

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 781 852**

51 Int. Cl.:

**A61K 35/763** (2015.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

**C12N 7/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.10.2014 PCT/US2014/062676**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.05.2015 WO15066042**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.10.2014 E 14859119 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.01.2020 EP 3063279**

54 Título: **Vector de HSV oncolítico**

30 Prioridad:  
**28.10.2013 US 201361896497 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**08.09.2020**

73 Titular/es:  
**UNIVERSITY OF PITTSBURGH - OF THE  
COMMONWEALTH SYSTEM OF HIGHER  
EDUCATION (100.0%)  
200 Gardner Steel Conference Center  
Pittsburgh, PA 15260, US**

72 Inventor/es:  
**UCHIDA, HIROAKI;  
COHEN, JUSTUS;  
GLORIOSO III, JOSEPH C. y  
GRANDI, PAOLA**

74 Agente/Representante:  
**GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo**

ES 2 781 852 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 HSV oncolítico

**Antecedentes de la invención**

- 5 El glioblastoma multiforme (GBM) es una enfermedad siempre mortal a pesar de la aplicación de terapias de combinación disponibles. Los estudios preclínicos sugieren que los virus competentes para la replicación incluyendo vectores de HSV oncolíticos ("oHSV"), representan una alternativa terapéutica prometedora, pero la eficacia del tratamiento de los pacientes en los ensayos ha sido limitada. El logro de la seguridad del vector se ha basado en mutaciones del vector atenuantes que también pueden comprometer la replicación lítica en células tumorales.
- 10 H. Uchida y otros describen un tratamiento eficaz de un modelo de xenoinjerto ortotópico de glioblastoma humano usando un Virus oncolítico del Herpes Simple dirigido a EGFR, en: *Molecular Therapy* 21 (2012) 561-569.
- C. Lee y otros describen la regulación por microARN del Virus oncolítico del Herpes Simple 1 para la destrucción selectiva de las células cancerosas de la próstata, en: *Clinical Cancer Research* 15 (2009) 5126-5135.
- R. Edge y otros describen que un virus de estomatitis vesicular sensible al microARN let-7 demuestra una replicación específica del tumor, en: *Molecular Therapy* 16 (2008) 1437-1443.
- 15 El documento US 2013/071430 A1 divulga un virus vaccinia controlado por microARN, en el que una secuencia diana de un microARN expresada menos en una célula cancerosa que en una célula normal, se inserta en una región no traducida 3' del gen de B5R asociado con la proliferación viral en un virus vaccinia.
- D. Voeks y otros describen una terapia génica para el cáncer de próstata suministrada por un adenovirus ovino y mediada por la fosforilasa de nucleósido de purina y la fludarabina en modelos de ratón, en: *Gene Therapy* 9 (2002) 759-768.
- 20 T. McKee y otros describen que la degradación del colágeno fibrilar en un xenoinjerto de melanoma humano mejora la eficacia de un vector oncolítico del Virus del Herpes Simple, en: *Cancer Research* 66 (2006) 2509-2513.
- El documento WO 2011/130749 A2 divulga los vectores de HSV modificados que exhiben una mayor entrada de células, ya sea por infección directa y/o propagación lateral.
- 25 L. Menotti y otros describen una inhibición del crecimiento de un tumor humano en ratones por un virus oncolítico del Herpes Simple diseñado para dirigirse únicamente a las células HER-2 positivas, en: *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106 (2009) 9039-9044.

**Sumario de la invención**

- 30 La presente invención proporciona un oHSV capaz de la replicación del vector selectivo de tumor sin atenuación mediante la combinación del redireccionamiento del vector a los receptores de la superficie celular asociados a tumores con la inhibición de la replicación del vector por medio de un celular microARN ("miR") que está altamente expresado en el cerebro normal, pero prácticamente ausente en las células tumorales. Elementos de miR-sensibles impiden la patogénesis de los vectores en los cerebros de ratones desnudos sin impedir la replicación del vector lítica en células tumorales primarias in vitro o en un modelo de tumor cerebral xenogénico. Este nuevo diseño vectorial debe proporcionar una plataforma de vector más segura y más eficaz y puede seguir desarrollándose para su aplicación en tumores de pacientes.
- 35

**Breve descripción de las figuras**

- 40 La **Figura 1** presenta los datos de los resultados de los experimentos con respecto a la eficacia y la especificidad del elemento T124. Los plásmidos de expresión de la luciferasa de luciérnaga (fLuc) que contienen T124 (pfLuc-T124) o una secuencia de control (pfLuc-Ctrl) en el 3'UTR se co-transfectaron con un plásmido de control interno de luciferasa de renilla (prLuc) en las células transfectadas HEK293AD 24 h antes con pre-miR-124 o pre-miR-21 sintética. Las actividades de la luciferasa se midieron 48 h más tarde. Los resultados se muestran como la media  $\pm$  desviación estándar de tres determinaciones de la actividad de fLuc normalizada a la actividad rLuc. Las diferencias estadísticamente significativas entre pares se indican mediante corchetes debajo de los correspondientes valores de p (prueba t no pareada).
- 45

- 50 Las **Figuras 2** presenta los datos de los resultados de experimentos con respecto a la replicación del virus en células de glioma. (A) Diagramas vectoriales. El KOS-37 BAC parental contiene BAC flanqueado por loxP, la resistencia al cloranfenicol y las secuencias de lacZ ("BAC") entre los genes virales de UL37 y UL38 (Gierasch y otros, 2006). Las modificaciones para generar KGBAC y KG4:T124BAC se ilustran, como sigue: gB:NT, mutación doble entrada para mejorar el virus en el gen de gB; gC-eGFP, fusión de la ORF de gC completa a GFP a través de una secuencia de péptido 2A; Unión, supresión de la región de repetición interna completa, incluyendo una copia del gen de ICP4; ICP4:T124, inserción de T124 en el 3'UTR del gen de ICP4 restante. UL, segmento largo único del genoma viral; US, único segmento corto. (B) Efecto del T124 en la replicación del virus en las células de

glioma derivadas del paciente en cultivo. Las células Gli68 y GBM30 se infectaron con los virus KG o KG4:T124 por triplicado a una MOI de 0,01. En los puntos de tiempo indicados después de la infección, los lisados celulares y los sobrenadantes se recogieron y se titularon en células U2OS. Los valores son medias  $\pm$  desviación estándar. (C) Expresión de miR-124 en células infectadas Gli68 LV124. Las células se infectaron a 5 ufc/célula, seleccionado el día siguiente durante 3 días en medio que contenía puromicina, y cosechado para la extracción de ARN total. Los ARN de control fueron a partir de células Gli68 y U2OS no infectadas. Los niveles de miR-124 se determinaron por triplicado mediante QRT-PCR y se normalizaron a los niveles RNU43. Se muestra el aumento pliegue  $\pm$  desviación estándar relativa a las células U2OS.  $P < 0,05$  para todos los pares (prueba t no pareada). (D) La replicación de los virus KG y KG4:T124 en células control GBM30 y Gli68 transducidas con miR-124. Las células se infectaron con LV124 o LV137R a 5 ufc/célula, seleccionada con puromicina por 3 d, y super-infectadas a los MOI de 0,01 con KG o KG4:T124. HSV infecciosa en los lisados celulares combinados y sobrenadantes recogidos 72 y 96 h después se titularon en células U2OS. Los resultados son los valores medios  $\pm$  desviación estándar de las infecciones HSV por triplicado. Los paréntesis indican significativamente diferentes pares con los correspondientes valores de P mostrados (prueba t no pareada).

La **Figura 3** presenta los datos de los resultados de los experimentos con respecto a la replicación del virus KG4:T124 y la toxicidad en los cerebros de ratones desnudos.  $4,8 \times 10^9$  copias del genoma de KG o KG4:T124 se inyectaron por vía intracraneal en 4 BALB/c ratones desnudos cada uno ( $n = 4/\text{grupo}$ ). (A) Pesos de los animales después del momento de la inyección del vector. Izquierda, animales inyectados con KG; X, muerte del animal. Derecha, ratones inyectados con KG4:T124; círculos rellenos, sacrificio del animal. (B) Total de copias del genoma viral con el tiempo en los cerebros de ratones después de la inyección del vector. Se colectaron los cerebros de los ratones inyectados solo con KG4:T124 sacrificados los días 5, 14, 21 y 33 después de la inyección del vector y el último animal superviviente del grupo inyectado con KG se sacrificó en el día 5 con síntomas graves de la enfermedad, se aisló el ADN, y el número total de genomas de vectores virales por cerebro se determinaron por qPCR. (C) Gráfica de supervivencia Kaplan-Meier de los animales en este experimento. Las flechas indican los días de sacrificio de los animales individuales del grupo inyectado con KG4:T124.  $P = 0,0058$ , prueba de log-rank.

La **Figura 4** presenta los datos de los resultados de los experimentos relativos al tratamiento de vector HSV miR-124-sensible redirigido a EGFR de un modelo de ratón desnudo de glioblastoma humano. Células GBM30 trituradas se implantaron por vía intracraneal y 5 días más tarde se inyectó PBS o  $1,8 \times 10^8$  gc de virus KGE o KGE-4:T124 en las mismas coordenadas. (A) Gráfica de supervivencia Kaplan-Meier. Estadísticas de log-rank: KGE contra PBS,  $P = 0,0188$ ; KGE-4:T124 contra PBS,  $P = 0,0009$ ; KGE contra KGE-4:T124,  $P = 0,8327$ . (B) Pesos de los animales con el tiempo después del implante de células tumorales. X, muerte del animal o eutanasia.

La **Figura 5** presenta datos que demuestran que KMMP9 media la sobreexpresión de MMP9 activa enzimáticamente. (A) Estructura de KMMP9 y KGw. (B) Análisis de transferencia Western de lisados celulares de células Vero infectadas con cualquiera de KMMP9, KGw, o KG (MOI = 0,1).  $\beta$ -tubulina y glicoproteína B HSV se visualizaron como controles de carga celular y viral respectivamente. Líneas celulares primarias GBM (C) o células Vero (D) se infectaron con KGw o KMMP9 a MOI = 1. El lisado celular y el sobrenadante se recogieron 24 h después de la infección y se combinaron (C) o cargaron por separado (D) en un gel de gelatina al 10 % de poliacrilamida/0,1 %. Después de la electroforesis, el gel se incubó durante la noche a 37 °C, se tiñeron con 0,05 % de azul de Coomassie y se destiñeron, y la imagen se grabó. Abreviaturas: M, KMMP9; G, KGw; KG, virus control; un., no infectada; gB, glicoproteína B; Sup., sobrenadante.

La **Figura 6** presenta datos que demuestran que KMMP9 y KGw exhiben patrones de entrada y crecimiento de las células comparables. (A) Células listadas a la izquierda del panel fueron infectadas con el virus en las multiplicidades de los paneles listados anteriormente gc/célula. Después de 6 horas se fijaron las células y se inmunotñeron para ICP4. Células GBM30 (B) y GBM169 (C) se disociaron y se infectaron con KMMP9 o KGw a 200 gc/célula. Los lisados celulares se recogieron a 1, 2, 4, y 6 dpi y los de copias del genoma viral se determinaron por qPCR. No se observaron diferencias significativas entre los dos virus en cualquiera de las líneas de la célula huésped (GBM30:  $P = 0,20$ ; GBM169:  $P = 0,11$ ).

La **Figuras 7** presenta datos que demuestran que KMMP9 muestra la destrucción de células tumorales similares o mejores en comparación con KGw in vitro. Las células U87, SNB19 o GBM30 se infectaron a 10 o 100 gc/célula durante 3 ó 7 días. Porcentaje de supervivencia celular en relación a las células no infectadas se determinó mediante el ensayo de MTT ( $n = 3$ ; asterisco:  $P < 0,05$ , Prueba T de Student).

La **Figura 8** presenta datos que demuestran que MMP9 mejora la infectividad de oHSV en esferoides. Células GBM30 se cultivaron en suspensión y se infectaron con  $1 \times 10^3$  pfu de cualquiera de KMMP9 o KGw. Fluorescencia verde del casete GC-T2a-eGFP en ambos vectores se visualizó todos los días a 2-6 dpi en esferoides de todo el montaje. (A) Imágenes representativas a los 3 y 5 dpi. (B) Cuantificación promedio de la señal de eGFP en 6 esferoides por vector demostrando un aumento de la infectividad de aproximadamente 2 veces más de KMMP9 sobre KGw ( $P = 0,006$ ). (C-E) Dos grupos de esferoides GBM30 se infectaron con KMMP9 o KGw en  $4 \times 10^7$  copias del genoma por esferoide. Esferoides se fijaron, se tiñeron con DAPI, e imágenes confocales de sección Z se registraron en intervalos de 5  $\mu\text{m}$ . Panel (C) muestra 2 esferoides representativos de cada uno de los grupos KMMP9 y KGw después de la reconstrucción 3D a partir de 0  $\mu\text{m}$  a 150  $\mu\text{m}$ . Azul, DAPI; verde, eGFP. Panel (D) muestra secciones de Z de 2 esferoides de cada grupo en  $Z = 100 \mu\text{m}$ . (E) Cada esferoide se dividió en 5

segmentos en términos de profundidad en el eje Z (de abajo hacia arriba: 0-20  $\mu\text{m}$ , 25-50  $\mu\text{m}$ , 55-80  $\mu\text{m}$ , 85-100  $\mu\text{m}$ , 105-120  $\mu\text{m}$ , y 125-140  $\mu\text{m}$ ). La intensidad relativa de la señal en cada segmento del esferoide se calculó por medio del promedio de la señal de eGFP dividida por la señal DAPI.  $n = 7$ ; asterisco:  $P < 0,05$ .

5 La **Figura 9** presenta datos relativos al tratamiento KMMP9 de un modelo de ratón desnudo de GBM. Células GBM30 se implantaron por vía intracraneal y KMMP9, KGw o PBS se inyectaron 5 días más tarde en las mismas coordenadas (0,5 mm anterior, lateral de 2 mm (derecha), de 3 mm de profundidad a bregma). Los animales se controlaron diariamente y se sacrificaron en presencia de signos de morbilidad. Los datos se presentan como una gráfica de supervivencia de Kaplan-Meier. Los animales tratados con KMMP9 o KGw sobrevivieron significativamente más tiempo que los tratados con PBS ( $P < 0,01$ ). No se encontró diferencia significativa entre KMMP9 y KGw ( $n = 4$ ;  $P = 0,61$ , prueba de log-rank).

10 La **Figura 10** representa las imágenes de MRI del cerebro valoradas en T2 de un animal por tratamiento de virus- o simulación de animales GBM30 (PBS)-tratados. (A) Los tratamientos se llevaron a cabo 10 días después de la implantación de GBM30 y las imágenes se recogieron 1 día antes del tratamiento (día -1) y los días 3, 6, 9 y 13 después del tratamiento. (B) Volúmenes tumorales calculados en los mismos días.

## 15 Descripción detallada de la invención

La invención se define por las reivindicaciones adjuntas

20 El ligando no-HSV del oHSV inventivo se incorpora en una glicoproteína expuesta en la superficie oHSV, tales como gD o gC para facilitar la orientación de la célula deseada con el ligando. Por ejemplo, el ligando puede ser incorporado entre los residuos 1 y 25 de gD. Los ligandos preferentes para la orientación GBM y otras células de cáncer incluyen los dirigidos a EGFR y EGFRvIII, CD133, CXCR4, antígeno carcinoembrionario (CEA), CLC-3/anexina-2/MMP-2, receptor de la transferrina humana y EpCAM, y el ligando puede dirigirse como tal a una molécula de receptor o de la superficie celular, es decir, el ligando puede ser capaz de unirse específicamente a tal molécula de receptor o de la superficie celular. Los ligandos específicos EGFR-y-EGFRvIII, tales como anticuerpos, scFv (anticuerpos de cadena sencilla) y VHH (anticuerpos de dominio único), se han descrito en la literatura (Kuan y otros, *Int. J. Cancer*, 88, 962-69 (2000); Wickstrand y otros, *Cancer Res*, 55(14):3140-8 (1995); Omidfar y otros, *Tumor Biology*, 25:296-305 (2004); ver también Uchida y otros, *Molecular Therapy*, 21:561-9 (2013); véase también Braidwood y otros, *Gene Ther.*, 15, 1579-1592 (2008)).

30 El oHSV también o alternativamente puede direccionarse por medio de la incorporación de ligandos a otras moléculas de la superficie celular o receptores que no son necesariamente asociados al cáncer. Por ejemplo, los ligandos pueden incluir los dominios de unión de ligandos naturales (por ejemplo, factores de crecimiento (tales como EGF, los cuales puede dirigirse a EGFR, NGF, los cuales pueden dirigirse a trkA, y similares)), hormonas peptídicas o no peptídicas, seleccionar péptidos para la unión una molécula diana (por ejemplo, proteínas de repetición de anquirina diseñadas (DARPs)), etc. El oHSV inventivo también puede incluir una forma mutante de gB y/o gH que facilita la entrada del vector a través de los receptores no canónicos (y preferentemente también tienen tales mutaciones en uno o ambos de estos genes en el genoma oHSV).

35 La secuencia diana de microARN preferente para su inclusión en el vector de la invención (preferentemente en forma de múltiples copias de la misma en tándem) es miR-124, la cual tiene una aplicación particular para aplicaciones neuronales (por ejemplo, para proteger a las neuronas no cancerosas cuando se emplea el oHSV inventivo para el tratamiento de tumores del sistema nervioso, tales como GBM).

40 La secuencia(s) diana microARN está/están incluidas preferentemente en la región no traducida 3' ("UTR") de un gen de HSV, para silenciar ese gen en presencia de la microARN. Preferiblemente, copias múltiples (por ejemplo, dos copias, tres copias, cuatro copias, cinco copias, seis copias, o más) de la secuencia diana microARN se insertan en tándem. Preferiblemente, las múltiples copias de la secuencia diana micro-ARN están separadas por espaciadores de cuatro o más nucleótidos (con mayor preferencia ocho o más nucleótidos). Sin desear estar limitado por la teoría, se cree que una mayor separación (por ejemplo, mayor de aproximadamente 8 nucleótidos) proporciona una mayor estabilidad.

50 Con mayor preferencia, para ayudar en la protección de las células no cancerosas del efecto lítico de la infección por HSV, las múltiples copias de la secuencia diana microARN se insertan en el 3' UTR de un gen de HSV que es esencial para la replicación en las células no cancerosas, lo cual es conocido por las personas de experiencia ordinaria. Preferiblemente, el sitio es el 3' UTR del gen microARN diana en su locus normal (o nativo) dentro del genoma de HSV. Un oHSV preferente de la presente invención incluye múltiples copias de la secuencia diana microARN insertado en el 3' UTR del gen de ICP4, tales como una o ambas copias del gen de ICP4, en los vectores que tienen ambas copias nativas del gen de ICP4.

55 El genoma del vector HSV inventivo que comprende adicionalmente uno o más casetes de expresión exógena (es decir, que contiene la codificación de secuencias en unión operativa con los promotores, potenciadores y otros elementos reguladores adecuados). El casete de expresión exógena codifica una metaloproteinasas de matriz, tales como la metaloproteinasas de matriz 9 ("MMP9"), que degrada el colágeno de tipo IV, un componente principal de la matriz extracelular (ECM) y las membranas del sótano de los glioblastomas (Mammato y otros, *Am J. Pathol.*

183(4):1293-1305 (2013), doi: 10.1016/j.ajpath.2013.06.026 Epub 2013 5 de agosto), mejorando así la infección de las células tumorales por el vector de la invención debido a la dispersión lateral y la mejora de la actividad de matar el tumor. También se prefieren casetes de expresión que codifican otros genes que mejoran la propagación lateral del HSV inventivo.

5 Otros casetes de expresión exógena preferentes codifican proteínas o polipéptidos que inducen la respuesta inmune del paciente contra el cáncer o tumor al que el HSV inventivo se va a emplear para el tratamiento. Por ejemplo, tales casetes de expresión pueden incluir uno o más factores nucleicos de ácidos de codificación tales como citoquinas (por ejemplo, IL-2 e IFN B), un anticuerpo dirigido contra la proteína 4 asociada a linfocitos T citotóxica ("CTLA-4") (Hodi y otros, N. Engl J. Med, 363 (8):711-23 (2010)), un anticuerpo dirigido contra el ligando de la proteína de la muerte celular programada 1 ("PD1") o el propio receptor (Topalian y otros, N. Engl. J. Med., 366(26):2443-54 (2012)), y la molécula de adhesión celular epitelial ("EpCAM") (Patriarca y otros, Cancer Treatment Rev., 38:68-75 (2012)). Como se señaló anteriormente, EpCAM también puede servir como un marcador de orientación para ser reconocido por el vector inventivo. Además, donde el cáncer a tratar es distinto de un cáncer CNS, y más específicamente que no sea glioma o glioblastoma, otro transgén puede codificar el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos ("GM-CSF").

15 Otros casetes de expresión preferentes codifican proteínas o polipéptidos que catalizan la conversión de los profármacos a agentes activos. Por ejemplo, tales casetes de expresión pueden codificar enzimas tales como citosina desaminasa, que puede convertir 5-fluorocitosina ("5-FC") en 5-fluorouracilo ("5-FU") localmente en los tumores o células cancerosas infectadas con el vector de la invención (véase, por ejemplo, Akimoto y otros, J. Ophthalmol., 86(5): 20 581-86 (2002)), con el fin de permitir al 5-FU actuar a nivel local dentro de tales células o tumores mientras se reduce al mínimo la exposición sistémica a 5-FU. Del mismo modo, un casete de tal expresión puede codificar timidina quinasa (tk) (por ejemplo, operativamente unido a un promotor inmediatamente temprano o promotor constitutivo fuerte HSV), que puede activar ganciclovir, o fosforilasa de nucleósido de purina (PNP), que puede bloquear o atenuar la actividad de la ribonucleótido reductasa. En ciertas realizaciones, los vectores de la invención también pueden contener un gen HSV tk nativa funcional.

25 Dentro de los vectores de la invención, las secuencias de codificación dentro de los casetes de expresión exógena pueden estar en unión operativa con cualquier secuencia de regulación genética deseada, tal como promotores constitutivos o promotores inducibles o específicos de tejido, muchos ejemplos de los cuales son conocidos en la técnica. Por ejemplo, un promotor constitutivo empleado comúnmente es el promotor citomegalovirus humano (hCMV) 30 y otros promotores también se puede utilizar, por ejemplo, el promotor CMV potenciador temprano /pollo beta actina (CAG), y promotor inmediato temprano HSV (por ejemplo, promotor ICP4), y similares.

Además, el genoma del vector de la invención contiene una delección de la región de repetición interna (unión) que comprende una copia de cada uno de los genes diploides ICP0, ICP34.5, LAT y ICP4 junto con el promotor para el gen de ICP47.

35 El vector de la invención se puede producir por métodos estándar conocidos por los expertos ordinarios en el campo de la virología HSV. Sin embargo, para facilitar la manipulación del genoma de HSV y la producción del vector de la invención, la invención también proporciona un ácido nucleico que codifica el vector de la invención. Un ácido nucleico preferente es un cromosoma artificial bacteriano ("BAC") que codifica el vector de la invención, lo que facilita la manipulación del HSV en un sistema bacteriano.

40 Se debe reconocer que el oHSV de la invención puede utilizarse para atacar y matar las células cancerosas, ya sea in vivo o in vitro. Una aplicación preferente es la de emplear el vector de la invención terapéuticamente, en particular en pacientes humanos y/o contra los tumores humanos/de las células (que puede ser xenoinjertos en diversas especies de mamíferos). Sin embargo, el método también puede emplearse en animales, tales como animales de compañía (por ejemplo, gatos y perros), o animales de importancia agrícola (por ejemplo, ganado, ovejas, caballos, y similares), o de importancia zoológica. Tumores ejemplares/células cancerosas, el tratamiento de las cuales se pueden emplear los vectores de la invención, implican cánceres del sistema nervioso central, y, en particular, el glioblastoma multiforme.

45 En general, el vector oHSV inventivo es más útil cuando suficiente del virus puede ser entregado a una población de células para asegurar que las células se enfrenten a un número adecuado de virus. Por lo tanto, la presente invención proporciona una acción, preferentemente una acción homogénea, que comprende el vector oHSV inventivo. La preparación y el análisis de las poblaciones de HSV es bien conocido en la técnica. Por ejemplo, un stock viral se puede fabricar en botellas de rodillos que contienen células transducidas con el vector oHSV. El stock viral puede entonces ser purificado en un gradiente nycodenze continuo, y alícuotas y se almacena hasta que se necesite. Los stocks virales varían considerablemente en el título, dependiendo en gran medida del genotipo viral y las líneas de protocolo y de células utilizadas para prepararlas. Preferiblemente, una acción de este tipo tiene un título viral de al menos aproximadamente 105 unidades formadoras de placa (pfu), tales como al menos aproximadamente 106 pfu o incluso con mayor preferencia al menos aproximadamente 107 pfu. En realizaciones aún más preferente, el título puede ser al menos aproximadamente 108 pfu, o al menos aproximadamente 109 pfu, y las poblaciones de alto título de al menos aproximadamente 1010 pfu o al menos son los más preferentes aproximadamente 1011 pfu. Tales títulos se pueden establecer utilizando células que expresan un receptor al que se dirige el vector, por ejemplo.

La invención proporciona adicionalmente una composición que comprende el vector oHSV inventivo y un vehículo, preferentemente un vehículo fisiológicamente aceptable. El portador de la composición puede ser cualquier vehículo adecuado para el vector. El vehículo será típicamente líquido, pero también puede ser sólido, o una combinación de componentes líquidos y sólidos. El portador es deseablemente un (por ejemplo, un fisiológicamente o farmacológicamente aceptable) vehículo farmacéuticamente aceptable (por ejemplo, excipiente o diluyente). Los vehículos farmacéuticamente aceptables son bien conocidos y están fácilmente disponibles. La elección del vehículo se determinará, al menos en parte, por el vector particular y el método particular usado para administrar la composición. La composición puede comprender además cualquier otro componente adecuado, especialmente para la mejora de la estabilidad de la composición y/o su uso final. En consecuencia, existe una amplia variedad de formulaciones adecuadas de la composición de la invención. Las siguientes formulaciones y métodos son meramente ejemplares y no son en modo alguno limitativos.

Las formulaciones adecuadas para la administración parenteral incluyen soluciones acuosas y no acuosas, isotónicas estériles de inyección, que pueden contener antioxidantes, amortiguadores, bacteriostáticos, y solutos que hacen la formulación isotónica con la sangre del receptor prevista, y suspensiones acuosas y estériles no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión, solubilizantes, agentes espesantes, estabilizantes, y conservantes. Las formulaciones se pueden presentar en dosis unitaria o contenedores multidosis sellados, tales como ampollas y viales, y pueden almacenarse en un estado liofilizado (liofilizado) que requiere sólo la adición de un excipiente líquido estéril, por ejemplo, agua, para inyecciones, inmediatamente antes de su uso. Las soluciones y suspensiones para inyección extemporánea se pueden preparar a partir de polvos estériles, gránulos y comprimidos del tipo descrito previamente.

Además, la composición puede comprender agentes terapéuticos o biológicamente activos adicionales. Por ejemplo, los factores terapéuticos útiles en el tratamiento de una indicación particular pueden estar presentes. Los factores que controlan la inflamación, tales como el ibuprofeno o los esteroides, pueden formar parte de la composición para reducir la hinchazón y la inflamación asociados con la administración in vivo del vector y la angustia fisiológica. Supresores del sistema inmunitario se pueden administrar con el método de composición para reducir cualquier respuesta inmune al propio vector o asociada con un trastorno. Alternativamente, potenciadores inmunes pueden ser incluidos en la composición para regular al alza las defensas naturales del cuerpo contra la enfermedad, en particular contra el cáncer o tumor contra el que el vector de la invención se va a utilizar. Los antibióticos, es decir, los microbicidas y fungicidas, pueden estar presentes para reducir el riesgo de infección asociada a los procedimientos de transferencia de genes y otros trastornos.

### 30 Ejemplo 1

**Propósito: El glioblastoma multiforme (GBM)** es un tumor cerebral agresivo sin tratamiento eficaz. Los vectores oHSV se han diseñado para el tratamiento de modelos de GBM humanos en animales, pero la eficacia en los ensayos de pacientes ha resultado decepcionante. Hemos tratado de desarrollar un nuevo diseño que logra la lisis tumoral de oHSV altamente selectiva y sin atenuación del vector.

**Diseño Experimental:** Se presenta un oHSV diseñado para infectar y replicarse selectivamente en células tumorales por medio de redirigir completamente la infección a través del EGFR y mediante el bloqueo de la replicación del vector en las neuronas normales a través de la introducción de múltiples copias de la secuencia reconocida por la miR-124 neuronal específica en el 3'UTR del gen HSV inmediato temprano esencial ICP4. miR-124 fue elegida porque es altamente expresada en las neuronas, pero casi indetectable en GBM. El vector se ensayó en experimentos de tratamiento de cerebro-tumor xenogénicos para la eficacia.

**Resultados:** Altas dosis de inoculación intracraneal de ratones desnudos con el virus de miR-124-sensible no produjeron evidencia de la patogénesis o virus de replicación, en consonancia con el bloqueo de la replicación viral en el cerebro normal por interacción de miR-124 con ICP4 mRNA. El tratamiento de un modelo ortotópico de GBM primario humano en ratones desnudos con EGFR-redirigido, HSV miR124 sensible demostró una supervivencia a largo plazo ( $\geq 50\%$ ) comparable al tratamiento con el virus EGFR-redirigido parental, lo que indica que el reconocimiento de elementos de miR-124 no condujeron a una eficacia reducida.

**Conclusiones:** Concluimos que la especificidad de no atenuado oHSV se puede maximizar mediante la combinación de dirigir hacia el tumor de la infección del vector con la eliminación de la replicación del vector sin dirección a través de microARN celulares que están ausentes en los tumores, pero altamente expresado en el tejido normal.

### 50 Introducción

GBM es una de las formas más malignas de cáncer para los que el tratamiento eficaz sigue siendo difícil de alcanzar. La práctica médica estándar, tales como la cirugía y la radio y quimioterapia han demostrado beneficio clínico limitado a largo plazo. Vectores oncolíticos, incluyendo los derivados de virus del herpes simple tipo 1 (oHSV-1), están en desarrollo en un número de laboratorios como una potencial estrategia terapéutica alternativa (1). Vectores oHSV han demostrado ser prometedores para el tratamiento de modelos animales de GBM primario, pero aparte de proporcionar un buen perfil de seguridad, los resultados de los ensayos clínicos de fase temprana no han demostrado eliminación tumoral eficaz o mejoras consistentes en la supervivencia del paciente (2) (3).

El método más común para lograr atenuación del HSV ha sido eliminar funcionalmente genes no esenciales que eluden al anfitrión de la respuesta inmune innata a la infección, proporcionar piscinas de nucleótidos para la replicación en las células que no se dividen, tales como neuronas, y evitar la apoptosis celular (2). La replicación del virus en células de cáncer se ve facilitada por la pérdida de ciertas respuestas inmunitarias innatas (4), así como por una rápida división celular y las vías de apoptosis inactivas (2). Sin embargo, estas propiedades no son uniformemente suficientes para la replicación vigorosa de oHSV actuales en tumores.

Como primer paso para mejorar la eficacia del vector previamente hemos desarrollado métodos para la reorientación completa de HSV con el fin de redirigir la infección de los receptores canónicos de entrada HSV a receptores de superficie celular de tumores altamente expresados (por ejemplo, EGFR y EGFRvIII) (5). oHSV redirigido mostró robusta actividad oncolítica y alta especificidad para las células GBM humanas, dando como resultado un alto nivel de destrucción de tumores humanos en un modelo de ratón ortotópico. Además, este vector tratamiento produjo supervivencia a largo plazo de la mayoría de los animales tratados sin toxicidad vector-asociado. Sin embargo, los marcadores de superficie celular asociados a tumores más altamente expresados son compartidos hasta cierto punto con tipos de células normales y por lo tanto hemos tratado de aumentar la seguridad de un vector atenuado de tumor dirigido mediante un mecanismo independiente para bloquear la replicación del virus en el cerebro normal sin reducir la replicación en el tumor.

Estudios recientes han aprovechado las diferencias en los perfiles de expresión de microARN (miARN) entre las células normales y cancerosas como un enfoque alternativo para la orientación del tumor (6). Al menos 30 miARN se han identificado que son expresados diferencialmente en glioblastoma, las neuronas y las células precursoras neurales (CPN) (7) (8), lo que sugiere que estas diferencias se pueden usarse para limitar la replicación del virus en las células normales del cerebro al tiempo que permite la replicación sin obstáculos en las células de tumor. En el presente documento se demuestra que la incorporación de elementos miR-124 de reconocimiento en el gen de ICP4 esencial del virus de tipo salvaje esencialmente impidió la replicación de HSV en el tejido cerebral normal donde miR-124 es altamente expresado. Además, se muestra que los elementos de respuesta de miR-124 no redujeron la actividad oncolítica de un vector de EGFR-redirigido. Es importante destacar que, ya que el fenotipo tumoral depende de la continua ausencia de miR-124, el potencial de la regulación de miR-124 como un mecanismo de escape celular de la replicación viral lítica limitará la capacidad de proliferación incontrolada de la célula y por lo tanto no comprometerá la eficacia del vector. La producción de vectores se lleva a cabo en células que carecen de miR-124 y por lo tanto no hay presión selectiva para producir mutantes del virus de miR-124-resistentes durante la preparación de stock. En conjunto, estas características proporcionan la seguridad del vector y la selectividad del tumor y sugieren una estrategia general para el diseño de vector oncolítico adecuado para una amplia gama de tipos de tumores.

## Resultados

**Validación de un elemento de respuesta de miR-124.** Entre múltiples miARN que se expresan en niveles más altos en las neuronas que en las células de GBM, miR-124 es el más abundante con una expresión mínima en GBM (6). Hemos diseñado un elemento de respuesta miR-124 (T124) que consiste en 4 copias en tándem del complemento inverso de miR-124 maduro separado por espaciadores 8 nucleótidos (nt) diferentes. Para evaluar la funcionalidad de esta secuencia, se insertó en el 3'UTR de un plásmido de expresión de luciferasa de luciérnaga (fLuc) y se realizaron experimentos de co-transfección con un precursor de miARN específico (pre-miR-124) o no específico (pre-miR 21) en células de osteosarcoma U2OS que según los informes expresan poco o nada de miR-124 (9); un plásmido de expresión de luciferasa de Renilla (rLuc) se incluyó para la normalización. Los resultados (pfLuc-T124, Figura 1) demostraron una grave reducción de la actividad fLuc a las 24 h en las células co-transfectadas con pre-miR-124 en comparación con células simuladas co-transfectadas o células co-transfectadas con pre-miR-21. En contraste, se observó poca diferencia en la expresión fLuc entre las células transfectadas con un plásmido fLuc de control que contiene 4 copias de la secuencia de miR-21 en sentido inverso (Ctrl-pfLuc, simulación) y co-transfecciones de pfLuc-Ctrl, ya sea con pre-miR 21 o pre-miR-124 (Figura 1). Estos resultados demostraron la funcionalidad del elemento de T124 como un objetivo eficaz y específico para la restricción mediada por miR-124 de la expresión génica.

**Sensibilidad de replicación de HSV modificado con T124 a la expresión de miR-124.** Utilizamos doble recombinación Roja en *E. coli* (10) para introducir una serie de modificaciones en KOS-37 BAC, un clon de longitud completa del genoma de la cepa KOS de HSV-1 en un cromosoma artificial bacteriano (BAC) (11). El producto, KGBAC (Figura 2A), se elimina de la región de repetición interna (unión) que contiene una copia de cada uno de los genes diploides ICP0, ICP34.5, LAT y ICP4 junto con el promotor para el gen de ICP47. Esta supresión facilita la manipulación de las copias restantes de los 4 genes eliminados, proporciona abundante espacio para la incorporación potencial de transgenes que mejoran la actividad oncolítica de los virus, y aumenta la especificidad tumoral mediante la reducción de la expresión del factor de neurovirulencia ICP34.5 (12); eliminación de la expresión ICP47 se beneficia el reconocimiento inmune de las células cancerosas infectadas por las células T específicas del virus (4). KGBAC también contiene el marco de lectura abierto GFP (ORF) fusionado a la glicoproteína C (gC) ORF a través de una secuencia de péptido 2A (13) (14) para permitir la monitorización de tarde (después de la replicación) de la expresión génica viral. Por último, KGBAC contiene un par de mutaciones en el gen gB se muestra por nosotros para mejorar la entrada a través de receptores HSV no canónica (15) (16). Nos vuelven a combinar la secuencia T124 en el 3'UTR del gen de ICP4 restante de KGBAC para generar KG4:T124BAC (Figura 2A). Ambas construcciones BAC se convierten en partículas de virus con la eliminación simultánea de las secuencias de BAC localizados entre los sitios

loxP mediante transfección de células U2OS-Cre. Después de la purificación de placas, KG y KG4: se prepararon y se titularon en células U2OS reservas de virus T124.

Se determinó en primer lugar si la inclusión de los 4 tándem sitios diana de miR-124 en el 3'UTR de ICP4 afectada la replicación del virus en las células humanas en cultivo de GBM. Los resultados (Figura 2B) mostraron que KG4:T124 replicado con una cinética similar como KG en esferoides de dos líneas primarias de glioblastoma, Gli68 y GBM30, y los rendimientos de los 2 virus no eran sustancialmente diferentes en cada punto de tiempo. Se determinó a continuación si la replicación del virus y el rendimiento fueron sensibles a la transducción de estas líneas con un ser humano de miR-124 que expresan lentivirus (LV124). Higo. 2C muestra los niveles relativos de miR-124 en U2OS, Gli68, y las células Gli68-LV124 medido por qPCR en tiempo real de transcripción inversa ARN pequeños y estandarizada a los niveles endógenos RNU43. KG creció igualmente bien y para títulos similares en células Gli68 Gli68-LV124 y transducidas con un constructo lentiviral que expresa el complemento inverso de humano miR-137 (LV137R) (Figura 2D). Por el contrario, KG4:T124 creció pobremente en la antigua en comparación con este último, y resultados similares se obtuvieron con LV124- frente a las células transducidas GBM30-LV137R (Figura 2D). En combinación, estas observaciones indican fuertemente que (i) el elemento T124 en el gen de ICP4 fue eficaz como un medio para limitar la replicación de HSV de una manera miR-124-dependiente, y (ii) los niveles endógenos de miR-124 en la 2 GBM líneas eran lo suficientemente bajo como para minimizar este efecto. Además, los datos de QRT-PCR confirmó la idoneidad de las células U2OS para el crecimiento intacta y la titulación de KG4:T124 en comparación con KG.

**KG4:T124 no se replica en cerebro de ratón o causa la enfermedad.** Después de haber demostrado que exógenos expresión de miR-124 en células de glioma primarias en cultivo es altamente eficaz en la prevención KG4: el crecimiento del vector T124, próximo a prueba si los niveles endógenos de miR-124 en cerebro de ratón eran suficientes para prevenir la replicación del vector y la neuropatogénesis típico asociado con el virus de tipo salvaje; observamos que madura humana y de ratón de miR-124 son idénticos en secuencia (17). Utilizamos ratones desnudos para estos experimentos para limitar el efecto de la respuesta anti-viral de acogida y de ese modo facilitar la identificación de los efectos directos de la inserción T124 en el virus. Ratones BALB/c<sup>nu/nu</sup> se eligieron porque estos animales son muy sensibles a la replicación de HSV y la patogénesis (18) (19) (20) y se han utilizado anteriormente para los experimentos de eficacia de tratamiento de tumor con células tumorales humanas (21) (12, 22) (5). Se comparó el vector KG control y el miR-124-sensibles KG4 vector de prueba: T124 por su capacidad tanto para replicarse en el cerebro de ratones desnudos y causar una infección letal después de la inoculación intracraneal de copias del genoma igual (GC) números ( $4,8 \times 10^9$  GC) en el hemisferio derecho. Los resultados mostraron que la inyección del vector de control dio como resultado la rápida muerte de los animales dentro de los 5 días (Figura 3A y 3C) con un aumento de dos veces en total número gc presente dentro de los cerebros infectados (Figura 3B). Por el contrario, no hubo ningún cambio observable en la salud de la KG4:T124 inyecta ratones durante el periodo de observación de 33 días, como se ejemplifica por su aumento de peso normal hasta el sacrificio (Figura 3A), y el contenido de GC viral disminuyó de manera constante durante este periodo de tiempo de aproximadamente 0.4% de la entrada (Figura 3B). La diferencia en la supervivencia entre los animales inoculados con el control o la prueba del vector (Figura 3C) fue altamente significativa ( $P= 0,0058$ , prueba de log-rank), lo que indica que 4 copias de la secuencia de reconocimiento de miR-124 insertadas en el 3'UTR el gen de ICP4 eran capaces de bloquear la replicación del vector letal en los cerebros de ratones desnudos altamente HSV-sensibles. Por lo tanto, estas secuencias por sí solas eran suficientes para prevenir la toxicidad del vector en el cerebro.

Para confirmar la sugerencia de estos resultados que la pérdida o inactivación mutacional de los sitios diana miR-124 durante la preparación del stock de virus era poco frecuente en el mejor de ADN fue aislado de la KG4:T124 de stock viral y se sometió a PCR a través del sitio de inserción T124 en el ICP4 3'UTR. El análisis de los productos por electroforesis en gel y secuenciación de ADN no mostró tamaños de los productos de PCR anormales o pruebas de la variabilidad de nucleótidos (datos no mostrados). Del mismo modo, la PCR y análisis de secuencias de ADN total aislado de cerebro en 3 h o inoculación 21 días post intracraneal de ratones BALB/c normales con KG4: virus T124 ( $1,5 \times 10^{10}$  gc) no mostró alteraciones a través de la región T124 (datos no mostrados). Estos resultados disiparon las preocupaciones sobre el potencial de la selección de miR-124-insensibles variantes durante KG4: el crecimiento del virus T124 o in vivo.

**Los elementos de respuesta de miR-124 no imparten la actividad de HSV oncolítica dirigida a EGFR.** A continuación, trató de determinar si los elementos miR-124 de protección de reconocimiento afectados adversamente a la actividad para matar tumores virales en un modelo de ratón desnudo de GBM humano. Desde KG era altamente tóxico cuando se inocula en el cerebro de estos animales (Figura 3C), el uso de este virus como un control de tratamiento en los experimentos de supervivencia de ratones portadores de tumores podría resultar en la muerte del animal debido al virus en lugar de tumor y por tanto, no era atractiva. En lugar de ello, hemos introducido las 4 copias del sitio de unión de miR-124 en un derivado totalmente redirigido EGFR de KG basado en nuestras observaciones publicadas que totalmente EGFR redirigido con de tipo salvaje HSV-1 KOS no es tóxico para el cerebro de ratón desnudo, pero es efectiva en el tratamiento de ortotópico GBM humano en ratones desnudos (5). Por lo tanto la comparación de las versiones de EGFR-redirigido de KG y KG4:T124, referido como KGE y KGE-4:T124, respectivamente, deben identificar cualquier efecto limitantes de los sitios de miR-124 en la actividad oncolítica viral. Utilizamos, células GBM30 de formación de esferas derivadas del paciente para establecer tumores intracraneales agresivos en ratones desnudos (5). Se observaron diariamente los animales sacrificados y en presencia de signos de morbilidad. Similar a nuestros resultados publicados, los ratones inyectados con PBS 5 d después de la inoculación

de células de tumor en las mismas coordenadas estereotácticas murieron dentro de semanas de la implantación de células tumorales (mediana 21,5 d; la Figuras 4A y 4B). En contraste, los tratamientos de tumores usando ya sea el virus EGFR-redirigido control, KGE, o el vector que contiene T124-redirigido, KGE-4:T124, un medio protegido de los animales durante la duración del experimento (90 d) y los tiempos de supervivencia media para estos dos grupos fueron comparables (79,5 y 85,5 d, respectivamente,  $P=0,83$ , log-rank test). Estos resultados indican que los sitios de miR-124 en el gen de ICP4 de KGE-4:T124 no afectó la eficacia del tratamiento del tumor GBM30.

## Discusión

El objetivo era diseñar un vector de HSV oncolítico que expresa el complemento completo de funciones virales, pero sólo pueden infectar células que expresan un receptor GBM-asociado y replicar con alta eficiencia sólo en el tumor y no en las células normales del cerebro. Tumor-selectiva la infección y el crecimiento del virus lítico se basaron en una combinación de reorientación completa viral de entrada (5) y la restricción de los genes miARN mediada celular de la replicación del virus en el tejido cerebral normal. Esta combinación de promesas transduccionales y post-transcripcional de orientación tumorales para proporcionar una oHSV muy seguro y eficaz ya que la infección lítica requiere dos características separadas de la célula diana que son importantes para el mantenimiento del fenotipo del tumor, el receptor diana y un miARN expresión específica de tumor perfil. Esta estrategia general es aplicable en términos generales el uso de elementos de orientación y miARN-respuesta adaptados a los diferentes tipos de cáncer; su aplicación puede ser optimizada para terapia personalizada teniendo en cuenta las posibles diferencias en el antígeno específico y la expresión de los genes miARN entre tumores individuales del mismo tipo.

En GBM, la expresión génica alterada incluye regulación sustancial baja de múltiples miARN en comparación con tejido cerebral normal (23-25), presentando varios miARN posibles que se pueden usar para atenuar preferentemente la replicación del virus por ingeniería en el cerebro normal. Debido a que el miR-124 es reconocido como un potente inductor de la diferenciación neuronal (26) y está entre los más altamente miARN-regulado en GBM (6), nos centramos en este miARN como un medio para bloquear la replicación oHSV en el tejido cerebral normal. Los sitios de reconocimiento de la repetición de miR-124 (T124) se introdujeron en el 3'UTR del gen de ICP4 viral cuyo producto es absolutamente necesario para poner en marcha el ciclo lítico HSV. Se encontró que, en las células de glioma, el T124 + virus pueda replicarse esencialmente como robusto como el virus de control que carece T124 mientras que la expresión lentiviral de miR-124 bloquea selectivamente su replicación. Además, el elemento T124 fue suficiente para proteger completamente ratones desnudos de muy alta dosificación vector intracraneal ( $4,8 \times 10^9$  partículas), mientras que el vector de control mató a todos los animales dentro de los cinco días. Determinación del total de los números de copias del genoma viral en el cerebro de estos animales no mostró evidencia de replicación T124 + vector sino más bien una disminución gradual en el contenido de genoma viral en el tiempo. La secuencia T124 fue estable según la evaluación de tamaño y análisis de la secuencia de la 3' UTR ICP4 amplificada en el ADN purificado a partir de las reservas de virus y animales infectados, coherente con la falta de manifiesto neuro-patogénesis en animales libres de tumor o supervivientes a largo plazo de nuestro experimento el tratamiento de tumores. Finalmente, se utilizó un virus redirigido que falla para infectar células de ratón para demostrar que el elemento T124 no redujo la eficacia oncolítica de este virus en un modelo GBM humano en ratones desnudos.

La combinación dirigir el virus a los receptores de tumores y bloquear el miARN mediado de la replicación del virus en las células normales mejora la especificidad de la diana del virus lítico mediante el bloqueo de la infección productiva de las células normales que pueden compartir el receptor diana con el tumor (por ejemplo, EGFR). Aunque nuestros resultados muestran que la inserción de cuatro copias de la secuencia diana para miR-124 en la 3'UTR del gen de ICP4 bloquea completamente dosis muy alta viral neuro-patogenia en ratones desnudos, no todas las células cerebrales expresar miR-124. No se espera que, por ejemplo, células precursoras neuronales (CPN), situados en el hipocampo y sub-ventricular zona (ZVS) para ser protegido por las secuencias diana de miR-124 ya que estas células tienen un perfil de expresión de los genes miARN que es similar a la de las células GBM, incluyendo la mínima expresión de miR-124 (27). Sin embargo, varios miARN se expresan en hasta 100 veces mayores niveles en puntos de contacto que en gliomas (27) (28) (29) (30), lo que sugiere la posibilidad de utilizar sitios diana para miARN adicionales de ingeniería en el mismo u otros genes esenciales del mismo virus para bloquear la replicación en una gama más amplia de las células cerebrales, sin comprometer la replicación del virus específico de tumor.

Aunque el estudio sugiere que la combinación de virus que se direcciona a un antígeno tumoral y la replicación de los genes miARN restringida en el tejido normal es una estrategia atractiva para viroterapia eficaz y altamente específico de tumor, es probable que los tumores individuales difieren en su respuesta al tratamiento debido a variabilidad en los niveles de antígeno tumoral y tal vez el contenido de miARN. Por ejemplo, hay diferencias significativas entre los tumores clasificados como GBM, e incluso dentro de los subtipos de GBM definidas molecularmente, la heterogeneidad en los perfiles de expresión génica restos (31). Así, un solo virus redirigido no será eficaz contra todos o todos GBM GBM del mismo subtipo. Además, se puede anticipar que las poblaciones de células resistentes pueden surgir en los tumores en gran medida oHSV sensibles como consecuencia de la variabilidad preexistente o inducida por tratamiento de célula a célula dentro del tumor. Los acontecimientos de los últimos años sugieren que la pequeña población de células, auto-renovación de quimio y radio-resistentes madre del cáncer (CSC) identificados en muchos tipos de tumores diferentes son los objetivos más relevantes para la terapia (32). Aunque la comparación de los CSC individuales de un tumor dado es problemática, es probable que su variabilidad dentro de un tumor está limitada con respecto al de la población completa de células tumorales. Informes en la literatura se describen diferentes de células madre glioma (GSC) marcadores (33) y los virus oncolíticos redirigidos se pueden utilizar para distinguir el significado

de cada uno de estos para el establecimiento y mantenimiento GBM humano en ratones desnudos. Anticipamos que los tumores que muestran respuestas parciales a vectores redirigidos individuales pueden ser tratados de manera más eficaz con combinaciones de vectores redirigidos a diferentes marcadores candidatos GSC. Como cada uno de estos vectores pueden también dirigirse a ciertas células normales, similares a nuestros virus EGFR redirigido, el bloqueo de la replicación del virus miARN mediada en estas células normales será de importancia creciente. Además, puede ser posible obtener una mayor especificidad de tipo celular o utilizando promotores específicos de la etapa de desarrollo para controlar la expresión de las funciones clave de replicación viral, como pionera en el campo oHSV por Kambara y sus colegas (34). Aunque estas características pueden proporcionar cócteles vector oncolíticos muy activos y específicos, es de destacar que los vectores tales como KGE-4:T124 tiene un amplio espacio para acomodar transgenes que pueden mejorar la eficacia terapéutica, tales como genes que codifican moduladores inmunes, los inhibidores de migración de células tumorales, o enzimas proteolíticas que degradan la matriz extracelular del tumor y con ello facilitan la propagación del virus de la intratumoral.

En resumen, el KGE-4: vector T124 descrita en este ejemplo representa un nuevo tipo de oHSV que contiene el complemento completo de funciones replicativas del virus, sino que se deriva la especificidad tumor de una combinación de envoltura viral reorientación a los receptores asociados a tumores y la sensibilidad de replicación para miARNs que se expresan en el tejido normal, pero no en el tumor. Esta combinación de sistemas de control se puede aplicar a otros tipos de tumores, pero no se ha descrito previamente en vectores oncolíticos. Las ventajas clave de nuestra estrategia son (i) que el vector no contiene genes defectuosos, lo que permite la replicación del virus máxima en los tumores para proporcionar viroterapia oncolítico óptima, y (ii) que la replicación del vector requiere tanto la expresión de importante de la superficie celular asociado al tumor marcadores y un perfil específico de tumor de la expresión de los genes miARN que difiere sustancialmente de la de tejido normal. El argumento más convincente para nuestra estrategia es que los miARNs elegidos para controlar la replicación del vector en el cerebro normal no puede ser regulado hasta en el glioblastoma, sin comprometer el fenotipo tumoral (7, 25, 35); pérdida del receptor diana, tales como la variante específica de tumor EGFRvIII reconocida por nuestro vector, puede tener un efecto similar. Así, mientras en la mayoría de las terapias contra el cáncer del tumor se desarrolla la capacidad de escapar al tratamiento, este resultado es menos probable con los virus, regulados por miARNs antígeno-específica de tumor. En conjunto, estos argumentos apoyan la expectativa de que nuestro enfoque proporcionará sistemas de vectores de HSV oncolíticos altamente selectivos, seguros y eficaces para el tratamiento de GBM y otros tipos de cáncer.

## Materiales y Métodos

**Cultivo de células.** U2OS, células HEK293T y HEK293AD eran de ATCC (Manassas, VA) y se cultivaron en un incubador de CO<sub>2</sub> al 5% a 37 °C en medio recomendado por la ATCC suplementado con 5 a 10% de suero (v/v) fetal bovino (FBS, Sigma, St. Louis, MO). Una línea celular U2OS expresan de forma estable la recombinasa Cre (U2OS-Cre) se generó por transducción retroviral (YM y JCG, resultados no publicados). GBM30 y Gli68 los pacientes derivados de las líneas de glioma esferoide primarias, generosamente proporcionados por EA Chiocca (Harvard Medical School, MA), fueron cultivadas en medio Neurobasal (Gibco/Invitrogen/Life Technologies, Carlsbad, CA) más un 2 % (v/v) B27 c/s vitamina A, 2 mg/mL de anfotericina B (Lonza, Walkersville, MD), 100 µg/mL de gentamicina (Lonza), 2 mM L-glutamina (Cellgro, Manassas, VA), además de 10 ng/mL epidérmico humano recombinante de factor de crecimiento (EGFhr) y 10 ng/mL de factor recombinante humano de crecimiento fibroblástico básico (bFGF) (ambos de Shenandoah Biotechnology, Warwick, PA).

**Plásmidos.** pLuc-T124 contiene cuatro repeticiones en tándem del complemento inverso de la secuencia de HSA-mir-124 separados por 8 nt, mientras que pLuc-Ctrl contiene cuatro repeticiones en tándem de la secuencia inversa hsa-miR-21 separados por 8 nt. Ambos plásmidos se construyeron por inserción de oligonucleótidos complementarios hibridados en el 3'UTR del gen de la luciferasa en pMIR-REPORT™ (miARN Expression Reporter Vector System; Ambion, Austin, TX). Los oligonucleótidos fueron T124-F, T124-R, TconF y TconR (Tabla 1). Oligonucleótidos hibridados fueron digeridos con SpeI y SacI, y se ligaron a pMIR-REPORT™ digerido con SpeI- SacI.

**Ingeniería del genoma de HSV.** KOS-37 BAC (11), que contiene la cepa KOS completa HSV-1 en el genoma de un genoma artificial bacteriano (BAC), fue proporcionado amablemente por David Leib (Dartmouth Medical School, NH). El (U S) región HSV corta única en este BAC está en la orientación inversa en relación a la secuencia publicada (posiciones 132,275-145,608) de HSV-1 KOS (36) (número de acceso GenBank JQ673480). Las modificaciones que se detallan más adelante fueron introducidas por doble recombinación Red, esencialmente como se describe por Tischer y otros (10). Los plásmidos pEPkan-S y pBAD- I-SCE (10) fueron generosamente proporcionadas por Nikolaus Osterrieder (Universidad Libre de Berlín, Alemania). Los cambios se verificaron mediante análisis de PCR, análisis de FIGE de digestiones con enzimas de restricción y secuenciación de ADN local.

Los vectores utilizados en este estudio se obtuvieron de forma secuencial como sigue. KGBAC fue derivado de KOS-37 BAC por delección de la región de repetición interna HSV completa o "unión" (IRL, IRS), fusión de la proteína verde fluorescente (GFP) marco de lectura abierto (ORF) de la glicoproteína C (gC) ORF a través de Thosea Asigna virus 2A (T2A) terminación de traducción/secuencia de reinicio (13) (37), y la introducción de dos mutaciones de cambio de sentido en la secuencia de codificación gB (gB:N/T; (15) KG4:T124<sup>BAC</sup> fue creado a partir de KG<sup>BAC</sup> mediante la inserción del elemento de T124 de pLuc-T124 en el 3'UTR del gen de ICP4. El vector redirigido KGE<sup>BAC</sup> se deriva de KG<sup>BAC</sup> por sustitución de la región amino-terminal del gen gD con la correspondiente región de gD-scEGFR que contiene la secuencia para un anticuerpo de cadena sencilla-EGFR humano específico entre las posiciones gD 1 y 25

y una mutación de sentido erróneo en el codón 38 (5) KGE-4:T124<sup>BAC</sup> combina las modificaciones de KG4:T124<sup>BAC</sup> y KGE<sup>BAC</sup>.

**Crecimiento y purificación del virus.** El ADN del BAC se convierte en un virus infeccioso mediante transfección de células U2OS-Cre utilizando Lipofectamine™ Reactivo LTX (Invitrogen); Cre recombinase expresa en estas células permitido la retirada de los elementos de BAC inhibidores del crecimiento de virus y gen lacZ adyacentes situados en KOS-37 derivados betweenloxP señales de recombinación (BAC y 11). Placas individuales se aislaron mediante dilución limitante y se probaron para la eliminación del gen lacZ por tinción con X-gal (38). Placas incoloras se sometieron a dos rondas adicionales de se confirmó por secuenciación de ADN local del ADN del virión purificado dilución limitante y la eliminación precisa de la región de BAC/lacZ. Los títulos de las reservas de virus biológicos (UFP/mL) fueron establecidos en las células U2OS; títulos físicos en copias de genoma (gc)/mL se determinaron por cuantitativa en tiempo real PCR (qPCR) para el gen gD viral, como se describe a continuación.

**Ensayo de Luciferasa.** Las células HEK293AD se transfectaron con el plásmido de expresión de luciferasa de Renilla prLuc junto con combinaciones de diferentes plásmidos de expresión de luciferasa de luciérnaga y pre miR™ miARN precursores (Ambion) usando Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Al día siguiente, las células se lisaron y los luciferasa de luciérnaga-ratios de expresión-a Renilla se determinaron utilizando un luminómetro Berthold LB-953 AutoLumat (Berthold Technologies USA, Oak Ridge, TN).

**Expresión lentiviral de miARN.** El ADN genómico de U-87 de células de glioblastoma humano se utilizó como molde para la amplificación por PCR de la secuencia humana pri-miR-124 del gen de hsa-miR-124-3 usando High Fidelity AccuPrime rica en GC del ADN de la polimerasa (Invitrogen) y el par de cebadores de miR-124 que aparece en la Tabla 1. el producto 320-bp se digirió con BamHI y NheI, se clonó entre los sitios correspondientes en el intrón de miARNselect PEP-MIR vector (Cell Biolabs, San Diego, CA), y la secuencia confirmada. La región-miR-124 promotor-intrón-PRI fue trasladada posteriormente en Pcdh-CMV-MCS-EF1-Puro (System Biosciences, Mountain View, CA) mediante el reemplazo del promotor EF1 residente para generar lentiviral plásmido de expresión Pcdh-miR-124. Los mismos procedimientos se utilizaron para construir el plásmido de control lentiviral (Pcdh-miR-137R) que contiene la secuencia de pri-miR-137 en la orientación inversa; los cebadores de PCR utilizados para la pri-miR-137 clonación se enumeran en la Tabla 1. Los lentivirus LV124 y LV137R fueron producidos por co-transfección de Pcdh-miR-124 o Pcdh-miR-137R, respectivamente, con plásmidos de embalaje pLP1, PLP2, el PLP -VSVG (Invitrogen) en células HEK293T. Los sobrenadantes se recogieron 72 h después, pasó a través de un filtro de 0,45 µm (Millipore, Billerica, MA), y se concentraron por centrifugación durante 16 horas a 4 °C y 6800 x g. Los sedimentos se resuspendieron en DMEM y se titularon como unidades formadoras de colonias resistentes a la puromicina (CFU) por mL en células HEK293T.

2x10<sup>5</sup> células Gli68 o GBM30 trituradas se infectaron en suspensión, ya sea con o LV124 LV137R a 5 ufc/célula en presencia de 8 µg/mL de polibreno durante 90 min y se sembraron. Las células se alimentaron al día siguiente con medio fresco que contenía 30 µg/mL de puromicina y super-infectadas 72 h más tarde, ya sea con o KG KG4: virus T124 a una MOI de 0,01 pfu/célula. En la infección 72 y 96 h después de HSV, partículas de virus infecciosos fueron recolectados de las células y los sobrenadantes y se titularon en células U2OS. Se aisló ARN a partir de cultivos paralelos de células Gli68 LV124 infectados después de 72 h de selección de puromicina para la determinación de miR-124 niveles de QRT-PCR, como se describe a continuación.

**Aislamiento de ARN y (RT)-qPCR de transcripción inversa.** El ARN total fue extraído de U2OS, Gli68, y las células Gli68 LV124 infectados usando el reactivo TRIzol (Invitrogen) según las instrucciones del fabricante. Las muestras de ARN se trataron con DNasa I (Invitrogen), cuantificaron utilizando un espectrofotómetro NanoDrop 2000c (Thermo-Fisher, Pittsburgh, PA) y se visualizaron en un gel de MOPS-formaldehído para la garantía de calidad. Maduros niveles hsa-miR-124 se determinaron en relación a RNU43 de acuerdo con el protocolo de TaqMan Pequeño ARN ensayos (Applied Biosystems/Life Technologies, Carlsbad, CA). Cebadores TaqMan y sondas fueron de Applied Biosystems. Todas las reacciones de PCR TaqMan se realizaron por triplicado.

**Animales.** 3-4 semanas de edad BALB/c atómicos nu/nu ratones fueron adquiridos de Charles River Laboratory (Wilmington, MA) y alojados en un centro de BSL2. Todos los procedimientos con animales se realizaron de acuerdo con los requisitos y recomendaciones de la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (Institute for Laboratory Animal Research, 1985) aprobado por la Universidad de Pittsburgh Institucional Cuidado de Animales y el empleo Comisión (IACUC).

**Toxicidad intracraneal.** Inoculaciones de virus se realizaron intracraneales un descrito (5). Los ratones recibieron 4,8x10<sup>9</sup> gc de KG o KG4: virus T124 (n = 4/grupo). Los animales se monitorizaron diariamente para detectar signos de morbilidad y se pesaron cada dos días. Todos los ratones del grupo KG murió el día 5 y un ratón del otro grupo fueron sacrificados el mismo día. Animales restantes de la KG4: grupo T124 se sacrificaron el día 14, 21 y 33. Los cerebros enteros se recogieron a partir de ratones sacrificados para la extracción de ADN total y qPCR para los genomas virales, como se describe a continuación.

**qPCR para los genomas virales.** Se extrajo el ADN a partir de cerebros de ratón o las reservas de virus utilizando el DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Valencia, CA) de acuerdo con el procedimiento del fabricante. Una curva estándar para qPCR fue generado en el ADN de un plásmido pENTR1A (Invitrogen) que contiene la completa HSV-1 (cepa

KOS) GD secuencia de codificación (pE-gD18) utilizando el protocolo descrito en el Applied Biosystems StepOne™ y StepOnePlus™ Real-Time Manual de Sistemas de PCR. Los cebadores y las secuencias de la sonda se enumeran en la Tabla 1.

Tabla 1

Diana	Secuencia
<b>Directa</b>	
T124 (pfluc-T124)	5'-P-ctagtGGCATTCAACCGGTGCCCTT AtagaccagGGCATTCAACCGGTGCCCTTA aggatcctGGCATTCAACCGGTGCCCTTAatg actgcGGCATTCAACCGGTGCCCTTAgagct-3' SEQ ID NO:1
Tcon (pfluc-Ctrl)	5'-P-ctagtGGCGCCGgctctcggaccgcaic gttATCGAATAGTCTGACTACAACttagtac cagATCGAATAGTCTGACTACAACttaggat cctATCGAATAGTCTGACTACAACttagact gcATCGAATAGTCTGACTACAACtTetegag ct 3' SEQ ID NO:2
Pri-miR124 (LV124)	5'-TCGAGGATCCTGTCAGTGCACGCACAC-3' SEQ ID NO:3
Pri-miR137R (LV137R)	5'-TCGAGGATCCAAACACCCGAGGAAATGAAAAG-3' SEQ ID NO:4
gD (qPCR)	5'-CCCCGCTGGAACtACTATGACA-3' SEQ ID NO:5
<b>Inversa</b>	
T124 (pfluc-T124)	5'-P-cTAAAGGCACGGGTGAATGCCg cagtcATAAAGGCACGGGTGAATGC CaggatectTAAAGGCACGGGTGAAT GCC.ctggtactaTAAAGGCACGGGTGAATGCCa-3' SEQ ID NO:6
Tcon (pfluc-Ctrl)	5'-P-cgagAGTTGTAGTCAGACTATTc GATgcagtcATAGTTGTAGTCAGACT ATTcGATagatcctAGTTGTAGTCAG ACTATTcGATctggtactaAGTTGTAG TCAGACTATTcGATaacgagtggtctccc gagacGGGCGCCa-3' SEQ ID NO:7
Pri-miR124 (LV124)	5'-TGCAGCTAGCCAGACCCCTCCCCTCGC-3' SEQ ID NO:8
Pri-miR137R (LV137R)	5'-TCGAGCTAGCGCTCAGCGAGCAGCAAGAGTTC-3' SEQ ID NO:9
gD (qPCR)	5'-GCATCAGGAACCCCGAGTT-3' SEQ ID NO:10
<b>Sonda</b>	
5'-FAM-TTCAGCGCCGTcAGCGAGGA-TAMRA-3' SEQ ID NO:11	

Modelo de tumor y el tratamiento. Implantación intracraneal de células GBM30 humanos en ratones desnudos se realizaron como se describe (5). En 5 d, virus ( $1,8 \times 10^8$  gc de KGE o KGE-4:T124,  $n = 8/\text{grupo}$ ) o PBS ( $n = 2$ ) se inocularon en las mismas coordenadas, como también se describe (5). La salud animal y el bienestar fueron monitorizados como se ha descrito anteriormente en "Toxicidad intracraneal." Los animales fueron sacrificados al mostrar signos de morbilidad.

El análisis estadístico de prueba t no pareada con la corrección de Welch se realizó utilizando GraphPad Prism versión 6.01 para Windows (GraphPad Software, La Jolla, CA; [www. Graphpad.com](http://www.graphpad.com)). Los datos de supervivencia de los animales se trazaron como gráficos de Kaplan-Meier y se compararon mediante Mantel-Cox log-rank test utilizando el mismo software.

## 10 Referencias para el Ejemplo 1

1. Parker JN, Bauer DF, Cody JJ, Markert JM. Oncolytic viral therapy of malignant glioma. *Neurotherapeutics*. 2009;6:558-69.
2. Grandi P, Peruzzi P, Reinhart B, Cohen JB, Chiocca EA, Glorioso JC. Design and application of oncolytic HSV vectors for glioblastoma therapy. *Expert Rev Neurother*. 2009;9:505-17.
3. Markert JM, Medlock MD, Rabkin SD, Gillespie GY, Todo T, Hunter WD, y otros Conditionally replicating herpes simplex virus mutant, G207 for the treatment of malignant glioma: results of a phase I trial. *Gene therapy*. 2000;7:867-74.
4. Todo T. Oncolytic virus therapy using genetically engineered herpes simplex viruses. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library*. 2008;13:2060-4.
5. Uchida H, Marzulli M, Nakano K, Goins WF, Chan J, Hong CS, y otros Effective treatment of an orthotopic xenograft model of human glioblastoma using an EGFR-retargeted oncolytic herpes simplex virus. *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy*. 2013;21:561-9.
6. Gaur A, Jewell DA, Liang Y, Ridzon D, Moore JH, Chen C, y otros Characterization of microARN expression levels and their biological correlates in human cancer cell lines. *Cancer research*. 2007;67:2456-68.
7. Karsy M, Arslan E, Moy F. Current Progress on Understanding MicroRNAs in Glioblastoma Multiforme. *Genes & cancer*. 2012;3:3-15.
8. Riddick G, Fine HA. Integration and analysis of genome-scale data from gliomas. *Nature reviews Neurology*. 2011;7:439-50.
9. Kumar MS, Lu J, Mercer KL, Golub TR, Jacks T. Impaired microARN processing enhances cellular transformation and tumorigenesis. *Nature genetics*. 2007;39:673-7.
10. Tischer BK, von Einem J, Kaufer B, Osterrieder N. Two-step red-mediated recombination for versatile high-efficiency markerless ADN manipulation in *Escherichia coli*. *Biotechniques*. 2006;40:191-7.
11. Gierasch WW, Zimmerman DL, Ward SL, Vanheyningen TK, Romine JD, Leib DA. Construction and characterization of bacterial artificial chromosomes containing HSV-1 strains 17 and KOS. *J Virol Methods*. 2006;135:197-206.
12. Bennett JJ, Delman KA, Burt BM, Mariotti A, Malhotra S, Zager J, y otros Comparison of safety, delivery, and efficacy of two oncolytic herpes viruses (G207 and NV1020) for peritoneal cancer. *Cancer gene therapy*. 2002;9:935-45.
13. Szymczak AL, Vignali DA. Development of 2A peptide-based strategies in the design of multicistronic vectors. *Expert Opin Biol Ther*. 2005;5:627-38.
14. Doronina VA, Wu C, de Felipe P, Sachs MS, Ryan MD, Brown JD. Site-specific release of nascent chains from ribosomes at a sense codon. *Mol Cell Biol*. 2008;28:4227-39.
15. Uchida H, Chan J, Goins WF, Grandi P, Kumagai I, Cohen JB, y otros A double mutation in glycoprotein gB compensates for ineffective gD-dependent initiation of herpes simplex virus type 1 infection. *Journal of virology*. 2010;84:12200-9.
16. Uchida H, Chan J, Shrivastava I, Reinhart B, Grandi P, Glorioso JC, y otros Novel Mutations in gB and gH Circumvent the Requirement for Known gD Receptors in Herpes Simplex Virus 1 Entry and Cell-to-Cell Spread. *Journal of virology*. 2013;87:1430-42.
17. Cao X, Pfaff SL, Gage FH. A functional study of miR-124 in the developing neural tube. *Genes & development*. 2007;21:531-6.
18. Fujioka N, Akazawa R, Ohashi K, Fujii M, Ikeda M, Kurimoto M. Interleukin-18 protects mice against acute herpes simplex virus type 1 infection. *Journal of virology*. 1999;73:2401-9.
19. Manickan E, Rouse RJ, Yu Z, Wire WS, Rouse BT. Genetic immunization against herpes simplex virus. Protection is mediated by CD4+ T lymphocytes. *Journal of immunology*. 1995;155:259-65.
20. Sethi KK, Omata Y, Schneweis KE. Protection of mice from fatal herpes simplex virus type 1 infection by adoptive transfer of cloned virus-specific and H-2-restricted cytotoxic T lymphocytes. *The Journal of general virology*. 1983;64 (Pt 2):443-7.
21. Currier MA, Gillespie RA, Sawtell NM, Mahller YY, Stroup G, Collins MH, y otros Efficacy and safety of the oncolytic herpes simplex virus rRp450 alone and combined with cyclophosphamide. *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy*. 2008;16:879-85.
22. Hong CS, Fellows W, Niranjan A, Alber S, Watkins S, Cohen JB, y otros Ectopic matrix metalloproteinase-9 expression in human brain tumor cells enhances oncolytic HSV vector infection. *Gene therapy*. 2010;17:1200-5.

23. Zhang Y, Chao T, Li R, Liu W, Chen Y, Yan X, y otros MicroRNA-128 inhibits glioma cells proliferation by targeting transcription factor E2F3a. *J Mol Med.* 2009;87:43-51.
24. Shi L, Cheng Z, Zhang J, Li R, Zhao P, Fu Z, y otros hsa-mir-181a and hsa-mir-181b function as tumor suppressors in human glioma cells. *Brain Res.* 2008;1236:185-93.
- 5 25. Silber J, Lim DA, Petritsch C, Persson AI, Maunakea AK, Yu M, y otros miR-124 and miR-137 inhibit proliferation of glioblastoma multiforme cells and induce differentiation of brain tumor stem cells. *BMC Med.* 2008;6:14.
26. Maiorano NA, Mallamaci A. The pro-differentiating role of miR-124: indicating the road to become a neuron. *RNA Biol.* 7:528-33.
27. Lavon I, Zrihan D, Granit A, Einstein O, Fainstein N, Cohen MA, y otros Gliomas display a microARN expression profile reminiscent of neural precursor cells. *Neuro Oncol.* 12:422-33.
- 10 28. Karpowicz P, Willaime-Morawek S, Balenci L, DeVeale B, Inoue T, van der Kooy D. E-Cadherin regulates neural stem cell self-renewal. *J Neurosci.* 2009;29:3885-96.
29. Katoh Y, Katoh M. Hedgehog signaling, epithelial-to-mesenchymal transition and miARN (review). *Int J Mol Med.* 2008;22:271-5.
- 15 30. Ocana OH, Nieto MA. A new regulatory loop in cancer-cell invasion. *EMBO Rep.* 2008;9:521-2.
31. Verhaak RG, Hoadley KA, Purdom E, Wang V, Qi Y, Wilkerson MD, y otros Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer cell.* 17:98-110.
- 20 32. Nduom EK, Hadjipanayis CG, Van Meir EG. Glioblastoma cancer stem-like cells: implications for pathogenesis and treatment. *Cancer journal.* 2012;18:100-6.
33. He J, Liu Y, Lubman DM. Targeting glioblastoma stem cells: cell surface markers. *Current medicinal chemistry.* 2012;19:6050-5.
34. Kambara H, Okano H, Chiocca EA, Saeki Y. An oncolytic HSV-1 mutant expressing ICP34.5 under control of a nestin promoter increases survival of animals even when symptomatic from a brain tumor. *Cancer research.* 2005;65:2832-9.
- 25 35. Xia H, Cheung WK, Ng SS, Jiang X, Jiang S, Sze J, y otros Loss of brain-enriched miR-124 microARN enhances stem-like traits and invasiveness of glioma cells. *The Journal of biological chemistry.* 2012;287:9962-71.
36. Macdonald SJ, Mostafa HH, Morrison LA, Davido DJ. Genome sequence of herpes simplex virus 1 strain KOS. *Journal of virology.* 2012;86:6371-2.
- 30 37. Kaji K, Norrby K, Paca A, Mileikovsky M, Mohseni P, Woltjen K. Virus-free induction of pluripotency and subsequent excision of reprogramming factors. *Nature.* 2009;458:771-5.
38. Krisky DM, Marconi PC, Oligino T, Rouse RJ, Fink DJ, Glorioso JC. Rapid method for construction of recombinant HSV gene transfer vectors. *Gene therapy.* 1997;4:1120-5.

## Ejemplo 2

- 35 Este ejemplo describe armar un tumor objetivo oHSV tipo 1 con metaloproteinasas de la matriz 9 para la distribución del vector mejorada y actividad destructora.

### Materiales y métodos

- 40 **Líneas celulares.** Las células SNB19 glioblastoma humano, U251, U87 (kindly provided by Dr. H Okada, University of Pittsburgh), J/A, J/C, J/EGFR [9], de riñón de mono verde africano células Vero y 7b [15] fueron cultivadas por métodos estándar.

Las células se cultivaron en medio de Eagle modificado por Dulbecco (Life Technologies, Grand Island, NY) suplementado con 10% de suero fetal bovino (Sigma. St. Louis, MO). líneas celulares de glioblastoma primario GBM169, OG2 (kindly provided by Dr. Balveen Kaur, Ohio State University), GBM30 fueron cultivadas como esferoides en medio Neurobasal complementado con Glutamax, B27, humana  $\beta$ -FGF, EGF, heparina y penicilina-estreptomocina.

- 45 **Plásmidos.** KGw BAC se generó a partir KGE-4:T124BAC por inserción de un casete de puerta de enlace amplificado a partir de pcADN3.1GW con el cebador 5'-TGCCCGTCGCGCGTGTGGATGTTAATAAATAACACATAAATTTGGCTGGCCACTAGTCCAGTGTGGTGG-3' (SEQ ID NO: 12)

- 50 y 5'-CTGAAATGCCCCCCCCCTTGC GGGCGGTCCATTAAGACAACAAACAAA TCCCCAGCATGCCTGCTATTGT-3'. (SEQ ID NO: 13)

pEnCM se hizo por clonación del promotor CAG del plásmido pCAGH [10] en pENTR-MMP9. pENTR-MMP9 se hizo por clonación de cADN MMP9 de un plásmido se informó anteriormente, pCMV6-XL4-MMP9, en pEntr1A plásmido [13].

- 55 **Ingeniería del genoma de HSV.** KOS-37 BAC [14], que contiene la cepa KOS completa HSV-1 en el genoma de un genoma artificial bacteriano (BAC), fue proporcionado amablemente por David Leib (Dartmouth Medical School, NH). La recombinación doble rojo en *E. coli* [24] fue utilizado para introducir una serie de modificaciones en KOS-37 BAC, un clon de longitud completa del genoma de la cepa KOS de HSV-1 en un cromosoma artificial bacteriano (BAC) [14].

El producto, KGBAC (Figura 5), se elimina para la repetición interna (unión) región que contiene una copia de cada uno de los genes diploides ICP0, ICP34.5, LAT y ICP4 junto con el promotor para el gen de ICP47.

KGwG4: T124BAC (referido como KGw) se creó a partir KGE-4:T124BAC (discutido en el Ejemplo 1) por la inserción del casete Gateway (de pcADN3.1GW) y la secuencia de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina en la región intergénica UL3-UL4 través la tecnología de recombinación Red/ET (Gene Bridges GmbH, Heidelberg). La MMP9 expresando vector KMMP9G4: T124BAC (referido como KMMP9) se derivó de KGwG4: T124BAC por la sustitución de la casete de GW con el CAG casete promotor-MMP9 de pEnCM por reacción LR Clonase. Con el fin de producir los virus, Vero 7b células fueron transfectadas con cualquiera KGwG4: T124BAC o KMMP9G4: T124BAC. Todos los vectores recombinantes fueron confirmados por FIGE-mapping, PCR y secuenciación de ADN a través de regiones modificadas pertinentes.

**Crecimiento purificación del virus.** El ADN del BAC se convierte a virus infecciosos mediante la transfección de células Vero 7b utilizando Lipofectamine™ LTX reactivo (Invitrogen). Títulos biológicos de las reservas de virus (pfu/mL) se establecieron en células Vero; títulos físicos en copias de genoma (gc)/mL se determinaron por cuantitativa en tiempo real PCR (qPCR) para el gen gD viral, como se describe a continuación.

**qPCR para los genomas virales.** Se extrajo ADN de las reservas de virus utilizando el DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Valencia, CA) de acuerdo con el procedimiento del fabricante. Una curva estándar para qPCR fue generado en el ADN de un plásmido pENTR1A (Invitrogen) que contiene la completa HSV-1 (cepa KOS) GD secuencia de codificación (pE-gD18) utilizando el protocolo descrito en el Applied Biosystems StepOne™ y StepOnePlus™ Real-Time Manual de Sistemas de PCR. Los cebadores y las secuencias de la sonda se enumeran: GD adelante: 5'-CCCCGCTGGAAGTACTATGACA-3' (SEQ ID NO: 14); GD inversa: 5'-GCATCAGGAACCCCAGGTT-3' (SEQ ID NO: 15); sonda: 5'FAM-TTCAGCGCCGTCAGCGAGGA-TAMRA-3' (SEQ ID NO: 16)

**Western Blot.** Las células se lisaron en tampón NP40 1 %, los lisados a electroforesis a través de 10 % en geles de SDS-poliacrilamida, y manchas de proteínas se hacen reaccionar con anticuerpo policlonal anti MMP-9-anticuerpo (dilución 1: 1000) (Abcam, Cambridge, MA) o con anti-gD anticuerpo (1: 2000) (Santa Cruz, CA) y conjugado con HRP anti-anticuerpo secundario de conejo (Sigma, St. Louis, MO). Las transferencias se desarrollaron con sustrato de quimioluminiscencia (Amersham Pharmacia, Piscataway, NJ). La parte inferior de cada mancha se hizo reaccionar con anticuerpo policlonal anti-beta-tubulina (1: 3000) (Sigma, St. Louis, MO) para detectar diferencias de carga. Las transferencias se desarrollaron con SuperSignal West Dura Substrato quimioluminiscente (Thermo Scientific, Rockford, IL).

**Zimografía de gelatina.** Las muestras no fueron tratadas con agente reductor ni calentado antes separaron en un gel de SDS-poliacrilamida al 10 % que contiene 0,2 % de gelatina. El gel se lavó en tampón de lavado zimografía (10 mM Tris pH 7,5, 2,5% Triton X-100), se incubaron a 37 °C durante 16 h en tampón de incubación (50 mM Tris pH 7,5; 5 mM de CaCl<sub>2</sub>, 1µM ZnCl<sub>2</sub>), se tiñeron con 1 % de Coomassie azul brillante R-250 y se destiñó con tampón de decoloración (4 % de metanol, 8 % de ácido acético) [13].

**Ensayo de entrada.** J/A, las células J/C y J/EGFR se infectaron a 10000, 1000 o 100 gc/célula con KMMP9, KGw o KG (que expresa gD: wt) durante 6 horas y a inmunotinción con el ratón monoclonal anti-ICP4 (1:300; Santa Cruz Biotechnology) y Cy3 conjugado de oveja anti-IgG de ratón (1:400; Sigma) [9].

**Ensayo de MTT.** Las células se sembraron en placas de 48 pocillos y se infectaron a 100 gc/célula (MOI 0,2) durante 3 ó 6 días. Las células se trataron a continuación con 0,5 mg/mL de solución MTT (Sigma) a 37 °C durante 3 horas. Después de la eliminación de la solución de MTT, se añadió 100 % de DMSO y DO570 fue registrado por un lector de microplacas Wallac (Perkin Elmer, Waltham, MA). La supervivencia celular porcentual se calcula como 100 % x OD (infectado)/OD (no infectada)

**La cultura y el esferoide imagen confocal.** Esferoides se disocian y se cuentan. 3.000 células se cultivaron individualmente en suspensión durante 2 días hasta que esferoides formados. Cada esferoide estaba infectado con 1.000 pfu o 4x10<sup>7</sup> GC de KMMP9 o KGw por separado en placas de ensayo micro. imágenes eGFP se adquirieron todos los días con un microscopio de fluorescencia. Para la imagen confocal, esferoides se transfirieron a placas con fondo de cristal (Willco pozos, Amsterdam, Países Bajos) tras la infección. A las 5 dpi, esferoides fueron fijadas en paraformaldehído al 4 %, se trataron con medio de montaje con DAPI (Vector Laboratories, Burlingame, CA) y la sección de imágenes Z se obtuvieron con el sistema de imagen confocal FV1000 (Olympus, Miami, FL).

**Modelo de tumor y el tratamiento.** 3-4 semanas de edad BALB/c atímicos nu/nu ratones fueron adquiridos de Charles River Laboratory (Wilmington, MA) y alojados en una instalación de BSL2. Todos los procedimientos con animales se realizaron de acuerdo con los requisitos y recomendaciones de la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (Instituto de Animales de Laboratorio de Investigación de 1985) aprobado por la Universidad de Pittsburgh Institucional Cuidado de Animales y el empleo Comisión (IACUC).

Implantación intracraneal de 2x10<sup>5</sup> células GBM30 humanos en ratones desnudos se realizó tal como se describe [9]. En 5 o 10 dpi, 5,65x10<sup>9</sup> copias del genoma de KMMP9, KGw, o PBS (n = 3-4/grupo) se inocularon en las mismas coordenadas a la que se inyectaron células tumorales (0.5 mm anterior lateral de 2 mm (a la derecha) de 3 mm de

profundidad a bregma), como también se describe [9]. La salud animal y el bienestar fueron monitoreados y animales fueron sacrificados al mostrar signos de morbilidad.

**Resonancia magnética.** Varios ratones fueron seleccionados al azar de cada grupo de tratamiento (KMMP9, KGw, PBS). Animales Se obtuvieron imágenes de 1 día antes del tratamiento (9 días después de la implantación GBM30) y en los días 3, 6, 9 y 13 post-tratamiento. La imagen se realizó usando un imán Bruker BioSpec 94/30 (Bruker BioSpin, Karlsruhe, Alemania), una bobina de cerebro de ratón de recepción solamente 2,0 cm de diámetro y un diámetro de bobina de volumen lineal 70 mm. Los ratones anestesiados fueron inyectados con 0,1 mmol/kg de Magnevist (Bayer Health Care Pharmaceuticals, Wayne, NJ) por vía intraperitoneal y las imágenes ponderadas en T2 (tiempo de repetición = 3500 ms, tiempo de eco = 12 ms, rara del factor = 8, navgs = 4) fueron adquiridos coronal a través de la región de interés en un Bruker 400 MHz imán orificio horizontal a Paravision 4,0 (Bruker Biospin, Billerica, MA).

**Análisis Estadístico.** La prueba t no pareada con corrección de Welch se realizó utilizando GraphPad Prism versión 6.01 para Windows (GraphPad Software, La Jolla, CA; www.graphpad.com). Los datos de supervivencia de los animales se trazaron como gráficos de Kaplan-Meier y se compararon mediante Mantel-Cox log-rank test utilizando el mismo software.

## 15 Resultados

### Construcción y caracterización de los vectores controlados redirigidos con miR que expresan MMP9

Ingeniería y diseño de vectores para este estudio se esquematiza en la figura. 5A e incluir múltiples modificaciones que están destinadas a evitar la alteración de las funciones virales líticas y por lo tanto maximizar la replicación y actividad lítica en las células tumorales mientras que evita el crecimiento del virus en el cerebro normal.

20 Se insertaron un casete Gateway (GW) y la secuencia de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina entre UL3 y UL4 loci de KGE-4:T124 (descrito en el Ejemplo 1) para crear KGwG4: T124BAC (denominado aquí como KGw, control de vectores); el vector que expresa MMP9 oncolítico se obtuvo mediante la sustitución de la casete Gateway con el gen MMP9 impulsado por el CAG (CMV pollo  $\beta$  actina) promotor (KMMP9G4: T124BAC hace referencia aquí como KMMP9).

25 El análisis de transferencia Western de las células Vero infectadas con KMMP9 confirmó la correcta expresión de MMP9 (Figura 5B). zimografía de gelatina mostró una mayor actividad de la gelatinasa en tres líneas de GBM primarios, GBM 30, GBM169 y OG2, infectados con KMMP9 en comparación con las células infectadas con el vector de control (Figura 5C) y en el sobrenadante de células Vero infectadas por el KMMP9 comparación con Control- células Vero infectadas (Figura 5D).

30 Esto nos permitió determinar si la expresión de MMP9 afectada la entrada del virus a través del reconocimiento del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). Las líneas celulares ensayadas para la entrada de virus incluyen células J1.1-2 EGFR transducidas (J/EGFR) (Nakano y otros, Virol., 413: 12-18 (2011)) que son resistentes a peso HSV debido a la ausencia de los receptores de gD, células J/a que expresan HVEM humano (Uchida y otros, J. Virol. 83: 2951-2961 (2009)), y J/C células que expresan humano nectin-1 (Frampton y otros, J. Virol., 81: 10879-889 (2007));  
35 HVEM y nectin-1 son receptores naturales para la EG en peso. La entrada del virus se detectó por inmunotinción para la proteína HSV ICP4 inmediato temprano de 6 horas después de la infección. Como se Muestra en la Figura 6A, la entrada de los virus de EGFR-redirigido KMMP9 y KGw en células/EGFR J fue tan eficiente como la entrada de la parental HSV-1 vector que expresa gD: peso en J/A o de las células J/C. Ninguno de los virus redirigidos entraron detectable células J/C J/A o incluso en la entrada de virus de alto (10000 gc/célula), lo que demuestra que la expresión  
40 MMP9 no afecta a la eficiencia o la especificidad de la infección vector redirigido.

También se evaluó si la expresión de MMP9 podría afectar a la replicación del virus en las células humanas en cultivo de GBM. Los resultados (Figura 6B y 6C) mostraron que KMMP9 replicado con una cinética similar como KGw en esferoides de dos líneas de glioblastoma primario, GBM169 y GBM30, y los rendimientos de los 2 virus (medido por qPCR) no eran sustancialmente diferentes en cualquier punto de tiempo.

45 Para evaluar la actividad oncolítico de KMMP9, líneas de glioma humano HSV-permisivas se sabe que expresan EGFR, incluyendo U87MG, SNB19, y GBM30, se infectaron con una MOI de 0,005 (100 gc/célula) y la viabilidad celular se determinó por 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-diphenyltertrazolium (MTT) ensayo a 3 (Figura 7A) y 7 días después de la infección (Figura 7B). En el último punto de tiempo, KMMP9 mostraron significativamente mayor matanza de 2 las líneas celulares en comparación con la de KGw, lo que sugiere que podría aumentar MMP9 oncolisis mediada por  
50 vectores.

### MMP-9 aumenta la infectividad de HSV en el cultivo de esferoides.

Para evaluar el efecto de aumento de la expresión celular de MMP-9 en HSV propagación en esferoides de células tumorales, las células GBM30 y GBM169 se cultivaron como una sola esferoides y se infectaron con virus o KMMP9 KGw (Figura 8A). En 5dpi, KMMP9 mostraron una mayor distribución de eGFP vector-expresado en comparación con  
55 KGw. La cuantificación de células positivas eGFP en cada esferoide demostró un aumento de aproximadamente 1,5 veces a los 6 dpi en KMMP9- sobre esferoides infectados por KGw (Figura 8B; P = 0.006).

Para cuantificar aún más el efecto de MMP9 en HSV infectividad de esferoides primarios derivados del tumor, las células GBM30 se infectaron con cualquiera KMMP9 o KGw, y la eGFP expresado por el vector fue fotografiado por microscopía confocal como un medio para evaluar la penetración del virus y la infectividad. la reconstrucción 3D de la sección pilas 5µm Z reveló mejorada infectividad relativa de KMMP9 en comparación con KGw el interior de los esferoides. (Figura 8C). También se examinaron las diferencias de infectividad en 5 segmentos de cada esferoide en términos de profundidad en el eje Z (Figura 8D y 8E) (de abajo hacia arriba 0-20 µm, 25-50 µm, 55-80 µm, 85-100 µm, y 105-120 µm 125-140 µm). Si bien no se encontraron diferencias en el segmento más externa (0-20 µm) (Figura 8D y 8E), KMMP9 mostró infectividad significativamente mayor que KGw más profundamente en los esferoides (25-50 y 50-85 µm,  $P < 0,05$ ), lo que sugiere que MMP9 mejorada vector difusión a través de los esferoides. También se encontró una diferencia significativa cuando todos los segmentos se compararon entre los esferoides (prueba t pareada,  $P = 0,013$ ).

### **El vector oncolítico MMP9 es altamente eficaz en la terapia de GBM en ratones.**

Anteriormente puso de manifiesto que GBM30 estableció consistentemente un tumor letal en ratones desnudos que llevan a la muerte de los animales dentro de los 20 días de la inoculación de células post-tumor [9]. Utilizamos, células GBM30 de formación de esferas derivadas del paciente para establecer tumores intracraneales agresivas en ratones nude [9]. Se observaron diariamente los animales sacrificados y en presencia de signos de morbilidad. Similar a nuestros resultados publicados, los ratones inyectados con PBS 5 d después de la inoculación de células de tumor en las mismas coordenadas estereotácticas muerto dentro de semanas de la implantación de células tumorales (mediana 18 d; Figura 9). Por el contrario, los tratamientos de tumores utilizando ya sea el virus MMP9 expresar, KMMP9, o el virus de control KGw, la mitad protegidas de los animales durante al menos 35 días y los tiempos de supervivencia media para estos dos grupos fueron comparables (29 y 31,5 d, respectivamente;  $P = 0,61$ , prueba de log-rank). Estos resultados mostraron que 50 % de los animales tratados MMP9 sobrevivieron hasta 35 días en comparación con 18 días sin tratamiento (Figura 9).

En un experimento independiente paralelo, la eficacia antitumoral de KMMP9 y KGw se compararon con el tratamiento simulado (PBS) en el modelo ortotópico de xenoinjerto GBM30 mediante la inyección de los vectores de 10 días después de la inoculación del tumor. Los ratones se obtuvieron imágenes por resonancia magnética (MRI) de los cambios en el tamaño del tumor 1 día antes del tratamiento y de nuevo en los días 3, 6, 9 y 13 del tratamiento. Figura 10A muestra las imágenes ponderadas en T2 de un ejemplo de cada grupo. Comparación de los animales individuales de cada grupo que tenían volúmenes tumorales comparables en el momento de inicio del tratamiento, es evidente que MMP9 tuvo un efecto oncolítico más fuerte que el vector KGw (Figura 10B).

### **Referencias para el Ejemplo 2**

1. Grossman, S.A., y otros, Survival of patients with newly diagnosed glioblastoma treated with radiation and temozolomide in research studies in the United States. *Clin Cancer Res*, 2010. 16(8): p. 2443-9.
2. Assi, H., y otros, Gene therapy for brain tumors: basic developments and clinical implementation. *Neurosci Lett*, 2012. 527(2): p. 71-7.
3. Friedman, G.K., y otros, Herpes simplex virus oncolytic therapy for pediatric malignancies. *Mol Ther*, 2009. 17(7): p. 1125-35.
4. Mohyeldin, A. and E.A. Chiocca, Gene and viral therapy for glioblastoma: a review of clinical trials and future directions. *Cancer J*, 2012. 18(1): p. 82-8.
5. Campadelli-Fiume, G., y otros, Rethinking herpes simplex virus: the way to oncolytic agents. *Rev Med Virol*, 2011. 21(4): p. 213-26.
6. Broberg, E.K. and V. Hukkanen, Immune response to herpes simplex virus and gamma134.5 deleted HSV vectors. *Curr Gene Ther*, 2005. 5(5): p. 523-30.
7. Aghi, M., y otros, Oncolytic herpes virus with defective ICP6 specifically replicates in quiescent cells with homozygous genetic mutations in p16. *Oncogene*, 2008. 27(30): p. 4249-54.
8. Navaratnarajah, C.K., y otros, Targeted entry of enveloped viruses: measles and herpes simplex virus I. *Curr Opin Virol*, 2012. 2(1): p. 43-9.
9. Uchida, H., y otros, Effective treatment of an orthotopic xenograft model of human glioblastoma using an EGFR-retargeted oncolytic herpes simplex virus. *Mol Ther*, 2013. 21(3): p. 561-9.
10. Uchida, H., y otros, A double mutation in glycoprotein gB compensates for ineffective gD-dependent initiation of herpes simplex virus type 1 infection. *J Virol*, 2010. 84(23): p. 12200-9.
11. Payne, L.S. and P.H. Huang, The pathobiology of collagens in glioma. *Mol Cancer Res*, 2013. 11(10): p. 1129-40.
12. Mok, W., Y. Boucher, and R.K. Jain, Matrix metalloproteinases-1 and -8 improve the distribution and efficacy of an oncolytic virus. *Cancer Res*, 2007. 67(22): p. 10664-8.
13. Hong, C.S., y otros, Ectopic matrix metalloproteinase-9 expression in human brain tumor cells enhances oncolytic HSV vector infection. *Gene Ther*, 2010. 17(10): p. 1200-5.
14. Gierasch, W.W., y otros, Construction and characterization of bacterial artificial chromosomes containing HSV-1 strains 17 and KOS. *J Virol Methods*, 2006. 135(2): p. 197-206.
15. Krisky, D.M., y otros, Deletion of multiple immediate-early genes from herpes simplex virus reduces cytotoxicity and permits long-term gene expression in neurons. *Gene Ther*, 1998. 5(12): p. 1593-603.

16. Szymczak, A.L. and D.A. Vignali, Development of 2A peptide-based strategies in the design of multicistronic vectors. *Expert Opin Biol Ther*, 2005. 5(5): p. 627-38.
17. Miao, H., y otros, EphA2 promotes infiltrative invasion of glioma stem cells in vivo through cross-talk with Akt and regulates stem cell properties. *Oncogene*, 2014.
- 5 18. Yin, A.A., y otros, The treatment of glioblastomas: a systematic update on clinical Phase III trials. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2013. 87(3): p. 265-82.
19. Wong, J., y otros, Targeted oncolytic herpes simplex viruses for aggressive cancers. *Curr Pharm Biotechnol*, 2012. 13(9): p. 1786-94.
- 10 20. Wakimoto, H., y otros, Effects of innate immunity on herpes simplex virus and its ability to kill tumor cells. *Gene Ther*, 2003. 10(11): p. 983-90.
21. McKee, T.D., y otros, Degradation of fibrillar collagen in a human melanoma xenograft improves the efficacy of an oncolytic herpes simplex virus vector. *Cancer Res*, 2006. 66(5): p. 2509-13.
22. Yun, C.O., Overcoming the extracellular matrix barrier to improve intratumoral spread and therapeutic potential of oncolytic virotherapy. *Curr Opin Mol Ther*, 2008. 10(4): p. 356-61.
- 15 23. Dmitrieva, N., y otros, Chondroitinase ABC I-mediated enhancement of oncolytic virus spread and antitumor efficacy. *Clin Cancer Res*, 2011. 17(6): p. 1362-72.
24. Tischer, B.K., y otros, Two-step red-mediated recombination for versatile high-efficiency markerless ADN manipulation in *Escherichia coli*. *Biotechniques*, 2006. 40(2): p. 191-7.
- 20 25. Ishida, D., y otros, Enhanced cytotoxicity with a novel system combining the paclitaxel-2'-ethylcarbonate prodrug and an HSV amplicon with an attenuated replication-competent virus, HF10 as a helper virus. *Cancer Lett*, 2010. 288(1): p. 17-27.

El uso de los términos "un" "una" y "el/la" y similares referentes en el contexto de la descripción de la invención (especialmente en el contexto de las siguientes reivindicaciones) deben interpretarse para cubrir tanto el singular, como el plural, a menos que se indique lo contrario en este documento o se contradiga claramente por el contexto.

25 Los términos "que comprende", "tiene", "que incluye" y "que contiene" deben interpretarse como términos abiertos (es decir, que significa "incluyendo, pero no limitado a") a menos que de otro modo se indique. La recitación de los intervalos de valores en el presente documento es meramente destinada a servir como un método abreviado de referirse individualmente a cada valor separado que cae dentro del rango, a menos que se indique lo contrario en este documento, y cada valor separado se incorpora en la descripción como si fuera recitado individualmente en este documento.

30

Listado de secuencias

- <110> Universidad de Pittsburgh – Sistema de la Commonwealth de Educación Superior
- Uchida, Hiroaki
- 35 Cohen, Justus
- Glorioso, Joseph C. III
- Grandi, Paola
- <120> VECTOR ONCOLÍTICO HSV
- 40
- <130> 718707
- <150> US 61/896,497
- <151> 2013-10-28
- 45
- <160> 16
- <170> PatentIn versión 3,5
- <210> 1

ES 2 781 852 T3

<211> 115

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

5 <220>

<223> cebador

<400> 1

10

ctagtggcat tcaccgctg ccttatagta ccagggcatt caccgctgc cttaaggatc 60

ctggcattca ccgctgcct taatgactgc ggcattcacc gcgtgcctta gagct 115

<210> 2

<211> 154

15

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador

20

<400> 2

ctagtggggc cgcgtctcgg gaccgactc gttatcgaat agtctgacta caacttagta 60

ccagatcgaa tagtctgact acaactagga tcctatcgaa tagtctgact acaactatga 120

ctgcatcgaa tagtctgact acaactctcg agct 154

25 <210> 3

<211> 29

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

30 <220>

<223> cebador

<400> 3

ES 2 781 852 T3

tcgaggatcc tgtcagtgcg cacgcacac 29

<210> 4

<211> 32

5 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador

10

<400> 4

tcgaggatcc aaacacccga ggaaatgaaa ag 32

<210> 5

15 <211> 22

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

20 <223> cebador

<400> 5

ccccgctgga actactatga ca 22

25 <210> 6

<211> 107

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

30 <220>

<223> cebador

<400> 6

ctaaggcacg cggatgaatgc cgcagtcatt aaggcacgcg gtgaatgcca ggatccttaa 60

35 ggcacgcggg gaatgccctg gtactataag gcacgcggg aatgcca 107

ES 2 781 852 T3

<210> 7

<211> 146

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

5

<220>

<223> cebador

<400> 7

10

cgagagttgt agtcagacta ttcgatgcag tcatagttgt agtcagacta ttcgatagga 60

tcctagttgt agtcagacta ttcgatctgg tactaagttg tagtcagact attcgataac 120

gagtgcggtc ccgagacgcg gccgca 146

<210> 8

<211> 27

15

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador

20

<400> 8

tcgagctagc cagaccctc ccctcgc 27

<210> 9

25

<211> 32

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

30

<223> cebador

<400> 9

tcgagctagc gctcagcgag cagcaaggt tc 32

ES 2 781 852 T3

<210> 10  
<211> 19  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial  
5  
<220>  
<223> cebador  
  
<400> 10  
10 gcatcaggaa ccccaggtt 19  
  
<210> 11  
<211> 20  
<212> ADN  
15 <213> Secuencia Artificial  
  
<220>  
<223> sonda  
  
<400> 11  
20 ttcagcgccg tcagcgagga 20  
  
<210> 12  
<211> 70  
25 <212> ADN  
<213> Secuencia Artificial  
  
<220>  
<223> cebador  
30  
  
<400> 12  
  
tgcccgtcgc gcgtgtttga tgtaataaa taacacataa atttggctgg ccactagtcc 60  
agtgtggtgg 70  
  
35 <210> 13

ES 2 781 852 T3

<211> 73

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

5 <220>

<223> cebador

<400> 13

10 ctgaaatgcc cccccccct tgcgggcggt ccattaaaga caacaacaa atccccagca 60  
tgccctgctat tgt 73

<210> 14

<211> 22

15 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador

20

<400> 14

ccccgctgga actactatga ca 22

<210> 15

25 <211> 19

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

30 <223> cebador

<400> 15

gcatcaggaa ccccaggtt 19

35 <210> 16

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> sonda

5

<400> 16

ttcagcgccg tcagcgagga 20

**REIVINDICACIONES**

1. Un Virus del Herpes Simple recombinante (HSV), que comprende:
  - (a) una supresión de la región de repetición interna (unión) del genoma del HSV que comprende una copia de los genes ICPO, ICP34.5, LAT y ICP4 y el promotor de ICP47,
  - (b) una pluralidad de copias de una o más secuencias diana de microARN insertadas en un locus de un gen de HSV necesario para la replicación de HSV en células normales (no cancerosas), en la que dichas secuencias diana son el complemento inverso del microARN miR-124, y en la que al menos una de dichas secuencias diana está presente dentro de un locus de ICP4, y
  - (c) un transgén que codifica para una metaloproteinasa de matriz
2. El HSV de la reivindicación 1, que comprende tres o más (3, 4, 5, o 6 en tándem), preferentemente 4, copias de dichas secuencias diana de microARN insertadas en dicho locus ICP4, preferentemente en el que las múltiples copias de dichas secuencias diana de microARN están separadas por separadores de cuatro o más nucleótidos dentro del genoma del HSV.
3. El HSV de las reivindicaciones 1 o 2, en donde dicha(s) secuencia(s) diana de microARN está(n) insertada(s) en la región no traducida 3' (3' UTR) de dicho locus de ICP4.
4. El HSV de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el HSV comprende una superficie, y en el que dicha superficie comprende uno o más ligandos no HSV.
5. El HSV de la reivindicación 4, en el que el(los) ligando(s) no HSV es(son) específico(s) para una molécula presente en la superficie de una célula cancerosa.
6. El HSV de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, que además comprende una mutación de cambio de sentido de la glicoproteína B (gB) seleccionada del grupo que consiste en D285N, A549T, o ambos D285N y A549T
7. El HSV de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, que comprende además un promotor constitutivo que conduce la expresión del transgén.
8. El HSV de la reivindicación 7, en el que el promotor es un promotor de citomegalovirus (CMV).
9. El HSV de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que la metaloproteinasa de matriz es la metaloproteinasa 9 ("MMP9").
10. El HSV de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, que comprende además un transgén que codifica para una proteína o polipéptido que induce una respuesta inmune contra un cáncer.
11. El HSV de la reivindicación 10, en el que el cáncer es glioblastoma multiforme.
12. Un stock viral que comprende el vector de HSV de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11.
13. Una composición que comprende el HSV de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11 o el stock viral de la reivindicación 12 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
14. El HSV de cualquiera de las reivindicaciones 1-11, el stock viral de la reivindicación 12 o la composición de conformidad a la reivindicación 13 para su uso como un medicamento para matar una célula cancerosa preferentemente dentro de un tumor, o con mayor preferencia en el que el tumor es glioblastoma multiforme.
15. El HSV, el stock viral, o la composición de la reivindicación 14, en el que las células cancerosas están dentro de un tumor y en el que el tumor es glioblastoma multiforme.
16. El HSV, el stock viral, o la composición de la reivindicación 14 o 15, en el que el HSV está expuesto a la célula por inyección intracraneal del HSV, el stock viral o la composición a un animal o preferentemente a un ser humano.
17. El HSV, el stock viral, o la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 14-16 en el que la célula cancerosa es humana.

Figura 1

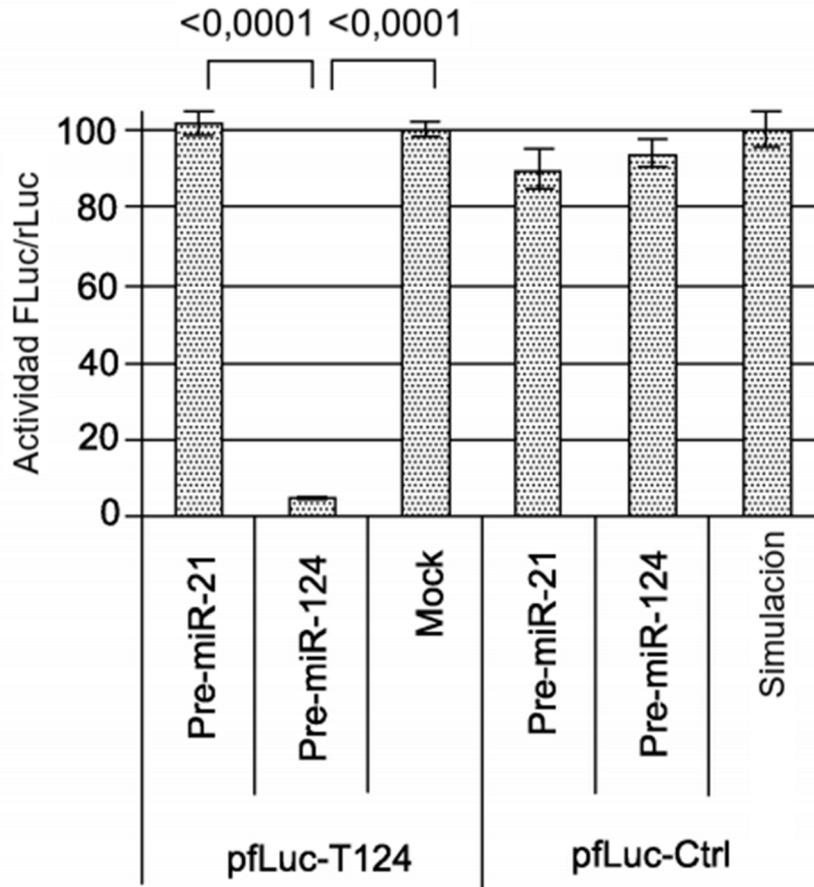


Figura 2

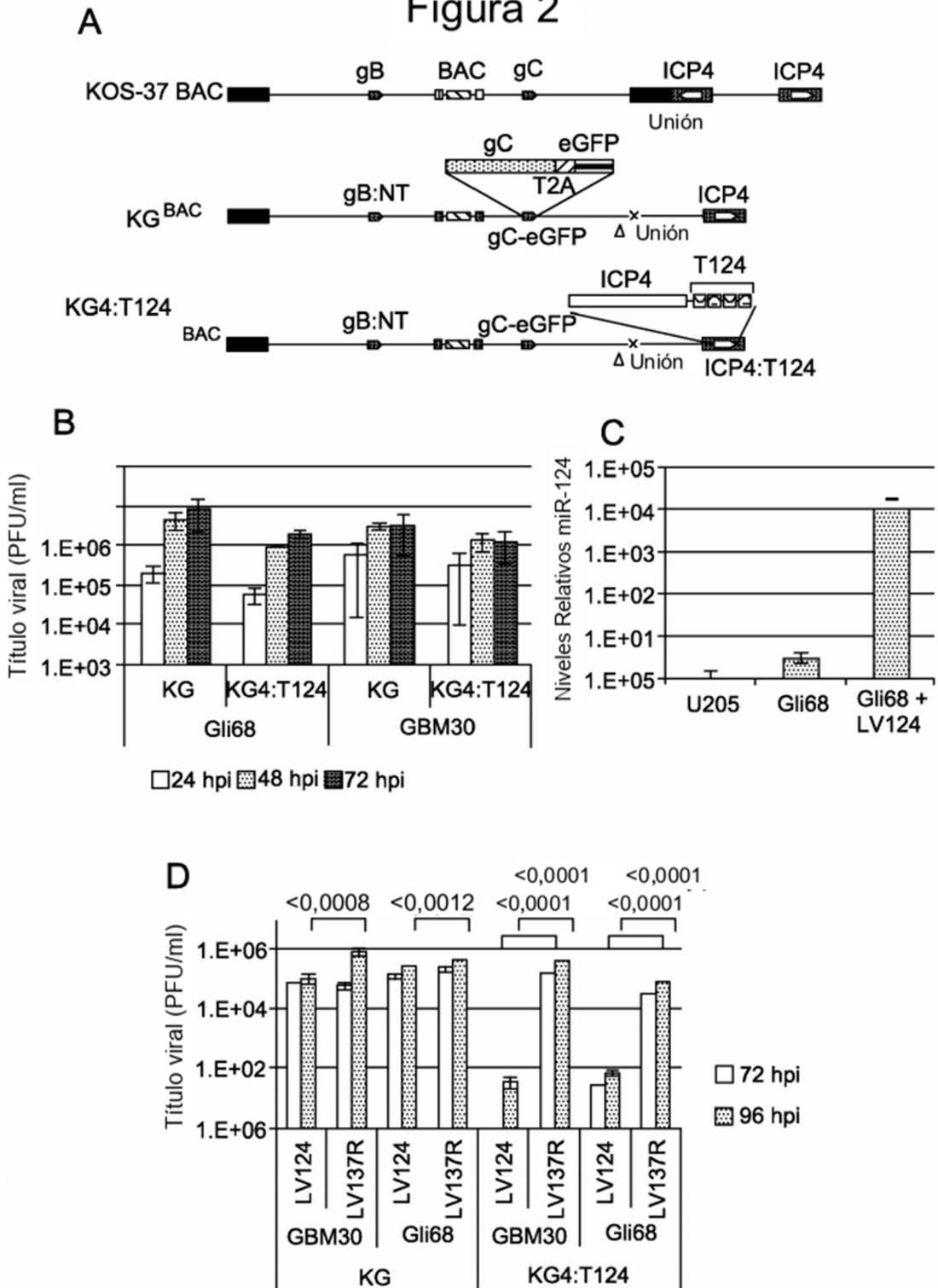


Figura 3

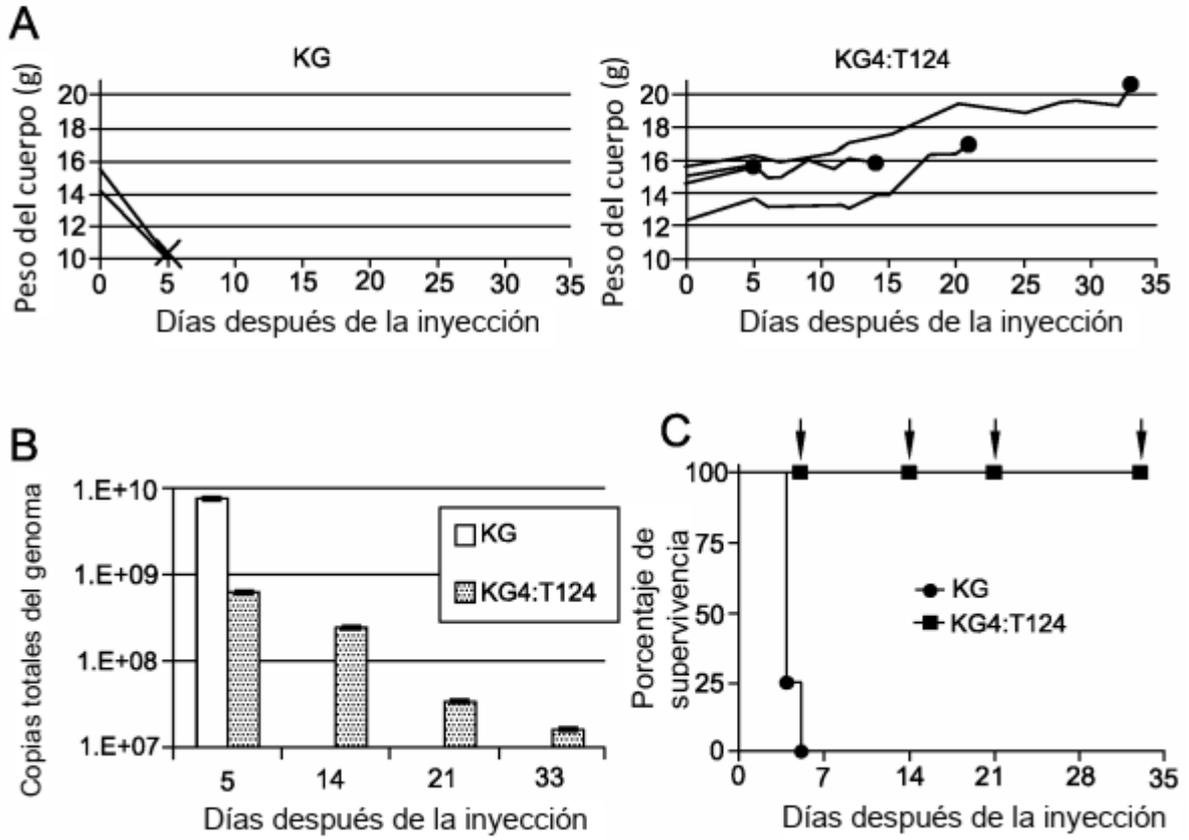


Figura 4

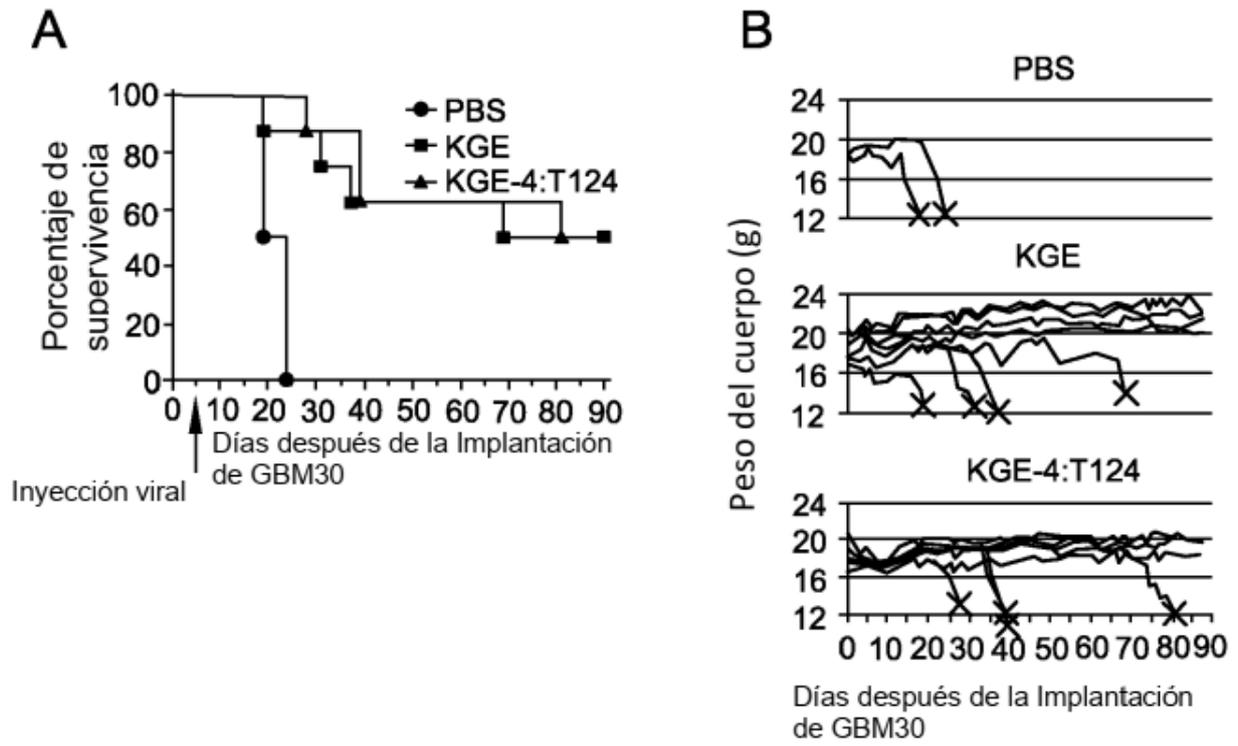


Figura 5A

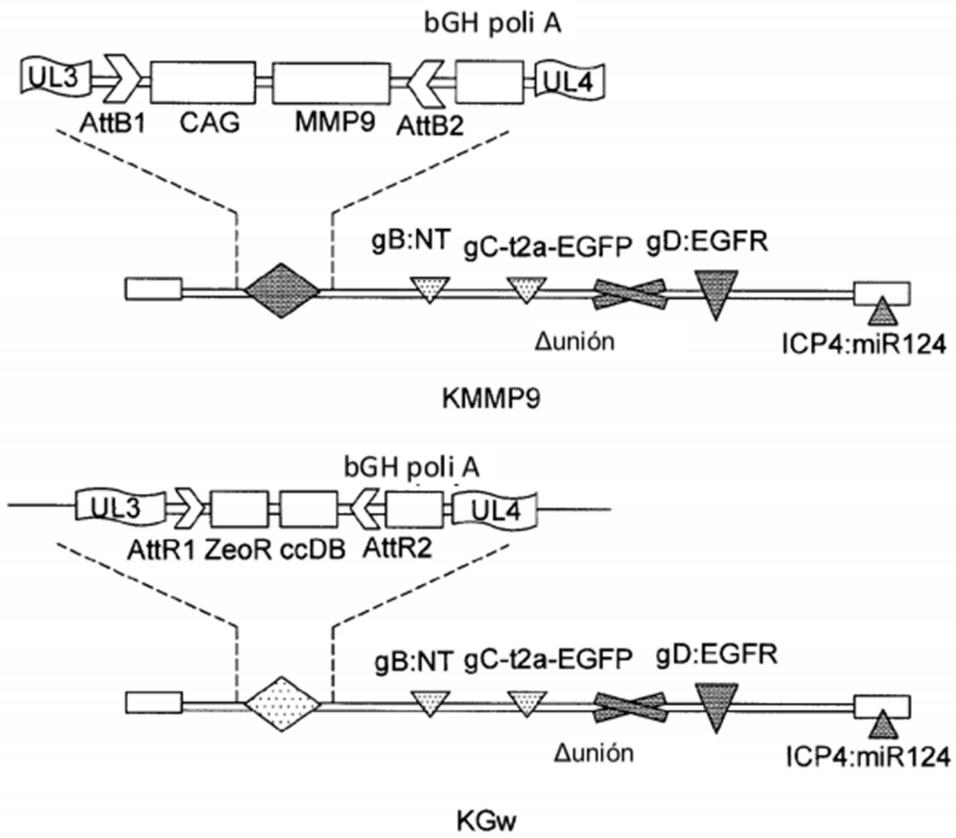


Figura 5B

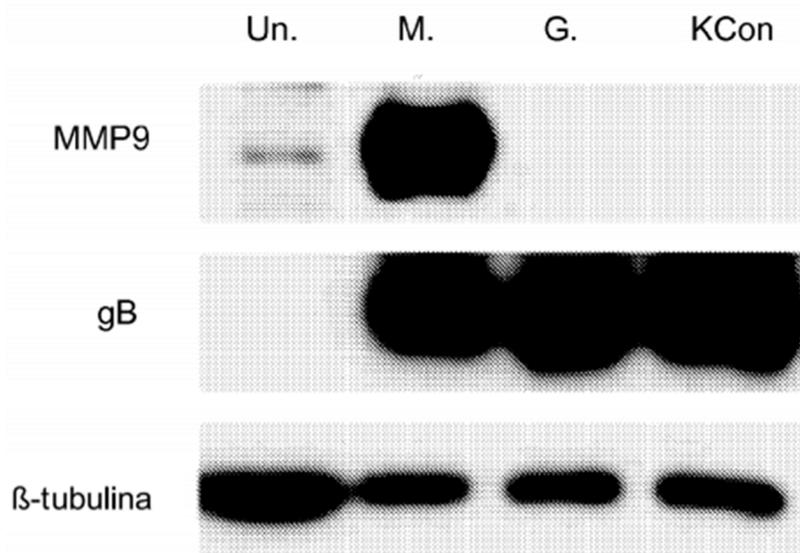


Figura 5C

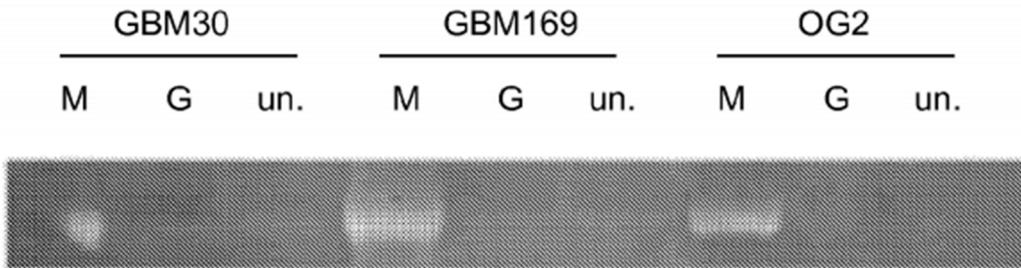


Figura 5D

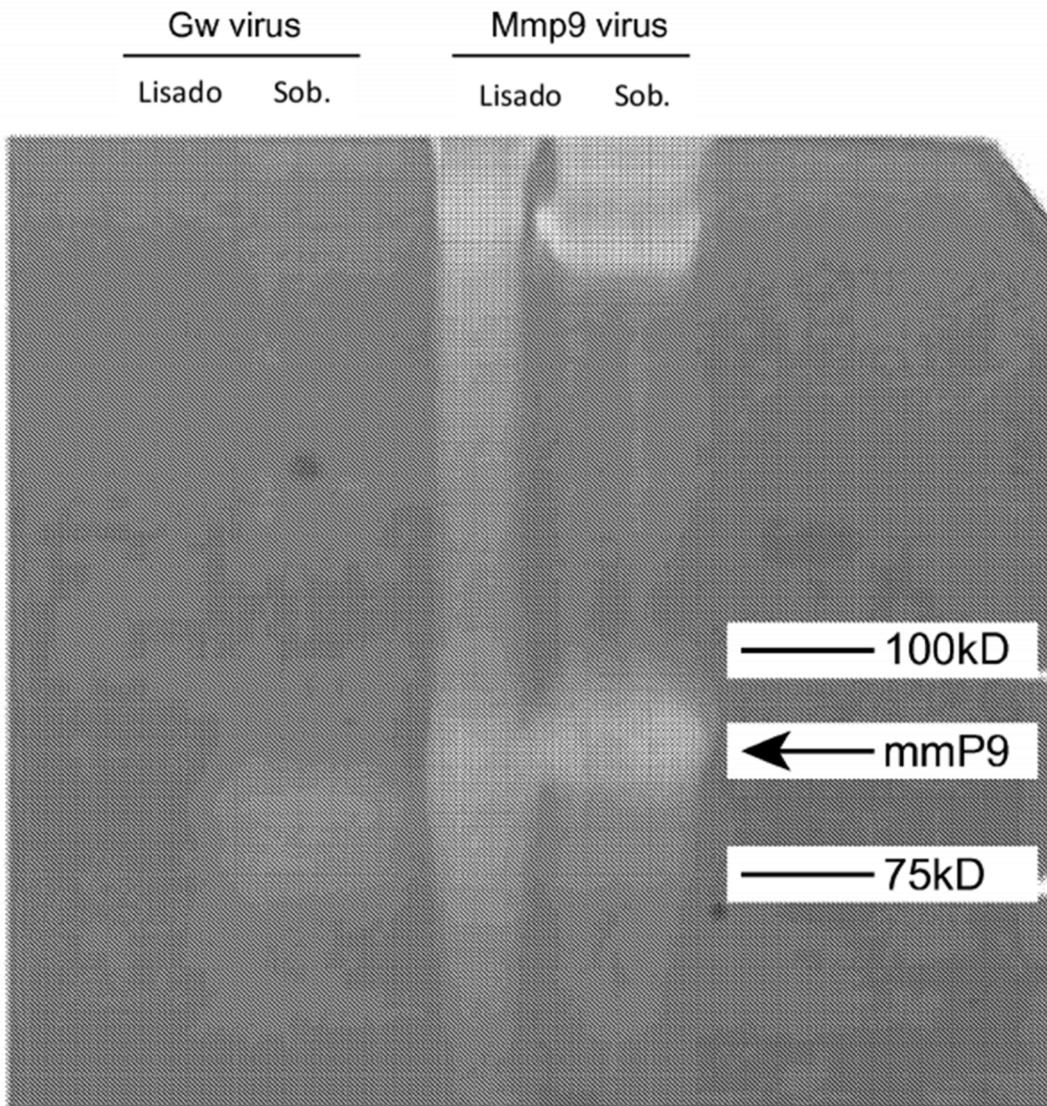


Figura 6

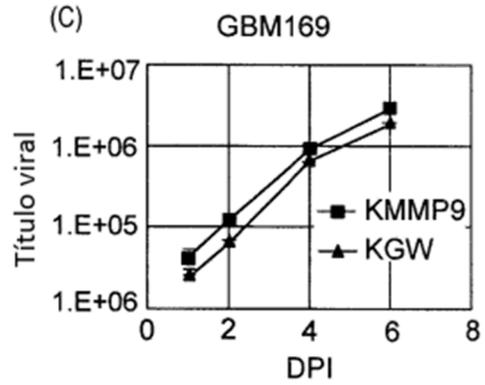
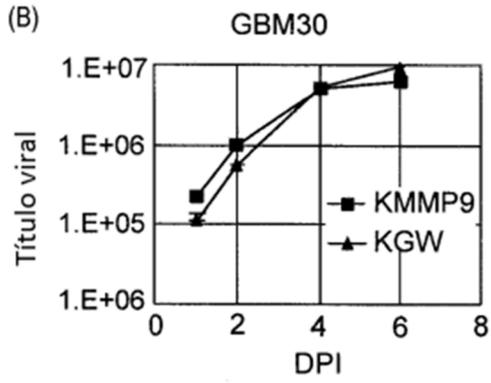
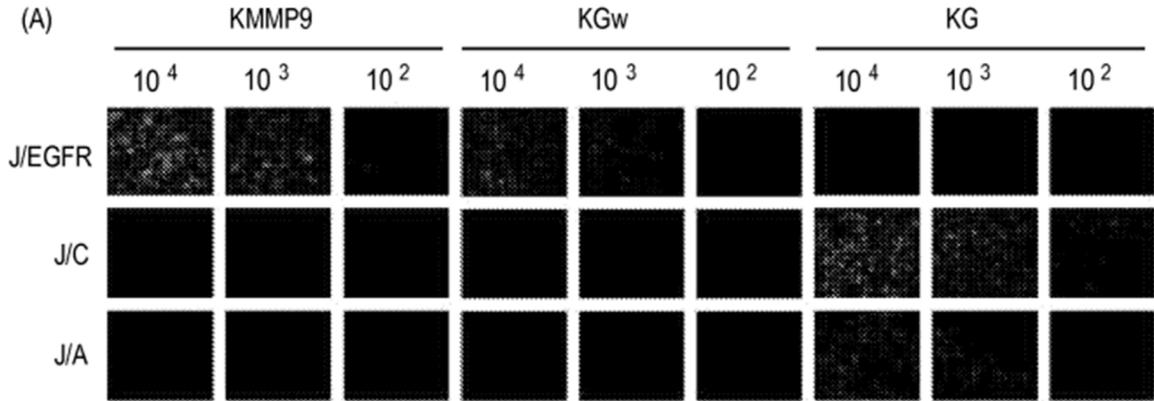


Figura 7A

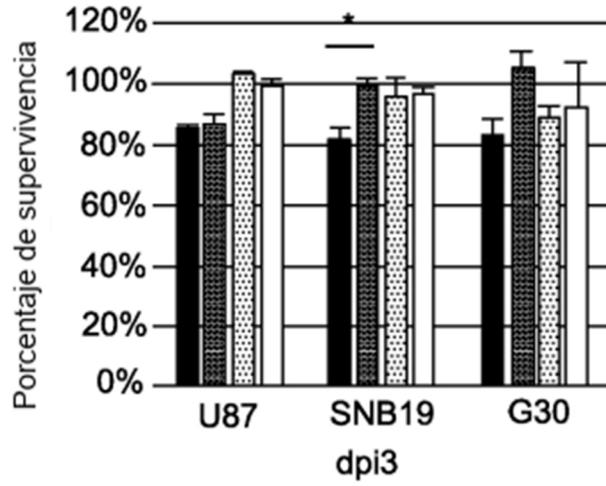


Figura 7B

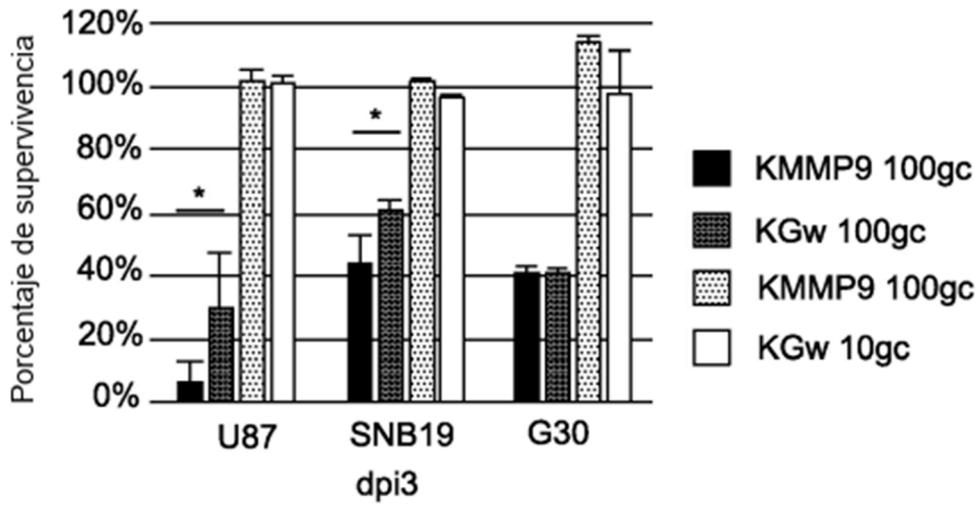


Figura 8

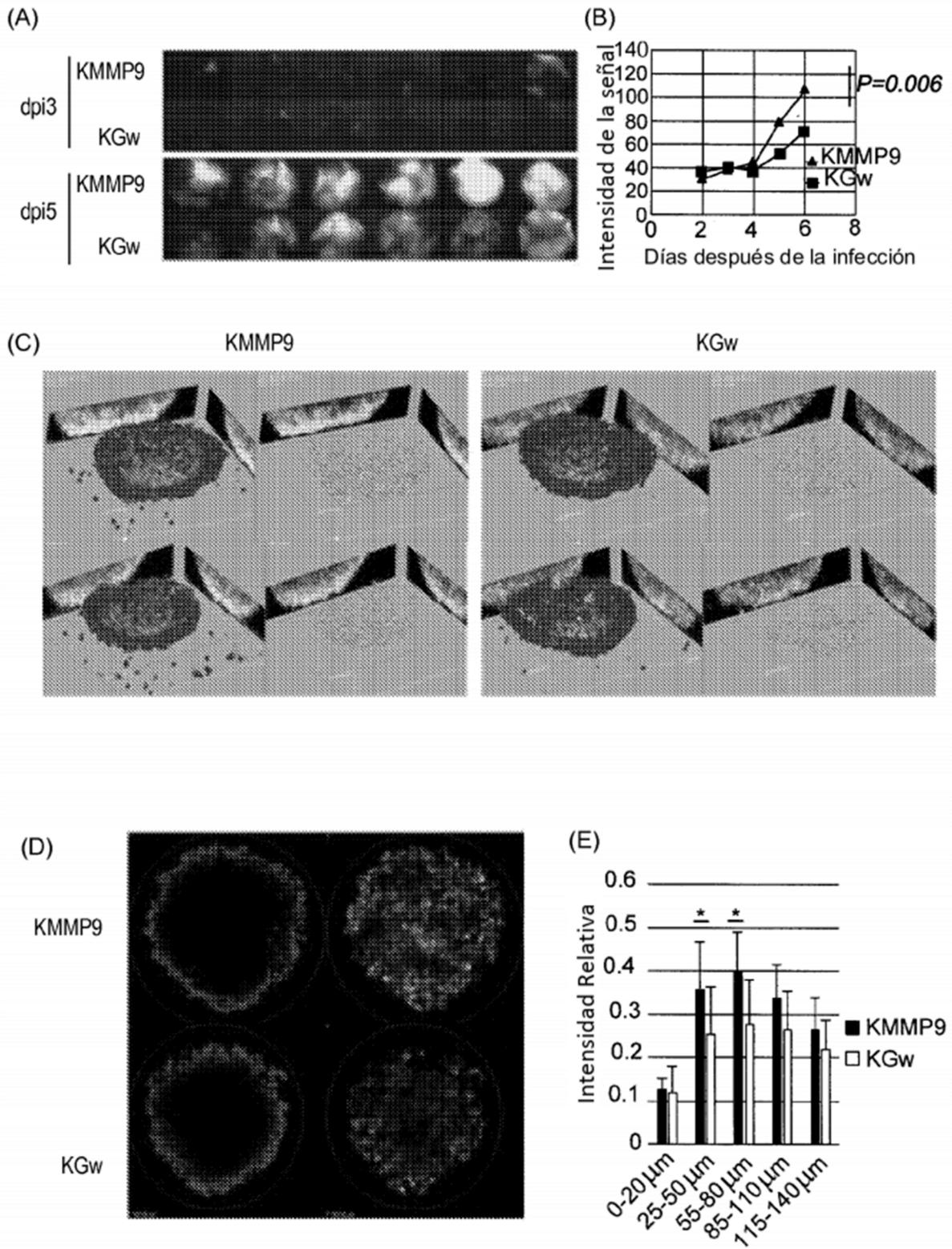


Figura 9

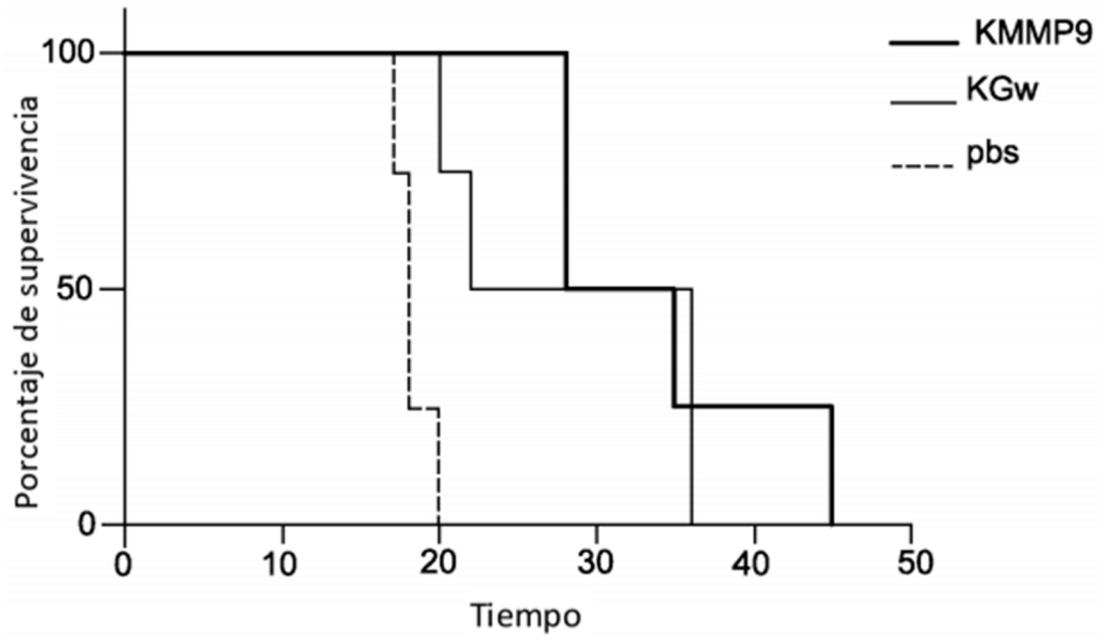


Figura 10A

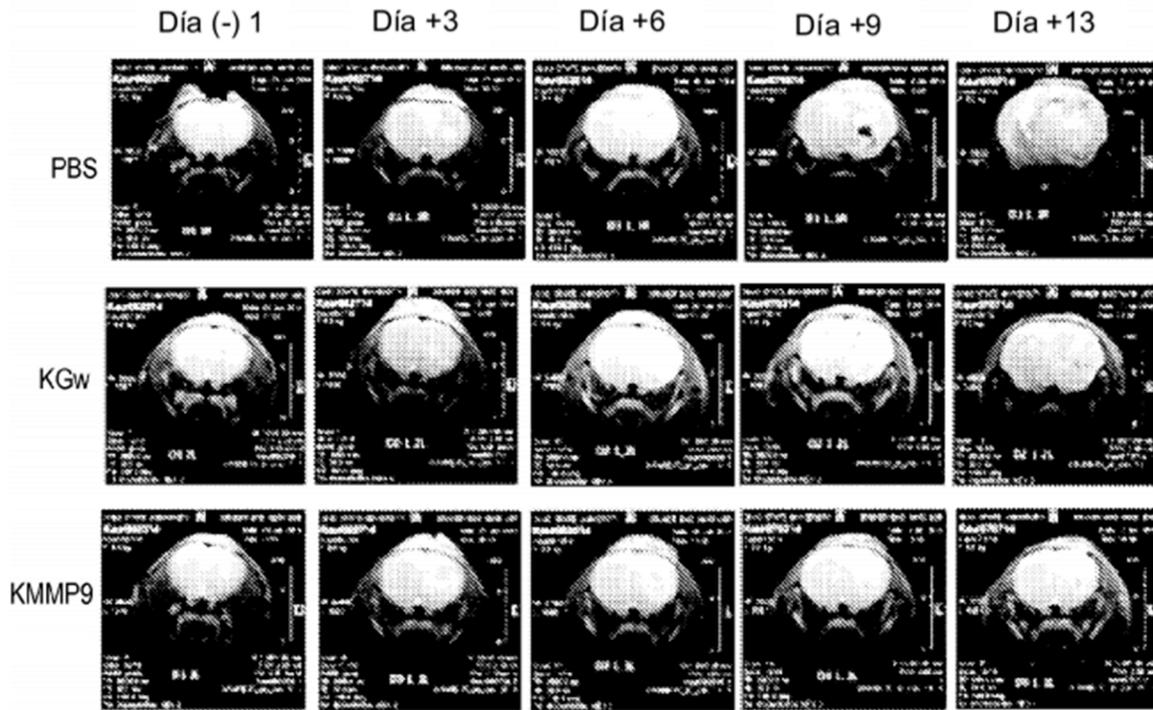


Figura 10B

Volumen inicial más similar

