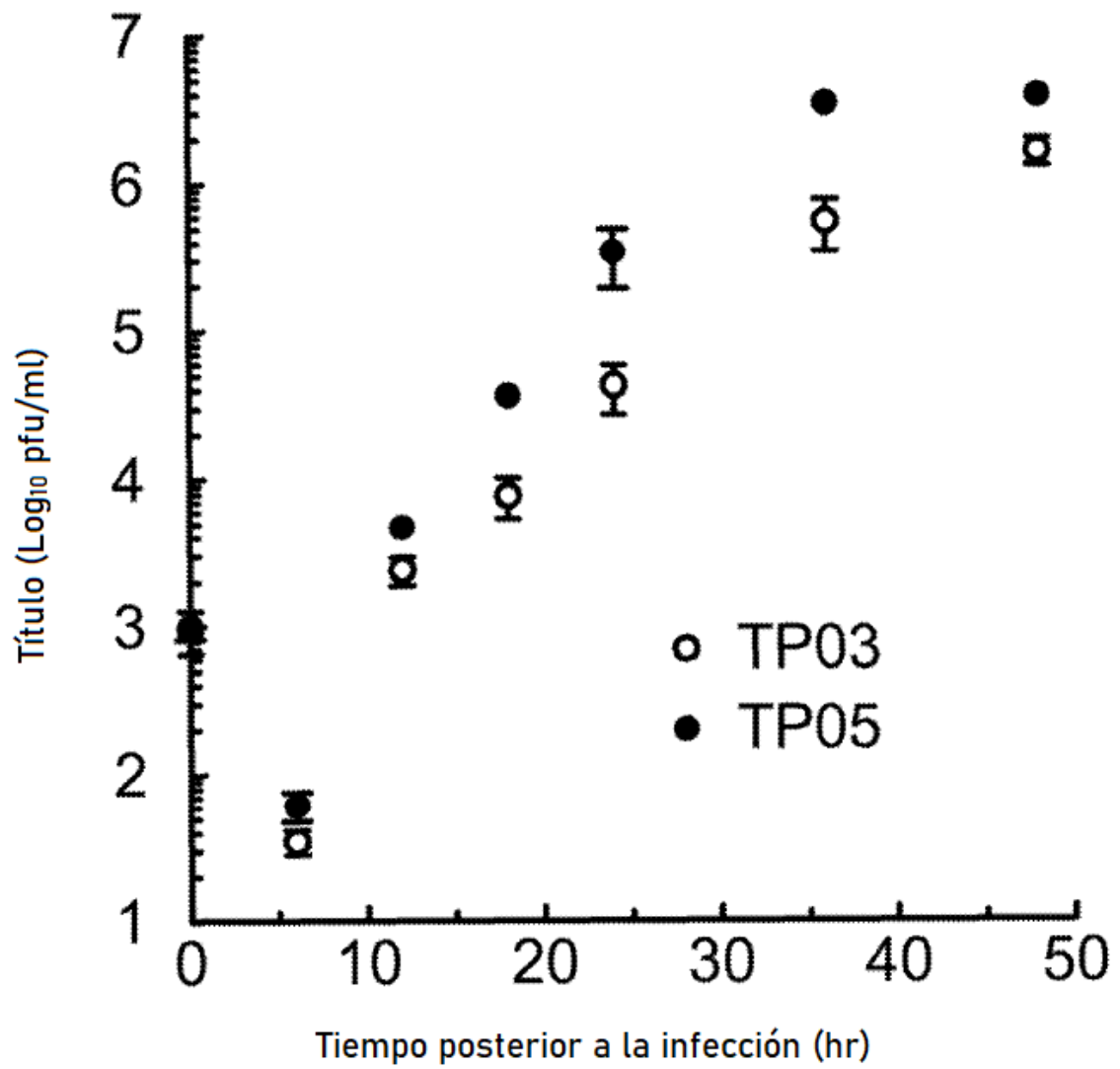


Figura 2

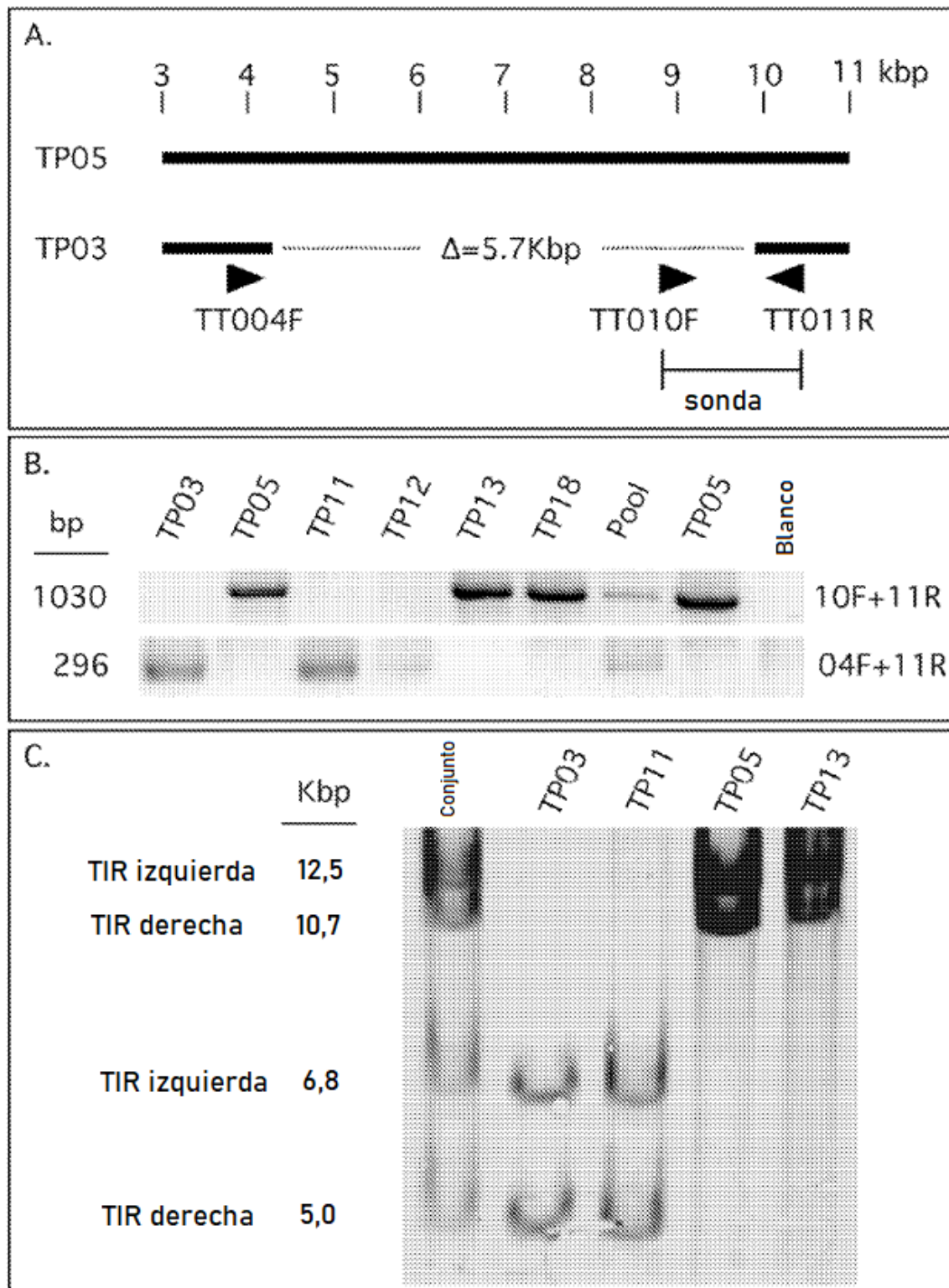


Figura 3

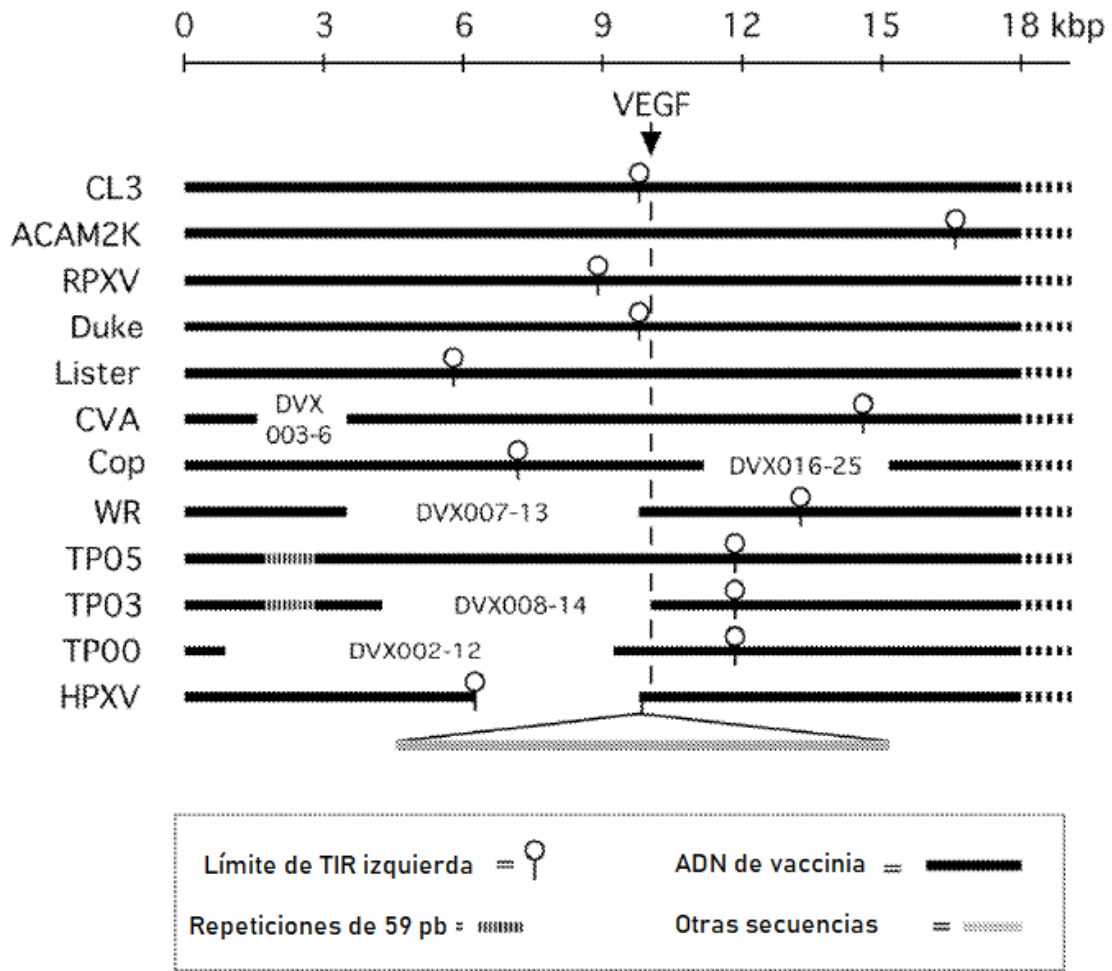


Figura 4

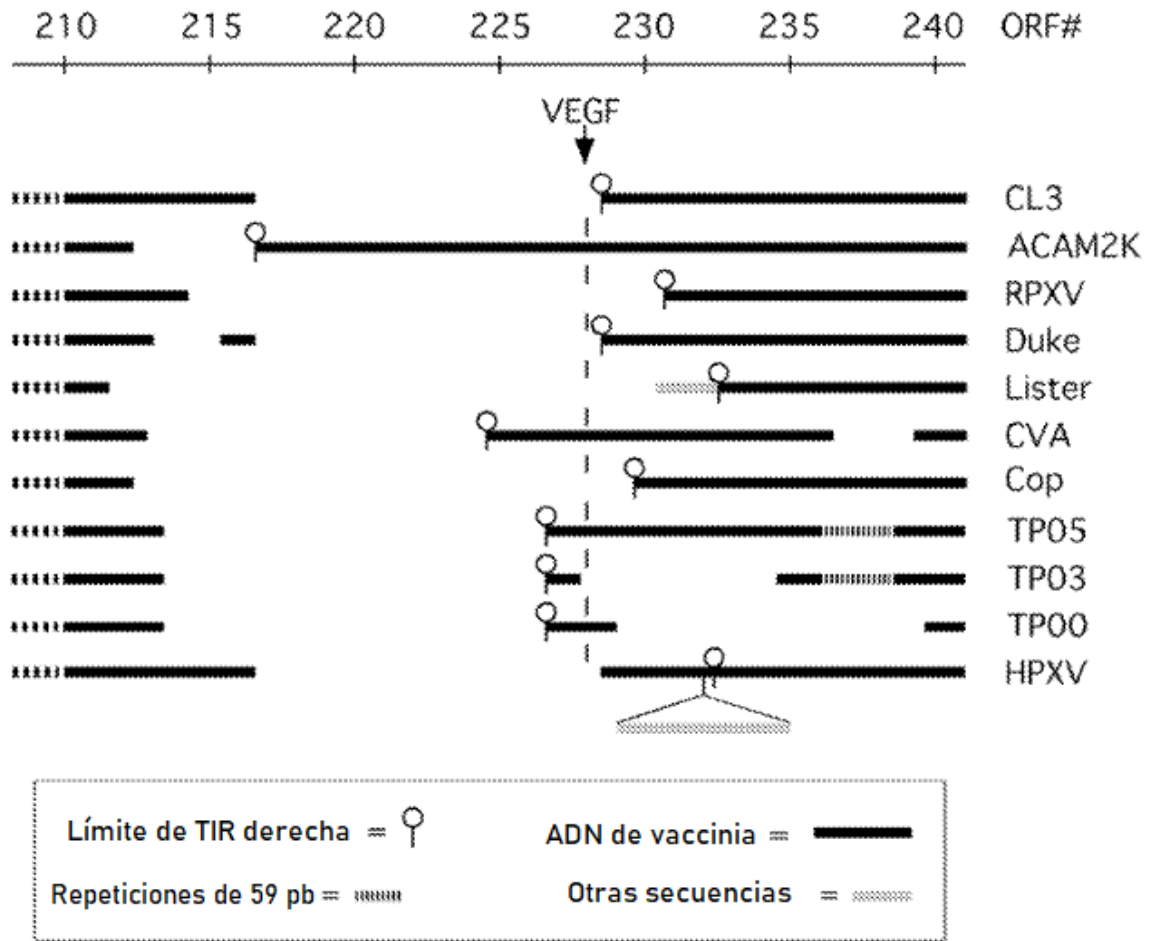


Figura 5

Genes ubicados en una eliminación de 5,7 kpb en repeticiones terminales invertidas en clon de TianTan TP03

Función o característica génica	Número de gen Copenhague	TianTan TP05		TP03
		Número de Gen	Tamaño (pb)	Tamaño (pb)
Anquirina	C17L/B23R	TT_005	528	0
Desconocido	C16L/B22R	TT_006	546	0
Desconocido	C15L/B21R	TT_007	264	0
Desconocido	-	TT_008	156	0
Desconocido	C14L	TT_009	573	0
Serpina (SPI-1)	C12L	TT_010	1062	0
Factor de crecimiento deL virus vaccinia	C11R	TT_011	426	253 ¹

¹ Fragmento C-terminal

Figura 6