



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 319 424**

51 Int. Cl.:
C12N 15/86 (2006.01)
C07K 14/145 (2006.01)
C12N 7/04 (2006.01)
A61K 39/205 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04723949 .6**
96 Fecha de presentación : **29.03.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1606411**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **21.12.2005**

54 Título: **Virus mutantes de la estomatitis vesicular y sus usos.**

30 Prioridad: **27.03.2003 US 457591 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
07.05.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
07.05.2009

73 Titular/es: **Ottawa Health Research Institute
725 Parkdale Avenue
Ottawa, Ontario K1Y 4E9, CA
Wellstat Biologics Corporation**

72 Inventor/es: **Bell, John C.;
Lichty, Brian D. y
Stojdl, David F.**

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 319 424 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

Virus mutantes de la estomatitis vesicular y sus usos.

5 **Campo de la invención**

La presente invención pertenece al campo de los virus y, en particular, a virus mutantes que son útiles como vectores virales y vacunas.

10 **Antecedentes**

15 Virus atenuados o aquellos que tienen un reducido potencial de replicación se han utilizado ampliamente para un cierto número de aplicaciones terapéuticas, por ejemplo como vacunas o vectores de vacunas, o como vectores en la terapia génica. Típicamente, la producción de virus atenuados ha implicado el aislamiento de mutaciones al azar mediante el paso repetido de virus de tipo salvaje por hospedantes no naturales. Avances en la tecnología del ADN recombinante y técnicas de ingeniería genética han proporcionado las herramientas para un mejor desarrollo de virus en calidad de agentes terapéuticos y profilácticos. Las técnicas recombinantes permiten la introducción de mutaciones específicas en una región seleccionada del genoma del virus y minimizan también la reversión del virus mutante en el de tipo salvaje.

20 La capacidad de muchos virus de estimular la inmunidad tanto humoral como la mediada por células les hace ideales vectores de vacunas y, por lo tanto, se ha desarrollado un cierto número de virus como vectores de vacunas para una amplia gama de enfermedades, incluidos VIH, VHC y cáncer. Los virus son también bien adecuados para uso como vectores en la terapia génica. La terapia génica, es decir la modificación de la expresión génica por parte de la transferencia, transitoria o permanente, de genes funcionales a células somáticas, está siendo intensamente desarrollada como un nuevo enfoque para prevenir y tratar la enfermedad.

25 A pesar de que se conoce una diversidad de métodos físicos y químicos para introducir ácidos nucleicos exógenos en células eucarióticas, los virus han demostrado, generalmente, ser mucho más eficaces para este fin. Se han explorado varios virus, tales como parvovirus, adenovirus, virus herpes, retrovirus, rhabdovirus y virus de la varicela, como posibles vectores para la terapia génica (véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. n°s 6.440.422; 6.531.123 y 6.451.323).

30 Se ha descrito la ingeniería de un cierto número de virus para producir virus recombinantes con propiedades específicas. Por ejemplo, la patente de EE.UU. n° 6.497.873 describe un rhabdovirus recombinante que expresa la proteína F de la cepa SV5 de paramixovirus. En este virus recombinante, la proteína F se expresa en forma de una proteína de fusión con una parte de la proteína G de rhabdovirus. Las patentes de EE.UU. n°s 6.022.726 y 6.468.544 describen virus atenuados por ingeniería que incluyen una mutación en una secuencia no codificadora o codificadora de un gen no estructural (NS - siglas en inglés) viral. También se describen virus atenuados quiméricos que expresan proteínas virales alteradas o quiméricas. La patente de EE.UU. n° 6.468.544 describe, además, un virus de la gripe vivo atenuado que puede inducir la producción de interferón en una célula infestada.

35 Los virus tratados por ingeniería han sido también descritos como agentes oncolíticos, los cuales explotan defectos genéticos, únicos para que se repliquen células neoplásicas y lisen células neoplásicas, pero no células no neoplásicas. Por ejemplo, las solicitudes de patente internacional WO 97/26904 y WO 96/03997 describen un virus herpes simplex mutante (HSV-1716) que inhibe el desarrollo de la célula tumoral, la patente de EE.UU. n° 6.296.845 describe un adenovirus mutado que se piensa replica, de preferencia, en células tumorales p53-negativas, la patente de EE.UU. n° 6.110.461 enseña el uso de un reovirus para el tratamiento de neoplasma mediado por Ras y la patente de EE.UU. n° 6.531.456 describe un vector de virus adeno-asociado recombinante que porta un gen de susceptibilidad a fármacos y un segundo gen capaz de producir un efecto complementario (tal como un gen supresor de interferones o tumores) para uso en el tratamiento del cáncer.

40 Como una alternativa a virus tratados mediante ingeniería genética, se pueden emplear virus no patógenos, por ejemplo el documento WO 01/19380 describe el uso de un rhabdovirus y, en particular, el virus de la estomatitis vesicular (VSV - siglas en inglés), en calidad de un agente oncolítico selectivo contra células tumorales, caracterizado por tener bajos niveles, o ninguno, de actividad de PKR (siglas en inglés de quinasa dependiente de ARN de doble cadena). El documento WO 01/19380 describe también la identificación de cuatro VSVs mutantes que eran susceptibles al interferón y su uso como agentes oncolíticos.

45 Los siguientes documentos describen el papel celular de la proteína de la matriz del virus de la estomatitis vesicular (VSV):

50 Petersen J M *et al.*, Molecular and Cellular Biology, Estados Unidos, nov. 2000, vol. 20, n° 22, páginas 8590-8601; Von Kobbe *et al.*, Molecular Cell., Estados Unidos, nov. 2000, vol. 6, n° 5, páginas 1243-1252; Jayakar Himangi R, *et al.*, Journal of Virology, Estados Unidos, ago. 2002, vol. 76, n° 16, páginas 8011-8018; Desforges Marc, *et al.*, Virus Research, vol. 76, n° 1, julio 2001, páginas 87-102; y Desforges Marc, *et al.*, Virology, Estados Unidos, vol. 295, n° 1, 30 de marzo de 2002, páginas 63-73.

Se proporciona esta información de antecedentes con el fin de poner en conocimiento información que por parte de la solicitante se piensa que es de relevancia para la presente invención. No se pretende necesariamente admisión alguna, ni debería interpretarse que cualquier información precedente constituye técnica anterior contra la presente invención.

5

Sumario de la invención

Un objeto de la presente invención es proporcionar virus mutantes y usos de los mismos.

10

De acuerdo con un aspecto de la presente invención, se proporciona un virus de la estomatitis vesicular (VSV) mutante que tiene la mutación $\Delta M51$ en la proteína de la matriz (M). En una realización preferida, dicho VSV mutante comprende una o más mutaciones seleccionadas del grupo que consiste en $\Delta M51-54$, $\Delta M51-57$, V221F, S226R, $\Delta V221-S226$, V221X, S226X, o una combinación de las mismas. En otra realización preferida, dicho VSV mutante

15

comprende una o más mutaciones seleccionadas del grupo que consiste en: $\Delta M51/V221F$; $\Delta M51-54/V221F$; $\Delta M51-57/V221F$; $\Delta M51/S226R$; $\Delta M51-54/S226R$ y $\Delta M51-57/S226R$. Todavía en otra realización preferida, dicho VSV mutante comprende una o más mutaciones seleccionadas del grupo que consiste en: $\Delta M51/V221F/S226R$; $\Delta M51-54/V221F/S226R$ y $\Delta M51-57/V221F/S226R$.

20

De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporciona un vector viral que comprende un VSV mutante según se describe antes.

Todavía en otro aspecto de la invención, se proporciona un vector de vacuna que comprende un VSV mutante según se describe antes y un ácido nucleico heterólogo que codifica uno o más antígenos.

25

De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporciona un adyuvante de vacuna que comprende un VSV mutante según se describe antes y, opcionalmente, un soporte farmacéuticamente aceptable.

En otro aspecto de la invención, se proporciona un agente oncolítico selectivo que comprende un VSV mutante según se describe antes y, opcionalmente, un soporte farmacéuticamente aceptable.

30

Todavía en otro aspecto de la invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un VSV mutante según se describe antes y un soporte farmacéuticamente aceptable.

35

De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporciona una composición inmunogénica que comprende un VSV mutante según se describe antes y un soporte farmacéuticamente aceptable.

En otro aspecto de la invención, se proporciona un uso de un VSV mutante según se describe antes en calidad de un aditivo para preparaciones de virus farmacéuticas destinadas a proteger contra revertantes virulentos que surgen en dichas preparaciones.

40

De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporciona un uso de un VSV mutante según se describe antes para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad o trastorno que puede ser aliviado por la liberación de citoquinas.

45

Todavía en otro aspecto de la invención, se proporciona un kit que comprende uno o más recipientes y un VSV mutante según se describe antes.

La solicitud describe también un rhabdovirus mutante que tiene una o más mutaciones en un gen que codifica una proteína implicada en el bloqueo del transporte nuclear de ARNm o proteína en una célula infestada, en donde dicha mutación resulta en el rhabdovirus mutante que tiene una capacidad disminuida de bloquear el transporte nuclear de ARNm o proteína, cuando se compara con el virus de tipo salvaje.

50

La solicitud describe también un vector viral que comprende un rhabdovirus mutante que tiene una o más mutaciones en un gen que codifica una proteína implicada en el bloqueo del transporte nuclear de ARNm o proteína en una célula infestada, en donde dicha mutación resulta en el rhabdovirus mutante que tiene una capacidad disminuida de bloquear el transporte nuclear de ARNm o proteína, cuando se compara con el virus de tipo salvaje.

55

También se describe un vector de vacuna que comprende un rhabdovirus mutante que tiene una o más mutaciones en un gen que codifica una proteína implicada en el bloqueo del transporte nuclear de ARNm o proteína en una célula infestada y un ácido nucleico heterólogo que codifica uno o más antígenos, en donde dicha mutación resulta en el rhabdovirus mutante que tiene una capacidad disminuida de bloquear el transporte nuclear de ARNm o proteína, cuando se compara con el virus de tipo salvaje.

60

La solicitud describe, además, un adyuvante de vacuna que comprende un rhabdovirus mutante que tiene una o más mutaciones en un gen que codifica una proteína implicada en el bloqueo del transporte nuclear de ARNm o proteína en una célula infestada y, opcionalmente, un soporte farmacéuticamente aceptable, siendo capaz dicho rhabdovirus mutante de desencadenar la producción de una o más citoquinas en una célula. en donde dicha mutación resulta en

65

ES 2 319 424 T3

el rhabdovirus mutante que tiene una capacidad disminuida de bloquear el transporte nuclear de ARNm o proteína, cuando se compara con el virus de tipo salvaje.

5 También se describe un agente oncolítico selectivo que comprende un rhabdovirus mutante que tiene una o más mutaciones en un gen que codifica una proteína implicada en el bloqueo del transporte nuclear de ARNm o proteína en una célula infestada y, opcionalmente, un soporte farmacéuticamente aceptable, en donde dicha mutación resulta en el rhabdovirus mutante que tiene una capacidad disminuida de bloquear el transporte nuclear de ARNm o proteína, cuando se compara con el virus de tipo salvaje.

10 Además, la solicitud describe una composición farmacéutica que comprende un rhabdovirus mutante que tiene una o más mutaciones en un gen que codifica una proteína implicada en el bloqueo del transporte nuclear de ARNm o proteína en una célula infestada y un soporte farmacéuticamente aceptable, en donde dicha mutación resulta en el rhabdovirus mutante que tiene una capacidad disminuida de bloquear el transporte nuclear de ARNm o proteína, cuando se compara con el virus de tipo salvaje.

15 La solicitud también describe una composición inmunogénica que comprende un rhabdovirus mutante que tiene una o más mutaciones en un gen que codifica una proteína implicada en el bloqueo del transporte nuclear de ARNm o proteína en una célula infestada y un soporte farmacéuticamente aceptable, siendo capaz dicho rhabdovirus mutante de desencadenar la producción de una o más citoquinas en una célula, en donde dicha mutación resulta en el rhabdovirus mutante que tiene una capacidad disminuida de bloquear el transporte nuclear de ARNm o proteína, cuando se compara con el virus de tipo salvaje.

20 También se describe un uso del rhabdovirus mutante según se describe antes en calidad de un aditivo para preparaciones de virus farmacéuticas destinadas a proteger contra revertantes virulentos que surgen en la preparación.

25 Además, la solicitud describe un uso del rhabdovirus mutante según se describe antes en el tratamiento de una enfermedad o trastorno que puede ser aliviado por la liberación de citoquinas.

30 La solicitud describe también un uso del rhabdovirus mutante según se describe antes en calidad de un vector viral para el suministro de dicho ácido nucleico heterólogo a un sujeto que lo necesita.

35 También se describe un kit que comprende uno o más recipientes y un rhabdovirus mutante que tiene una o más mutaciones en un gen que codifica una proteína implicada en el bloqueo del transporte nuclear de ARNm o proteína en una célula infestada, en donde dicha mutación resulta en el rhabdovirus mutante que tiene una capacidad disminuida de bloquear el transporte nuclear de ARNm o proteína, cuando se compara con el virus de tipo salvaje.

Breve descripción de las figuras

40 La figura 1 representa que la toxicidad *in vivo* disminuida de virus VSV mutantes AV1 y AV2 es mediada por interferón. (A) Células de carcinoma de próstata humanas (PC3) y células de carcinomas renales humanas (CAKI-1) se infestaron simuladamente o se infestaron con cepas de tipo salvaje (WT - siglas en inglés), AV1 o AV2 de VSV. Los medios de cultivo se analizaron mediante ELISA para detectar la producción de IFN- α humano 18 horas después de la infestación. (B) Toxicidad *in vivo* de cepas de VSV WT frente a mutantes por parte de la vía de administración y raza de ratón. IN = intranasal; IV = intravenosa; nd = no determinado. (C) AV2 puede proteger a ratones en trans frente a una infección de VSV WT letal. Ratones PKR^{-/-} fueron infestados por vía intranasal con cepas WT, AV2 o combinaciones de ambas cepas y fueron vigilados en cuanto a morbosidad o mortalidad. Los valores indican el número de ratones por grupo que muestran síntomas de infección (morbosidad) o el número de ratones por grupo que sucumbieron a la infección (mortalidad). (D) Ratones Balb/C y Balb/C IFNR^{-/-} fueron infestados por vía intranasal con VSV WT, virus AV1 o AV2 y fueron vigilados en cuanto a la morbosidad.

45 La figura 2 representa que la respuesta transcripcional secundaria es inhibida por VSV WT, pero no por AV1 o AV2. (A) La respuesta primaria a la infección viral es mediada por IRF-3, cJUN/ATF-2 y NF κ B (aquí mostrado formando parte del complejo de reforzador ("enhancesome") en el promotor IFN- β). Los datos de microdisposición indican genes de respuesta transcripcional primaria robustamente suprarregulados en células infestadas tanto con virus WT como mutantes. (a: se sabe que ISG15 requiere ISGF3 para una inducción completa). Los valores representan la inducción completa frente a los infestados simuladamente. (B) IFN- β es luego traducido y secretado para estimular, de una manera autocrina, la señalización de JAK/STAT para formar complejos de ISGF3 en el núcleo que media en la inducción de genes de la respuesta transcripcional secundaria. Mientras que células infestadas con AV1 o AV2 muestran una robusta suprarregulación de estos genes, células infestadas con WT no muestran expresión en absoluto (A = ausente), (C) Sin la consiguiente expresión de IRF-7 en células infestadas con VSV WT no puede tener lugar la onda transcripcional terciaria, que incluye casi todos los genes IFN- α (b: IFN- α 7 es marginalmente detectado por la disposición en muestras WT). En contraposición, células infestadas con AV1 y AV2 inducen eficazmente la expresión de genes IFN- α . (D) Datos de RT-PCR a las 4 horas después de la infestación de células A549 mostraban genes de respuesta primaria RANTES e IFN- β inducido a niveles similares en células infestadas con VSV WT y mutante, mientras que la suprarregulación de MX1 (respuesta secundaria) estaba afectada en células infestadas por WT. (E) El análisis de transferencia Western mostró una cinética similar de la activación de IRF-3 entre VSVs WT y mutantes, pero la expresión de proteínas por ISG56 (respuesta primaria) se vio seriamente afectada en células infestadas con WT.

ES 2 319 424 T3

La proteína IRF-7 se detecta únicamente en células infestadas con AV1 y AV2. IRF-7 Δ parece ser capaz de inducir la expresión de IRF-7 endógena.

5 La figura 3 muestra que los ARNm de IFN- β están seriamente mermados en fracciones de citoplasma procedentes de células infestadas con VSV WT, según se determina por RT-PCR cuantitativa. (A) Fracciones de ARN total nuclear (N) y citoplásmico (C) procedentes de células infestadas con VSV de WT, AV1 o AV2 se sometieron a un ensayo en cuanto a ARNm de IFN- β ; ARNm normalizado a HPRT procedente de la misma muestra. * indicaba que no se detectó ARNm de IFN- β . (B) Células infestadas con cepas de VSV WT o mutantes se sometieron a un ensayo mediante ELISA en cuanto a la producción de IFN- β . Células infestadas con AV1 y AV2 y no las células infestadas con VSV WT muestran IFN- β secretado detectable.
10

La figura 4 representa que las cepas de VSV mutantes demuestran eficacia *in vivo* en una diversidad de modelos de tumores. (A) VSV mutante es eficaz para tratar tumores de ascitis de ovarios humanos por xenoinjerto mediante tratamiento intraperitoneal. Células de carcinoma de ovarios ES-2 humanas se inyectaron en la cavidad intraperitoneal de ratones hipotímicos CD-1 para establecer tumores con ascitis. Doce días después de la inyección de 1×10^6 células ES-2, los animales fueron tratados un día sí y otro no (3 dosis en total) con VSV AV2 o VSV AV2 inactivados por UV. Cada dosis (1×10^9 ufp) se administró a la cavidad intraperitoneal. Los animales fueron evaluados en cuanto a morbilidad y mortalidad y fueron eutanizados tras la aparición de una formación moderada de ascitis. “n” significa el número de animales por grupo. (B) Tratamiento sistémico de tumores subcutáneos en un animal competente inmune. Los tumores subcutáneos se establecieron en ratones Balb/C inyectando 1×10^6 células de carcinoma de colon CT26 en la región del flanco de la extremidad. Cuando los tumores alcanzaban aproximadamente 10 mm^3 , los ratones fueron tratados un día sí y otro no cada 10 días (6 dosis en total) con una inyección intravenosa de 5×10^8 ufp del virus indicado. “Trojan” se refiere a la inyección de 3×10^5 células CT26 infestadas con VSV AV1 a una multiplicidad de infección (MOI - siglas en inglés) de 20. Ratones testigo recibieron 6 dosis de 5×10^8 equivalentes de ufp de VSV AV2 inactivados por UV. Los tumores se midieron diariamente para calcular los volúmenes de los tumores. Los animales fueron eutanizados cuando se consideró que la carga de tumores era excesiva (aproximadamente 750 mm^3). (C) muestra el cambio en los pesos de los ratones medidos diariamente, para cada grupo, durante los 3 días antes del tratamiento hasta el día 11 después del tratamiento. Las barras de errores significan EMT (error medio típico). (D) Tratamiento de tumores diseminados en pulmones en un modelo de ratón inmuno-competente. Los tumores en los pulmones se establecen inyectando 3×10^5 células CT26 en la vena de la cola de ratones Balb/C. El día 12 los ratones fueron tratados como sigue: UV AV2 IV = 1 dosis por vía intravenosa (5×10^8 equivalentes de ufp), AV2 IV = 1 dosis de VSV mutante 3 por vía intravenosa (5×10^8 ufp), AV2 IN = 1 dosis de VSV AV2 por vía intranasal (5×10^7 ufp), AV2 IV e IN = dosis de VSV AV2 por vía intravenosa (5×10^8 ufp) y 1 dosis de VSV AV2 por vía intranasal (5×10^7 ufp). Cuatro días después del tratamiento se sacrificó a todos los ratones y se retiraron sus pulmones (los corazones están visibles para su medición). Las flechas indican tumores residuales. (E) Los tumores pulmonares se establecieron como se describe antes. El día 12 los ratones fueron tratados como se indica con 5×10^7 ufp, suministradas por instilación intranasal, un día sí y otro no durante 2 semanas (6 dosis en total). La morbilidad y la mortalidad se vigilan diariamente, y se eutaniza a ratones que muestran síntomas de distrés respiratorio y se les examina en cuanto a la carga tumoral. “n” indica el número de ratones en el grupo de tratamiento.
15
20
25
30
35
40

La figura 5 representa un modelo que describe cómo cepas de VSV mutante pueden ser capaces de prevenir el brote de cepas WT virulentas procedentes de una población mixta. (A) VSV WT puede bloquear la secreción de IFN a partir de células infestadas que hacen que células vecinas queden desprotegidas y sean susceptibles a partículas virales nacientes, lo que resulta en una difusión viral. (B) Se induce una “nube de citoquinas” de IFNs y, quizás, de otras citoquinas, tras la infección con cepas de VSV que codifican proteínas M defectuosas para el bloqueo del transporte nuclear/citoplásmico. Las células vecinas son protegidas de la infección por parte de VSV mutante y cualesquiera cepas revertantes que tratan de emerger de la población.
45

La figura 6 describe ejemplos de mutaciones que se pueden producir de acuerdo con la presente invención en el gen que codifica la proteína M de VSV.
50

La figura 7 describe la secuencia de la porción relevante de la proteína M de VSV para XNDG M4 y M5 mutantes rescatados.

55 La figura 8 describe que los VSVs para XNDG M4 y M5 mutantes rescatados tienen tamaños de placas similares al VSV mutante Mut2.

Las figuras 9A, B y C describen células transfectadas con 72 aminoácidos amino-terminales de VSV condensados a GFP (WT + 72-GFP-N1, verde) y OCT-DsRed2 (marcador mitocondrial, rojo). C. Imagen fusionada que muestra la co-localización de M-GFP y OCT-DsRed2. D, E y F. Células transfectadas con WT+72-GFP-N1 y teñidas con rojo Mitotracker. La fecha indica una típica célula transfectada que exhibe mitocondrias puntuadas y tinción con Mitotracker reducida. El asterisco indica una célula transfectada con mitocondrias reticulares (normales), lo que indica una co-localización de WT+72-GFP-N1 y la tinción con Mitotracker (imagen fusionada F). G y H. Células transfectadas con WT+72-GFP-N1 y teñidas con rojo Mitotracker. Las células transfectadas tienen mitocondrias puntuadas y una tinción con Mitotracker reducida (flecha).
60
65

Las figuras 10A, B y C describen imágenes de una célula viva co-transfectada con los 72 aminoácidos amino-terminales de M de VSV condensados a GFP (WT + 72-GFP-N1, verde) y OCT-DsRed2 (marcador mitocondrial,

rojo). Las imágenes fusionadas indican la co-localización, así como la fragmentación progresiva de las mitocondrias inicialmente reticulares de esta célula, ya que la célula es exterminada por esta proteína tóxica. D. Una célula viva co-transfectada como antes. De nuevo, esto indica la co-localización de WT + 72-GFP-N1 y OCT-DsRed2 con una relativa concentración de la proteína de fusión M-GFP de VSV y protuberancias y uniones en la mitocondria (verde).

La figura 11 describe la secuencia de ácidos nucleicos para el genoma del AV1 mutante de VSV [SEQ ID N°: 1].

La figura 12 describe la secuencia de ácidos nucleicos para el gen de la proteína M del AV mutante de VSV [SEQ ID N°: 2].

La figura 13 describe la secuencia de aminoácidos para la proteína M mutante del AV1 mutante de VSV [SEQ ID N°: 3].

La figura 14 describe la secuencia de ácidos nucleicos para el genoma del AV2 mutante de VSV [SEQ ID N°: 4].

La figura 15 describe la secuencia de ácidos nucleicos para el gen de la proteína M mutante del AV2 mutante de VSV [SEQ ID N°: 5].

La figura 16 describe la secuencia de aminoácidos para la proteína M mutante del AV2 mutante de VSV [SEQ ID N°: 6].

Las figuras 17A y B demuestran gráficamente el efecto protector de un VSV mutante de acuerdo con una realización de la presente invención, en donde la figura 17A describe el porcentaje de supervivencia de ratones después de la administración de una dosis intracraneal letal de VSV; y la figura 17B describe cambios en los pesos de los ratones con el tiempo tras la dosis intracraneal letal de VSV.

La figura 18 describe gráficamente la producción relativa de $[\beta\text{-IFN}]$ en células OVCAR 4, CAKI-1 y HOP62 infestadas con VSV WT o un VSV mutante (AV1 o AV2).

Las figuras 19A y B demuestran gráficamente la actividad citotóxica de linfocitos T anti-CT26 procedente de esplenocitos obtenidos de ratones tratados con VSV WT y VSV AM51 y con tumores CT26 establecidos (figura 19A) y la lisis de células CT26 dependiente e independientes de NK, causada por los esplenocitos obtenidos de ratones no portadores de tumores, tratados con VSV WT y VSV AM51 (figura 19B).

La figura 20 describe secciones de tumores CT26, teñidas inmunohistoquímicamente, procedentes de ratones tratados con GFP de VSV $\Delta 51\text{M}$ que portan tumores CT26 subcutáneos.

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona virus mutantes que portan una o más mutaciones en un gen que codifica una proteína responsable del bloqueo del transporte nuclear de ARNm o proteínas en una célula infestada. Así, los virus mutantes tienen una capacidad disminuida de bloquear el transporte nuclear cuando se compara con el virus de tipo salvaje y se atenúan *in vivo*. Los virus mutantes pueden ser capaces de disparar los sistemas anti-virales de una célula hospedante normal, al tiempo que siguen siendo sensibles a los efectos de estos sistemas. Los virus mutantes son adecuados para una amplia gama de aplicaciones que incluyen, pero no se limitan a agentes terapéuticos para el tratamiento del cáncer e infecciones crónicas, en calidad de vacunas y adyuvantes, en calidad de vectores virales y en calidad de agentes oncolíticos y citolíticos para la lisis selectiva de células malignas o infestadas.

Definiciones

A menos que se defina de otro modo, todos los términos y expresiones técnicos y científicos utilizados en esta memoria tienen el mismo sentido que el que se entiende comúnmente por un experto ordinario en la técnica a la que pertenece esta invención. En esta memoria se utilizan de manera indistinta las anotaciones convencionales de tres letras y una letra para aminoácidos.

La expresión “secuencia de ácidos nucleicos heteróloga”, tal como se utiliza en esta memoria en relación con un virus específico, se refiere a una secuencia de ácidos nucleicos que procede de una fuente distinta del virus especificado.

El término “mutación”, tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a una delección, una inserción de ácido nucleico heterólogo, una inversión o una sustitución.

El término “gen”, tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a un segmento de ácido nucleico que codifica una proteína individual o ARN (a la que se alude también como una “secuencia codificadora” o “región codificadora”) junto con regiones reguladoras asociadas tales como promotores, operadores, terminadores y similares, que pueden estar situados más arriba o más abajo de la secuencia codificadora.

ES 2 319 424 T3

La expresión “virus mutante”, tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a un virus que comprende una o más mutaciones en su genoma, que incluyen, pero no se limitan a deleciones, inserciones de ácidos nucleicos heterólogos, inversiones, sustituciones o combinaciones de las mismas.

5 La expresión “que se produce de forma natural”, tal como se utiliza en esta memoria, con referencia a un virus, indica que el virus puede encontrarse en la naturaleza, es decir puede aislarse de una fuente en la naturaleza y no ha sido intencionadamente modificado por el hombre en el laboratorio.

10 La expresión “virus de tipo salvaje”, tal como se utiliza en esta memoria, se refiere al genotipo más frecuente de un virus encontrado en la naturaleza y contra el cual se definen mutantes.

15 La expresión “sistemas anti-virales”, tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a los componentes de una respuesta de la célula a la infección viral e incluyen, por ejemplo, interferones y otras citoquinas, óxido nítrico sintasa; quinasa dependiente de CKNA de doble cadena (PKR, oligoadenilato sintasa (OAS), Mx A y Mx B GTPasas y similares.

20 La expresión “respuesta anti-viral”, tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a una respuesta de la célula a la infección viral e incluye, por ejemplo, producción de interferones, liberación de citoquinas, producción de quimioquinas, producción de linfoquinas, o una combinación de los mismos.

La expresión “célula hospedante normal”, tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a una célula no cancerosa y no infestada con una respuesta anti-viral intacta.

25 El término “vacuna”, tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a una preparación de material capaz de estimular una respuesta inmune en un animal sin inducir enfermedad alguna.

La expresión “agente oncolítico”, tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a un agente capaz de inhibir el crecimiento de y/o de exterminar células tumorales.

30 El término “adyuvante”, tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a una sustancia que, cuando se añade a una vacuna, es capaz de reforzar la respuesta inmune estimulada por la vacuna en un sujeto.

Virus mutantes

35 La presente invención proporciona virus mutantes que comprenden una o más mutaciones en un gen que codifica una proteína que está implicada en el bloqueo del transporte nuclear de ARNm o proteína en una célula hospedante infestada. Como resultado de ello, los virus mutantes tienen una capacidad reducida de bloquear el transporte nuclear y son atenuados *in vivo*. El bloqueo de la exportación nuclear de ARNm o proteína inutiliza los sistemas anti-virales en el interior de la célula infectada, así como el mecanismo mediante el cual la célula infestada puede proteger a células que la rodean frente a una infección (es decir, sistema de aviso temprano) y, en última instancia, conduce a la citolisis. Por lo tanto, en una realización de la presente invención, los virus mutantes tienen propiedades citolíticas disminuidas en comparación con su equivalente de tipo salvaje.

45 Dado que el virus mutante es incapaz de bloquear el transporte nuclear de ARNm o proteína, la infestación de una célula hospedante normal por parte del virus mutante puede dar como resultado el disparo de los sistemas anti-virales de la célula que, normalmente, están bloqueados o son derivados por el virus de tipo salvaje. Por lo tanto, de acuerdo con otra realización de la presente invención, el virus mutante es capaz de disparar y es sensible a los sistemas anti-virales de una célula hospedante normal.

50 Se conoce una diversidad de virus que bloquean el transporte nuclear de ARNm o proteína en una célula infestada como parte de su ciclo de replicación y, así, son adecuados para la mutación con el fin de producir un virus mutante, por ejemplo virus de ADN, un virus de ARN de cadena positiva o un virus de ARN de cadena negativa. Ejemplos de virus de ADN adecuados incluyen virus herpes, adenovirus, parvovirus, papovavirus, iridovirus, hepadenavirus, poxvirus, virus de las paperas, virus de la parainfluenza humana, virus del sarampión o virus de la rubeola. Ejemplos de virus de ARN de sentido positivo, adecuados, incluyen togavirus, flavivirus, picornavirus o coronavirus. Ejemplos de virus de ARN de sentido negativo, adecuados, incluyen los de las familias Orthomyxoviridae, Rhabdoviridae y Paramyxoviridae.

60 El virus puede, por ejemplo, seleccionarse de las familias Poxviridae, Picornaviridae, Orthomyxoviridae o Rhabdoviridae, por ejemplo el virus puede ser un virus vacunal, poliovirus, rinovirus, virus de la influenza, virus de la rabia, virus de la estomatitis vesicular, virus de la enfermedad de Newcastle o vesiculovirus.

65 Los rhabdovirus son particularmente bien adecuados para uso terapéutico, ya que no son patógenos humanos comunes. Una respuesta inmune pre-existente a una cepa viral, similar a la utilizada como un agente terapéutico, puede atenuar la eficacia del virus mutante en calidad de agente terapéutico y, por lo tanto, es indeseable. Además, los rhabdovirus son virus de ARN que pasan todo su ciclo vital en el citoplasma, minimizando así el riesgo de una integración indeseada en el genoma de un paciente.

El rhabdovirus puede ser un vesiculovirus. Ejemplos de vesiculovirus incluyen, pero no se limitan a Piry, Chandipura y virus de la estomatitis vesicular (VSV).

VSV es un miembro de los Vesiculoviridae que ha demostrado el potencial terapéutico. Infecciones por VSV en seres humanos son asintomáticas o se manifiestan como una "gripe" suave. No existen casos reseñados de enfermedad grave o muerte entre seres humanos infestados por VSV. Otras características útiles de VSV incluyen el hecho de que éste se replica rápidamente y puede concentrarse fácilmente a títulos elevados. Es un virus simple que comprende solamente cinco genes y, así, es fácilmente dócil a la manipulación genética, y tiene una amplia gama de hospedantes y es capaz de infestar a la mayoría de los tipos de células humanas. En la presente invención, el virus mutante es un VSV mutante. En la técnica se conoce un cierto número de cepas diferentes de VSV y son adecuadas para uso en la presente invención. Ejemplos incluyen, pero no se limitan a las cepas Indiana y New Jersey. Un experto en la técnica apreciará que surgirán y/o se descubrirán en el futuro nuevas cepas de VSV que también serán adecuadas para uso en la presente invención. Se considera que este tipo de cepas caen también dentro del alcance de la invención.

1. Preparación de virus mutantes

De acuerdo con la presente invención, los virus mutantes pueden ser mutantes que se producen de forma natural o pueden ser mutantes obtenidos por ingeniería genética. Por lo tanto, los virus mutantes se pueden obtener por selección utilizando condiciones de desarrollo o presiones de selección definidas, o pueden ser virus recombinantes que se han obtenido específicamente por ingeniería utilizando técnicas de ingeniería genética conocidas en la técnica.

Por ejemplo, para la selección de los virus mutantes que disparan y se mantienen sensibles a sistemas anti-virales en una célula infestada, una población del virus se puede desarrollar en células que normalmente son susceptibles a la infección por parte del virus de tipo salvaje y se aíslan los virus que se desarrollan deficientemente (es decir, forman placas más pequeñas) en estas células. Estos virus aislados son virus mutantes candidato. Un ejemplo de una técnica de selección de este tipo para virus tales como VSV, que normalmente bloquean la respuesta del interferón en células infestadas, sería la selección para un desarrollo deficiente en células que responden al interferón, tales como líneas de células epiteliales, cuando se compara con virus de tipo salvaje. La formación de grandes placas cuando estos mutantes candidato se desarrollan en células que no responden al interferón (tales como células tumorales) confirmarían que el desarrollo deficiente es debido a la respuesta al interferón (véase, por ejemplo, la solicitud de patente internacional WO 01/19380).

Una vez que se ha identificado y aislado un virus mutante que se produce de forma natural, se pueden determinar la o las mutaciones en el genoma viral utilizando técnicas convencionales, por ejemplo técnicas de secuenciación, análisis de restricción, técnicas de hibridación, análisis de microdisposición, o combinaciones de estas técnicas. Un virus mutante recombinante se puede luego tratar mediante ingeniería genética utilizando técnicas convencionales (véase más abajo) para que contenga una mutación o mutaciones idénticas, o una mutación o mutaciones similares en la misma región del genoma. Virus que han sido tratados mediante ingeniería genética (es decir, virus recombinantes) para que contengan mutaciones por delección o inserción tienen típicamente una tasa de reversión menor que los mutantes que se producen de forma natural y, por lo tanto, son particularmente bien adecuados para fines terapéuticos.

Alternativamente, si ya se ha identificado un gen candidato en un virus, los virus mutantes recombinantes se pueden tratar mediante ingeniería genética utilizando técnicas bien conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, 1989, A Laboratory Manual. Nueva York: Cold Spring Harbor Laboratory Press). Un gen candidato a este respecto sería un gen del que se sospecha que codifica una proteína que está implicada en el bloqueo del transporte nuclear de ARNm o proteína en una célula infestada. En una realización de la presente invención, el virus mutante es un virus mutante recombinante.

Por ejemplo, virus de ADN (por ejemplo, vacunal, adenovirus, baculovirus) y virus de ARN de cadena positiva (por ejemplo poliovirus) se pueden tratar mediante ingeniería genética utilizando técnicas de ADN recombinante tales como las descritas en la patente de EE.UU. 4.769.330; patente de EE.UU. 4.215.051 y por Racaniello *et al.* (1981, Science 214: 916-919). Virus de ARN de cadena negativa (por ejemplo virus de la influenza y VSV) se pueden tratar mediante ingeniería genética utilizando técnicas "genéticas inversas" bien establecidas, tales como el sistema genético inverso que ha sido establecido para VSV (Roberts A. y J.K. Rose, Virology, 1998, 247: 1-6).

Así, se pueden utilizar técnicas genéticas, tales como las descritas anteriormente, para tratar mediante ingeniería genética una o más mutaciones en un gen candidato. Un experto en la técnica apreciará que el gen puede codificar una proteína estructural o no estructural, dependiendo del virus que se esté utilizando. La mutación puede ser una delección de nucleótidos, inserción, inversión o sustitución de uno o más nucleótidos, o una inserción de un ácido nucleico heterólogo, o una combinación de las mismas. Como se conoce en la técnica, a veces los virus mutantes son capaces de sufrir una inversión a tipo salvaje mediante corrección de la mutación introducida. Por lo tanto, se pueden utilizar mutaciones que son difíciles de corregir, tales como delecciones y/o mutaciones de múltiples nucleótidos para crear virus mutantes con el fin de minimizar la inversión. En una realización de la presente invención, la mutación introducida es una delección. En otra realización, la mutación introducida es una mutación que implica dos, tres o más nucleótidos. Es bien conocido en la técnica que la expresión de proteínas se puede ver afectada por mutaciones en la región codificadora de un gen o en las regiones reguladoras asociadas con la misma. Mutaciones en una región no codificadora o en una región codificadora de un gen candidato, o combinaciones de las mismas, quedan abarcadas por

la presente invención. En una realización, se introducen por ingeniería genética una o más mutaciones en la región codificadora de un gen que codifica una proteína no estructural.

Un ejemplo de un gen adecuado que codifica una proteína no estructural es un gen que codifica la proteína de la matriz, o M, de rhabdovirus. Se ha estudiado bien la proteína M de VSV y se ha demostrado que es una proteína multifuncional requerida para varias funciones virales clave: germinación (Jayakar, *et al.* 2000, *J Viral*, 74(21): 9818-27), montaje del virión (Newcomb, *et al.* 1982, *J Viral*, 41(3): 1055-62), efecto citopático (Blondel, *et al.* 1990, *J Virol*, 64(4): 1716-25) e inhibición de la expresión del gen en el hospedante (Lyles, *et al.* 1996, *Virology* 225(1): 172-80). La última propiedad ha demostrado ser en esta memoria debida a la inhibición del transporte nuclear tanto de las proteínas como de los ARNs hacia y fuera del núcleo hospedante. Ejemplos de mutaciones adecuadas que se pueden hacer en el gen que codifica la proteína M de VSV incluyen, pero no se limitan a inserciones de ácidos nucleicos heterólogos en la región codificadora, deleciones de uno o más nucleótidos en la región codificadora, o mutaciones que resultan en la sustitución o deleción de uno o más de los residuos aminoácidos en las posiciones 33, 51, 52, 53, 54, 221, 226 de la proteína M, o una combinación de las mismas.

El extremo amino de la proteína M de VSV ha demostrado dirigir la proteína a las mitocondrias, lo cual puede contribuir a la citotoxicidad de la proteína. Por lo tanto, una mutación introducida en esta región de la proteína podría dar como resultado una toxicidad incrementada o disminuida del virus. Ejemplos de mutaciones adecuadas que se pueden hacer en la región del gen de la proteína M que codifica el extremo N de la proteína incluyen, pero no se limitan a las que resultan en una o más deleciones, inserciones o sustituciones en los primeros 72 aminoácidos (N-terminales) de la proteína.

Los números de los aminoácidos a los que se ha aludido antes describen posiciones en la proteína M de la cepa Indiana de VSV. Resultará fácilmente evidente para un experto en la técnica que la secuencia de aminoácidos de proteínas M procedentes de otras cepas de VSV y Rhabdoviridae pueden ser ligeramente diferentes a la de la proteína M de Indiana de VSV debido a la presencia o ausencia de algunos aminoácidos, dando como resultado una numeración ligeramente diferente de correspondientes aminoácidos. Por parte de un experto en la técnica se pueden llevar fácilmente a cabo alineaciones de las secuencias relevantes de la proteína con la secuencia de la proteína M de Indiana de VSV, con el fin de identificar aminoácidos adecuados para la mutación que corresponden a los descritos en esta memoria, utilizando técnicas y software convencionales (tal como el programa BLASTX disponible de la página web de Centro Nacional para la Información de Biotecnología).

Los aminoácidos, así identificados, son candidatos para la mutación de acuerdo con la presente invención.

El virus mutante puede ser un VSV con una o más de las siguientes mutaciones introducidas en el gen que codifica la proteína M (la notación es: aminoácido de tipo salvaje/posición de aminoácido/aminoácido mutante; el símbolo Δ indica una deleción y X indica cualquier aminoácido): M51R, M51A, M51-54A, Δ M51, Δ M51-57, V221F, S226R, Δ V221-S226, M51X, V221X, S226X, o combinaciones de las mismas. El virus mutante puede ser un VSV con una de las siguientes combinaciones de mutaciones introducidas en el gen que codifica la proteína M: mutaciones dobles - M51R y V221F; M51A y V221F; M51-54A y V221F; Δ M51 y V221F; Δ M51-54 y V221F; Δ M51-57 y V221F; M51R y S226R; M51A y S226R; M51-54A y S226R; Δ M51 y S226R; Δ M51-54 y S226R; Δ M51-57 y S226R; mutaciones triples - M51R, V221F y S226R; M51A, V221F y S226R; M51-54A, V221F y S226R; Δ M51, V221F y S226R; Δ M51-54, V221F y S226R; Δ M51-57, V221F y S226R. En la figura 6 se representan ejemplos de proteínas M mutantes.

La presente descripción se dirige también a moléculas de ácido nucleico aisladas (ADN o ARN) que tienen una secuencia del virus mutante, o un fragmento del mismo, y secuencias complementarias al mismo. Secuencias de este tipo son útiles en la generación de virus mutantes recombinantes, o en calidad de cebadores o sondas. En una realización, se proporcionan moléculas de ácido nucleico aisladas que tienen una secuencia de un VSV mutante, fragmentos del mismo y secuencias complementarias al mismo. En otra realización, se proporcionan moléculas de ácido nucleico aisladas que tienen una secuencia de un VSV con una o más mutaciones en la proteína M, fragmentos de la misma y secuencias complementarias a la misma.

2. Ensayo de virus mutantes

De acuerdo con la presente invención, los virus mutantes se caracterizan por una capacidad disminuida de bloquear el transporte nuclear de ARNm o proteínas cuando se compara con el virus de tipo salvaje. La pérdida de esta capacidad puede dar como resultado que los virus mutantes exhiban una actividad citolítica disminuida y/o que los virus mutantes disparen los sistemas anti-virales de la célula, que normalmente están bloqueados por el virus de tipo salvaje.

2.1 Ensayo *in vitro*

Se puede hacer un rastreo *in vitro* de virus mutantes candidatos en cuanto a una disminución o la pérdida de "su" capacidad de bloquear el transporte nuclear de ARNm o proteínas. Por ejemplo, una línea de células apropiada se puede infestar con un virus mutante candidato, las células se pueden recolectar y se pueden aislar las fracciones nucleares y citoplásmicas. De cada una de estas fracciones se puede aislar ARNm y se puede analizar utilizando técnicas bien conocidas en la técnica, por ejemplo mediante RT-PCR, transferencia Northern o análisis de la microdisposición. Luego se puede comparar el contenido de las fracciones nuclear y citoplásmica con controles adecuados, tal

como el contenido en ARN de fracciones análogas para células infestadas con virus de tipo salvaje y/o para células simuladamente infestadas.

Alternativamente, se pueden utilizar análisis de hibridación *in situ* para testar virus mutantes candidatos. Análisis de este tipo se pueden establecer utilizando uno o más ARNm diana que, de manera intrínseca, tienen semividas cortas, o se puede tratar por ingeniería para que las tengan. Después se emplea una hibridación *in situ* para detectar estos ARNm diana en células previamente infestadas con un virus mutante candidato. La detección de uno o más ARNm diana en el citoplasma después de la infección indica una capacidad disminuida del virus candidato para bloquear la exportación de ARNm fuera del núcleo, cuando se compara con controles no infestados, y/o controles infestados con un virus de tipo salvaje. Este tipo de análisis se puede adaptar fácilmente para un rastreo de alto rendimiento por parte de los expertos en la técnica.

De manera similar, se pueden establecer análisis para testar mutantes candidatos, utilizando una línea de células que ha sido tratada mediante ingeniería por técnicas convencionales para que exprese una proteína fluorescente codificada por un ARNm que tiene una semivida corta. Luego, células de esta línea de células que ha sido tratada mediante ingeniería se infestan por separado con virus de tipo salvaje y un virus mutante candidato y se vigilan en cuanto a fluorescencia utilizando técnicas establecidas. En aquellas células infestadas con virus de tipo salvaje, se perderá la fluorescencia debido al bloqueo por parte del virus del transporte nuclear citoplásmico del ARNm naciente que codifica la proteína fluorescente. Por otra parte, virus mutantes que tienen una capacidad disminuida de bloquear el transporte de ARNm, tendrán una fluorescencia durante un mayor periodo de tiempo. Este tipo de análisis también se puede adaptar fácilmente para un rastreo de alto rendimiento por parte de los expertos en la técnica.

En células que están infestadas con un virus mutante, se detectará en el citoplasma más de un ARNm de referencia particular que el detectado en el citoplasma de células infestadas con el virus de tipo salvaje. De acuerdo con la presente descripción, la infestación de una célula con un virus mutante da como resultado un aumento de al menos 20 veces en la cantidad de un ARNm de referencia en el citoplasma de la célula en comparación con la cantidad en el citoplasma de una célula infestada con el virus de tipo salvaje.

En una realización, la infestación de una célula con un virus mutante da como resultado un aumento de al menos 50 veces en la cantidad de un ARNm de referencia en el citoplasma de la célula. En otras realizaciones, el aumento es de 100 veces, 250 veces, 500 veces o de al menos 1000 veces.

Tal como se ha indicado antes, los virus mutantes pueden disparar los sistemas anti-virales en una célula infestada que, normalmente, están bloqueados o derivados por el virus de tipo salvaje. Por lo tanto, también se puede hacer un rastreo de virus mutantes candidatos en cuanto a su deficiente desarrollo en células con sistemas anti-virales intactos cuando se compara con virus de tipo salvaje. Los virus mutantes deberían ser capaces de desarrollarse igual de bien que los virus de tipo salvaje en células deficientes en uno o más componentes de la respuesta anti-viral. Por ejemplo, virus mutantes que disparan el sistema de interferón se desarrollarían deficientemente en células que responden al interferón, pero se desarrollarían igual de bien que los virus de tipo salvaje en células en las que se haya inutilizado la respuesta al interferón, tales como células tumorales. La capacidad de los virus mutantes de disparar sistemas anti-virales en células también se puede determinar analizando la expresión de los genes que codifican componentes de la respuesta anti-viral en células infestadas mediante técnicas convencionales, por ejemplo mediante transferencia Western o análisis de Northern, o mediante análisis de la microdisposición, y comparando los niveles de expresión con controles apropiados.

Virus mutantes que disparan una respuesta anti-viral también pueden ser capaces de proteger a células vecinas frente a una infestación por el virus de tipo salvaje. Esta capacidad se puede testar mediante experimentos de co-infestación, utilizando los virus mutantes y de tipo salvaje con células que normalmente son susceptibles a una infestación por parte del virus de tipo salvaje y determinando el desarrollo del virus de tipo salvaje en las células co-infestadas. En la técnica se conocen métodos para realizar experimentos de co-infestación.

2.1 Ensayo *in vivo*

Una vez que se han identificado virus mutantes apropiados, se pueden utilizar modelos con animales adecuados para evaluar la eficacia y toxicidad de los virus mutantes, utilizando técnicas convencionales conocidas en la técnica.

Por ejemplo, la toxicidad se puede determinar efectuando tests de DL₅₀. El virus mutante puede tener una DL₅₀ entre aproximadamente 10 y aproximadamente 10.000 veces mayor que la del virus de tipo salvaje. Alternativamente, modelos con animales apropiados se pueden tratar con concentraciones variables del virus mutante y luego se pueden evaluar los efectos tóxicos del virus a lo largo de un periodo de tiempo apropiado, vigilando la salud general y el peso corporal de los animales. Después de la compleción del periodo de evaluación, se puede sacrificar a los animales y determinar el aspecto y el peso de los órganos relevantes. Ejemplos de modelos animales adecuados incluyen, pero no se limitan a ratones Balb/C y ratones CD-1. Otros modelos animales adecuados incluyen los que son particularmente susceptibles a la infestación por parte de un virus de tipo salvaje, tales como los que son defectuosos en un componente de la respuesta anti-viral. Un ejemplo serían ratones PKR^{-/-}, que han demostrado ser exquisitamente susceptibles a la infestación por VSV.

La capacidad de los virus mutantes de disparar una respuesta anti-viral se puede testar *in vivo* utilizando técnicas convencionales. Por ejemplo, los animales pueden ser tratados con el virus mutante y, subsiguientemente, ser enfrentados al virus de tipo salvaje o a un segundo virus. La supervivencia de estos animales se puede comparar con un grupo control que no recibió tratamiento previo alguno con el virus mutante.

Como se ha indicado antes, virus mutantes que disparan una respuesta inmune también pueden ser capaces de proteger a un sujeto frente a una co-infestación simultánea por parte del virus de tipo salvaje. Con el fin de evaluar este efecto protector del virus mutante, se puede determinar la respuesta anti-viral y el perfil de toxicidad para animales co-infestados con virus de tipo salvaje y mutante y se puede comparar con animales infestados con sólo virus tipo salvaje.

Usos

Resultará evidente para un experto en la técnica que los virus mutantes de la presente invención son útiles en una amplia gama de aplicaciones. Seguidamente se proporcionan ejemplos no limitantes.

1. Vectores virales

La presente descripción proporciona el uso de los virus mutantes de la invención como vectores virales. Cuando se utilizan como vectores virales, los virus mutantes se tratan mediante ingeniería para que incorporen al menos una secuencia de ácidos nucleicos heterólogos que codifica una molécula terapéuticamente activa. El vector viral se puede utilizar para infestar células que, después, expresan la molécula terapéuticamente activa codificada por la secuencia de ácidos nucleicos heterólogos. Así, se pueden utilizar vectores virales para suministrar el ácido nucleico heterólogo a las células de un sujeto para la expresión *in vivo* de la molécula terapéuticamente activa.

La secuencia de ácidos nucleicos heterólogos incorporada en el vector viral se puede derivar de ADN genómico, ADNc o ARN, por ejemplo, a través del uso de técnicas convencionales de clonación y/o de amplificación de ácidos nucleicos, o se puede sintetizar químicamente por métodos conocidos en la técnica. La secuencia de ácidos nucleicos se puede insertar en una región o gen no esencial en el genoma del virus o en un gen que codifica una proteína implicada en el bloqueo del transporte nuclear de ARNm o de proteínas, utilizando métodos conocidos en la técnica y descritos en esta memoria y en otras partes.

Para los fines de la presente invención, la molécula terapéuticamente activa codificada por la secuencia de ácidos nucleicos heterólogos puede ser, por ejemplo, una proteína que, cuando se expresa en una célula, suplementa o proporciona una actividad que es deficiente en la célula, permitiendo así que la célula combata un estado patológico. Proteínas de este tipo incluyen, pero no se limitan a enzimas, derivados de la sangre, hormonas, linfoquinas, factores de crecimiento, neurotransmisores, factores tróficos, apolipoproteínas y genes supresores de tumores, antígenos o epítopes antigénicos virales o específicos para tumores, moduladores inmunes, factores reguladores de interferones, citoquinas y genes suicidas. Los expertos en la técnica comprenderán que el ADN/ARN heterólogo insertado puede incluir, además, promotores, reforzadores, terminadores, señales de poliadenilación, sitios de entrada al ribosoma interno y otros elementos reguladores requeridos para una expresión eficaz de un gen codificado por el ADN o ARN. Alternativamente, la expresión del ácido nucleico heterólogo puede depender, en su totalidad o en parte, de secuencias reguladoras endógenas del vector viral.

La presente descripción también contempla secuencias de ácidos nucleicos heterólogos que codifican oligonucleótidos antisentido, ribozimas o siARNs. La expresión de estas secuencias en la célula diana permite controlar la expresión de genes celulares y/o la transcripción de ARNm celular.

Cuando se utilizan como vectores virales, los virus mutantes de la presente invención se pueden utilizar para tratar mediante ingeniería células donantes *ex vivo*, devolviéndose luego las células tratadas mediante ingeniería al donante o a otro paciente, o los virus mutantes de la invención se pueden utilizar para tratar mediante ingeniería las células de un paciente *in vivo*. Métodos de este tipo son bien conocidos en la técnica.

En una realización de la presente invención, los vectores virales se utilizan como “vectores para la terapia de genes” para suministrar a un sujeto un ácido nucleico heterólogo que codifica una proteína, que luego, cuando se expresa en las células del sujeto, suplementa o proporciona una actividad que, por lo demás, es deficiente en la célula.

En otra realización de la presente invención, los vectores virales se utilizan como vectores vacunales que portan una secuencia de ácidos nucleicos heterólogos que codifica uno o más antígenos y se utilizan para inmunizar a un individuo frente a una enfermedad y/o infección. El antígeno puede ser, por ejemplo, un antígeno de tumor, viral o bacteriano. También se contempla el uso de los vectores virales como vectores vacunales “polivalentes”, en donde el vector comprende antígenos contra diferentes organismos y, así, proporciona inmunización frente a más de una enfermedad o frente a la infestación por parte de más de un organismo.

Virus mutantes que disparan los sistemas anti-virales de una célula hospedante, tal como la producción de diversas citoquinas, son particularmente útiles como vectores vacunales. La inducción de citoquinas puede conducir a la estimulación de respuestas inmunes tanto humorales como celulares y, así, mejoran la eficacia del vector vacunal.

La cantidad eficaz del virus mutante de la invención a administrar a un sujeto cuando se usa como un vector vacunal variará dependiendo del o de los antígenos codificados, del peso, del sexo del sujeto y del modo de administración. Un experto en la técnica puede determinar la dosificación requerida para la inmunización de un sujeto específico, utilizando técnicas convencionales bien conocidas en la técnica.

5 Con el fin de evaluar la eficacia de los virus mutantes de la invención en calidad de vectores vacunales, se pueden realizar estudios de enfrentamiento. Estudios de enfrentamiento de este tipo se realizan típicamente utilizando animales de laboratorio, e implican la inoculación de grupos de animales con un virus mutante mediante diversas técnicas, p. ej. por vía intranasal, intramuscular. En paralelo deberían establecerse grupos control con los cuales se
10 puedan comparar los efectos del virus mutante. Grupos control pueden incluir animales no inoculados y animales inoculados, por ejemplo con vacunas alternativas comercialmente disponibles. Después de un apropiado periodo de tiempo post-inoculación, los animales son enfrentados al agente patógeno (es decir, el microorganismo, virus o células tumorales).

15 Luego se analizan muestras de sangre tomadas de los animales antes y después de la inoculación, así como después del enfrentamiento en cuanto a la respuesta del anticuerpo al agente patógeno. Ensayos adecuados para la respuesta del anticuerpo incluyen, pero no se limitan a análisis de la transferencia Western y análisis con enzima unida a inmunosorbente (ELISA). Alternativamente, cuando los animales han sido enfrentados a células tumorales, el desarrollo de las células tumorales se vigila, por ejemplo, vigilando el aumento en el tamaño o peso del tumor.

20 La respuesta inmune celular también se puede evaluar mediante técnicas tales como blastogénesis de linfocitos para vigilar la inducción de la inmunidad celular (linfocitos T) y la liberación del interferón, para vigilar la inducción de citoquinas.

25 2. Agentes oncolíticos

Tal como se conoce en la técnica, determinados virus son capaces de actuar como agentes oncolíticos selectivos. Ejemplos incluyen VSV, virus de la enfermedad de Newcastle, parvovirus H-1 y determinados virus tratados mediante
30 ingeniería genética tal como el adenovirus humano ONYX-015 (véase, por ejemplo, las solicitudes de patente internacional WO 01/19380 y WO 00/62735 y Bell, JC, Lichty BD y Stojdl D. 2003 Cancer Cell 4:7-11). La eficacia de la supresión del desarrollo de las células tumorales por parte del virus oncolítico reside, en parte, en la susceptibilidad diferencial de células tumorales, en comparación con células normales, a la infestación viral. Las células cancerosas adquieren una ventaja de supervivencia frente a sus equivalentes normales al adquirir mutaciones en las
35 vías inhibitorias del desarrollo o apoptóticas. Un defecto, frecuentemente seleccionado durante la evolución del tumor, es una pérdida de la respuesta al interferón (IFN). El interferón es también un mediador clave en la respuesta anti-viral de células individuales y, así, células tumorales que adquieren mutaciones que las permiten escapar de los programas de control del desarrollo mediados por interferones, comprometerán simultáneamente su respuesta anti-viral innata.

40 En células de este tipo, en las que está comprometida la respuesta anti-viral innata, la incapacidad de los virus mutantes de bloquear la exportación nuclear de ARNm o proteínas no afectará a la capacidad del virus mutante de replicarse en la célula. Los virus mutantes de la presente invención, que son capaces de disparar sistemas anti-virales en una célula infestada al tiempo que siguen siendo sensibles a esos sistemas anti-virales, serán, así, capaces de replicarse selectivamente y de inhibir el desarrollo de células tumorales, o de exterminarlas, pero serán incapaces de replicarse
45 en células normales. Por consiguiente, la presente invención proporciona el uso de los virus mutantes en calidad de agentes oncolíticos mejorados.

Se apreciará que proteínas virales implicadas en el bloqueo del transporte nuclear de ARNm o proteínas también
50 pueden tener otros efectos sobre una célula infestada. Por ejemplo, la proteína M de VSV ha demostrado ser importante para dirigir la proteína a la mitocondria de una célula infestada, conduciendo a efectos citotóxicos. La proteína M también ha demostrado interactuar con la proteína hospedante TSG101 para fomentar la germinación eficaz de viriones de la progeñie a partir de la célula infestada.

55 Por lo tanto, la presente invención proporciona VSV mutante recombinante con una o más mutaciones en la proteína M que no sólo disminuyen la capacidad del virus mutante de bloquear el transporte nuclear, sino que también altera la interacción de la proteína M con las mitocondrias de la célula hospedante. El extremo N de la proteína M de VSV ha demostrado ser importante para dirigir esta proteína a las mitocondrias de una célula infestada. Mutaciones en esta región de la proteína que refuerzan o anulan esta localización modularán, así, las propiedades citotóxicas del vector viral. Dependiendo de la mutación introducida, se puede aumentar o disminuir la citotoxicidad del virus mutante. Aquellos virus mutantes, tratados mediante ingeniería para que tengan una o más mutaciones en la proteína M que resulte en una citotoxicidad incrementada, serán agentes oncolíticos particularmente eficaces.

65 La presente invención contempla, además, el uso de VSV recombinante con una o más mutaciones en la proteína M que alteran la interacción del virus con la proteína hospedante TSG101. TSG101 es una proteína supresora de tumores, cuya expresión y función están a menudo alteradas en células malignas. La introducción de mutaciones en la proteína M que interfieran con esta interacción puede resultar en virus recombinantes que se replican más eficazmente en células tumorales, conduciendo a agentes oncolíticos más eficaces.

La actividad oncolítica de los virus mutantes de la invención se puede determinar utilizando modelos de tumores por xenoinjerto convencionales, en los cuales se ha implantado un tumor humano en un animal inmunemente comprometido. Ejemplos de modelos por xenoinjerto de cáncer humano incluyen, pero no se limitan a xenoinjertos de tumores sólidos humanos en ratones, implantados mediante inyección subcutánea y utilizados en ensayos del desarrollo de tumores; isoinjertos de tumores sólidos humanos en ratones, implantados mediante inyección en la almohadilla infrarrotuliana y utilizados en ensayos de desarrollo de tumores; modelos experimentales de linfoma y leucemia en ratones, utilizados en ensayos de supervivencia, y modelos experimentales de metástasis a los pulmones en ratones.

La actividad oncolítica de los virus mutantes se puede determinar comparando el desarrollo del tumor en animales de xenoinjerto tratados con virus mutantes y controles no tratados. También se pueden utilizar animales control que han sido infestados con el virus oncolítico de tipo salvaje. Los virus mutantes se pueden administrar directamente al tumor o de modo sistémico, o se pueden utilizar para infestar células *ex vivo* con las células que son subsiguientemente administradas al animal. También se pueden utilizar sistemas de modelos de ratones singéneos en los cuales los tumores se establecen sub-cutáneamente o mediante inyección intravenosa (para formar tumores pulmonares) para testar la actividad oncolítica de los virus mutantes.

3. *Adyuvantes vacunales*

Virus mutantes de la invención que son capaces de disparar los sistemas anti-virales en una célula hospedante son candidatos ideales para adyuvantes vacunales. Como es conocido en la técnica, muchos antígenos no son fuertemente inmunógenos y, cuando se utilizan como vacunas, requieren la adición de un adyuvante para estimular una fuerte respuesta inmune en el sujeto. La presente invención contempla el uso de los virus mutantes en calidad de adyuvantes vacunales para reforzar la inmunogenicidad de la vacuna disparando la respuesta anti-viral del hospedante. En una realización de la presente invención, el virus mutante actúa como un adyuvante vacunal, al estimular la producción de interferones y otras citoquinas.

4. *Agentes protectores en preparaciones farmacéuticas*

Como se ha indicado antes, virus mutantes de la presente invención que disparan los sistemas anti-virales de las células a las que infestan pueden limitar la replicación del virus de tipo salvaje y de otros virus que intentan infestar células vecinas. Por lo tanto, la infestación de las células con estos virus mutantes no es sólo auto-limitante, sino que también protege frente a la aparición de revertantes. Así, los virus mutantes pueden utilizarse como aditivos para preparaciones farmacéuticas de virus que protegen frente a revertantes virulentos que surgen en las preparaciones, ya sea durante la producción o después de la administración a un sujeto.

5. *Otras aplicaciones terapéuticas*

Como se ha indicado antes, el disparo de los sistemas anti-virales de la célula hospedante por parte de un virus mutante de la invención da como resultado la producción de diversas citoquinas. Por lo tanto, estos virus mutantes se pueden utilizar para el tratamiento de enfermedades o trastornos que pueden ser aliviados mediante la liberación de citoquinas, por ejemplo cáncer, enfermedades autoinmunes e infecciones bacterianas, virales y fúngicas.

6. *Otras aplicaciones citolíticas*

Como es conocido en la técnica, muchos virus, tales como VIH y VHC, regulan de forma reductora los sistemas anti-virales de la célula infestada. Otros virus, tales como el virus de la viruela, BVDV, Bunyaviridae, Rotavirus, virus de la influenza y PVH (papilomavirus humano) bloquean la respuesta anti-viral de una célula hospedante como parte de su ciclo replicativo. Como resultado de ello, células infestadas con uno de estos virus pueden tener una susceptibilidad incrementada a la infección por parte de los virus mutantes de la invención. Como se ha indicado antes, en células con respuestas anti-virales comprometidas, los virus mutantes seguirán siendo capaces de replicarse. Por consiguiente, los virus mutantes de la presente invención se pueden utilizar como agentes citolíticos que se pueden replicar selectivamente en y exterminar células infestadas de este tipo.

Composiciones farmacéuticas

La presente invención proporciona, además, composiciones farmacéuticas que comprenden los virus de la invención y un soporte farmacéuticamente aceptable.

Las composiciones farmacéuticas pueden estar en forma de suspensiones acuosas que contienen el virus mutante en mezcla con excipientes adecuados que incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, agentes de suspensión, tales como carboximetilcelulosa de sodio, metil-celulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, alginato sódico, polivinilpirrolidona, goma tragacanto y goma de acacia; agentes dispersantes o humectantes, tales como fosfátidos que se producen

ES 2 319 424 T3

de forma natural, por ejemplo lecitina. Las suspensiones acuosas también pueden contener uno o más conservantes, por ejemplo p-hidroxibenzoato de etilo o n-propilo. Las composiciones farmacéuticas pueden estar en forma de una suspensión inyectable estéril. Esta suspensión se puede formular de acuerdo con la técnica conocida, utilizando agentes dispersantes o humectantes adecuados y agentes de suspensión tales como los antes mencionados.

5 La preparación inyectable estéril también puede ser una solución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o disolvente no tóxico, parenteralmente aceptable. Vehículos y disolventes aceptables que se pueden emplear incluyen, pero no se limitan a agua, solución de Ringer, solución de Ringer lactada y solución de cloruro de sodio isotónica.

10 Otras composiciones farmacéuticas y métodos para preparar composiciones farmacéuticas son conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en "Remington: The Science and Practice of Pharmacy" (antes "Remingtons Pharmaceutical Sciences"); Gennaro, A., Lippincott, Williams & Wilkins, Filadelfia, PA (2000).

15 *Kits*

La presente invención proporciona kits que contienen un virus mutante de la invención para uso en la inmunización, y kits que contienen un virus mutante de la invención que porta uno o más genes heterólogos para uso como un vector para el suministro de uno o más genes heterólogos a un sujeto. Los virus mutantes pueden proporcionarse en los kits en forma de composiciones farmacéuticas. Componentes individuales de los kits estarían empaquetados en recipientes separados o comunes y, asociada con recipientes de este tipo, puede haber una nota en la forma prescrita por una agencia gubernamental que regule la fabricación, uso o venta de productos farmacéuticos o biológicos, nota que puede reflejar la aprobación por parte de la agencia de fabricación, uso o venta para la administración animal o humana.

25 Los componentes del kit también se pueden proporcionar en forma seca o liofilizada, y el kit puede contener adicionalmente un disolvente adecuado para la reconstitución de los componentes liofilizados. Independientemente del número o tipo de recipientes, los kits de la invención también pueden comprender un instrumento para asistir a la administración de la composición a un sujeto. Un instrumento de este tipo puede ser un inhalante, jeringa, pipeta, cuentagotas o vehículo de suministro médicamente aprobado similar.

Ejemplos

35 Ejemplo 1

Cepas YSV oncolíticas con defectos en la desconexión de señalización de IFN- β

40 *Materiales y Métodos*

Virus

A lo largo de este estudio se utilizó el serotipo Indiana de VSV y se propagó en células L929.T1026R (Desforges, *et al.* 2001, *Virus Research* 76(1):87-102) y TP3 (Desforges, *et al.* 2001, *ibid*), a los que se alude en esta memoria como AV1 (o Mut2) y AV2 (o Mut3), respectivamente, demostraron en este estudio y en otras partes ser mutantes inductores de IFN de la cepa HR de Indiana de VSV de tipo salvaje (Francoeur, *et al.* 1987, *Virology* 160(1): 236-45).

Producción de IFN por ELISA

50 Los niveles de interferón α se midieron en medios de cultivos de células utilizando el kit ELISA de interferón-alfa humano (PBL Biomedical) según las directrices del fabricante. En síntesis, se recogieron 100 μ l de medio de cultivo a las 48 horas después de la infestación y se incubaron en una placa de microtitulación de 96 pocillos junto con componentes en blanco y patrones suministrados por el fabricante. Las muestras se procesaron según las instrucciones del fabricante y luego se leyeron en un lector de placas DYNEXTM a 4,50 nm.

Determinación de la toxicidad in vivo de virus mutantes VSV

60 Ratones hembras de ocho (8) a 10 semanas de edad (razas como las indicadas) se dividieron en grupos de 5 y se infestaron con diluciones 1 log ó ½ log de virus a partir de 1×10^{10} ufp a 1×10^2 ufp (dependiendo del virus y de la raza de ratón) por la vía indicada. Se vigiló a los animales en cuanto a la pérdida de peso, deshidratación, erección pilosa, comportamiento de acurrucamiento, distrés respiratorio y parálisis del miembro trasero. Ratones que mostraban una morbilidad de moderada a grave fueron eutanizados conforme a las buenas prácticas de laboratorio prescritas por la CCAS. Los valores de dosis letal 50 se calcularon por el método de Karber-Spearman.

65 Ratones Balb/C o ratones Balb/C inactivados en el receptor de interferón alfa de cuatro semanas de edad (IFNAR^{-/-}) (Steinhoff *et al.*, 1995, *J. Virol.*, 69:2153-2158) fueron infestados por vía intranasal con 10^4 ufp de: VSV WT, AV1

ES 2 319 424 T3

o AV2. Se vigiló a los ratones en cuanto a síntomas de morbilidad y se eutanizaron tras mostrar síntomas de grave distrés respiratorio.

5 *Determinación de la toxicidad in vivo de muestras mixtas de cepas de VSV de tipo salvaje y mutante*

Se determinó previamente que ratones Balb/C PKR^{-/-} eran muy sensibles a una infestación por vía nasal con VSV WT con una DL100 de aproximadamente 10 ufp (Stojdl *et al.*, 2000, J. Virol., 79:9580-9585). Grupos de 3 ratones fueron infestados mediante instilación intranasal con: WT, AV2 o mezclas de estas cepas. Se vigiló a los ratones en cuanto a síntomas de morbilidad y se les eutanizó tras mostrar síntomas de distrés respiratorio grave o parálisis del miembro trasero.

15 *Cáncer por xenoinjerto de ovarios en ratones atímicos*

Aproximadamente 1x10⁶ células de carcinoma de ovarios humano ES-2 se inyectaron en la cavidad peritoneal de ratones CD-1 atímicos. El desarrollo de ascitis se observa generalmente el día 15 después de la inyección de las células. Los días 12, 14 y 16 los ratones fueron tratados, mediante inyección intraperitoneal, de 1x10⁹ virus AV2 ó 1x10⁹ ufp equivalentes de VSV AV2 inactivado por UV. Los ratones fueron vigilados en cuanto a la morbilidad y se eutanizaron tras el desarrollo de ascitis.

Modelo de tumor subcutáneo

Para establecer tumores subcutáneos, se rasuró a ratones hembras Balb/C, de 8-10 semanas de edad, en el flanco derecho y se les inyectaron 1x10⁶ células de carcinoma de colon CT26 (Kashtan, *et al.*, 1992, Surg Oncol 1(3):251-6) singeneicas para ratones Balb/C. Se dejó que estos tumores se desarrollaran hasta que alcanzaron aproximadamente 10 mm³, momento en el cual se iniciaron los tratamientos con virus. Un día sí y otro no los grupos de animales recibieron 1, 6 ó 12 dosis de los virus indicados. Cada una de las dosis de 5x10⁸ ufp fue administrada mediante inyección en la vena de la cola. Los tumores se midieron diariamente y los volúmenes se calcularon utilizando la fórmula ½ (LxWxH). Se pesó a los ratones diariamente y se vigiló su pérdida de peso, deshidratación, erección pilosa, comportamiento de acurrucamiento, distrés respiratorio y parálisis del miembro trasero. Se eutanizó a los animales cuando su carga de tumores alcanzó el punto final (750 mm³).

35 *Modelo de pulmones*

Se establecieron tumores en los pulmones en ratones Balb/C hembras de 8-10 semanas de edad mediante inyección en la vena de la cola de 3x10⁵ células CT26 (Specht, *et al.* 1997, J Exp Med 186(8):1213-21). Los días 10, 12, 14, 17, 19 y 21 grupos de ratones recibieron 5x10⁷ ufp del virus indicado mediante instilación intranasal según se describe en otra parte (Stjdl, *et al.* 2000, Journal of Virology 74(20):9580-5). Los ratones se pesaron diariamente y se vigilaron en cuanto a pérdida de peso, deshidratación, erección pilosa, comportamiento de acurrucamiento, distrés respiratorio y parálisis del miembro trasero. Los animales se eutanizaron en el brote del distrés respiratorio y sus pulmones se examinaron para confirmar el desarrollo del tumor.

45 *Análisis de MTS*

En cada experimento, la línea de células de ensayo se sembró en placas de 96 pocillos a razón de 3 x 10⁴ células/pocillo en medio de crecimiento (DMEM-F12-HAM + FBS al 10%). Tras incubación durante una noche (37°C, 5% de CO₂), los medios se retiraron mediante aspiración y a cada pocillo se añadieron 20 µl de medios que contenían virus (α-MEM, sin suero) oscilando a incrementos de 10 veces desde 3 x 10⁶ ufp/pocillo a 3 ufp/pocillo o medios control negativos que no contenían virus alguno. Cada dosis de virus testada se hizo en réplicas de seis. Después de incubación durante 60 minutos para permitir la fijación del virus, se añadieron a cada pocillo 80 µl de medio de crecimiento y las placas se incubaron durante otras 48 horas. La viabilidad de las células se midió utilizando el reactivo CellTitre 96TM AQ_{ueous} MTS (Promega Corp.), que utiliza soluciones de un compuesto de tetrazolio (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio, sal interna (MTS) y un reactivo de acoplamiento de electrones (metosulfato de fenazina; PMS). MTS es biorreducido por parte de células a un producto de formazan que es soluble en medio de cultivo tisular. La absorbancia del producto de formazan a 490 nm se puede medir directamente a partir de placas de ensayo de 96 pocillos. La cantidad de producto de formazan, según se determina a partir de la absorbancia a 490 nm, es directamente proporcional al número de células vivas en el cultivo.

Para analizar defectos de IFN, se pretrataron líneas de células con 5 unidades/ml de IFN-α o IFN-β durante 12 horas y luego se enfrentaron a un intervalo de dosis de VSV WT según se describe antes. Se efectuó un análisis MTS estándar y los resultados se compararon con los resultados de células no pretratadas.

ES 2 319 424 T3

Microdisposición

Células OVCAR4 tratadas simuladamente o infestadas con cepas de VSV de tipo salvaje (WT) y mutantes se recolectaron en PBS, se sedimentaron y se resuspendieron en 250 μ l de tampón de resuspensión (Tris 10 mM pH 7,4, NaCl 15 mM, MgCl₂ 12,5 mM). Se añadieron 600 μ l de tampón Lysis (Tris 25 mM pH 7,4, NaCl 15 mM, MgCl₂ 12,5 mM, sacarosa al 5% y NP-40 al 1%) y los lisados se incubaron a 4°C durante 10 min con sometimiento a vórtice ocasional. Los núcleos se recogieron mediante centrifugación a 1000 x g durante 3 min. El sobrenadante (fracción de citoplasma) se recogió y se congeló a -80°C, al tiempo que el sedimento (fracción nuclear) se lavó una vez con 250 μ l de tampón lysis y se congeló. El ARN total se aisló de las fracciones tanto nuclear como citoplásmica utilizando el kit Qiagen RNeasy™ (según las instrucciones del fabricante; Qiagen, Mississauga, Canadá), seguido de precipitación con LiCl para concentrar cada muestra. Veinte microgramos de cada muestra de ARN se trataron de acuerdo con el protocolo estándar del fabricante (Affymetrix; Santa Clara CA; EE.UU.) y se hibridaron a una disposición de Genoma Humano U133A Affymetrix GeneChip™ (chip HG U133A). Cada chip se ajustó a 1500, se normalizó a la normalización 100 de genes de control en cada chip HG U133A, después todas las muestras nucleares se normalizaron a la muestra nuclear simulada sobre una base de genes y las fracciones citoplásmicas se normalizaron a la muestra citoplásmica simulada correspondiente. Los datos se analizaron utilizando el software Genespring™ correspondiente (Silicon Genetics; Redwood City CA, EE.UU.).

Transferencia Western

Células OVCAR4 se desarrollaron en RPMI (Wisent), suplementado con suero de bovino fetal (SBF) al 10% (Wisent). 1,0 x 10⁷ células se extendieron en placas de 10 cm el día antes de la infestación. Tras la infestación, se retiraron los medios y se reemplazaron por RPMI solo, antes de la adición de 5x10⁷ ufp por cada cepa voral VSV. Una hora después de la adición del virus, se retiraron los medios y se reemplazaron por RPMI suplementado con SBF 10% para el periodo restante del experimento. Las células se lisaron en tampón NP-40 lysis estándar y el extracto de células enteras se hizo pasar sobre gel de SDS-poliacrilamida y se manchó con los siguientes anticuerpos según se indica: IRF-7 (sc-9083), IRF-3 (sc-9082), ISG56 (un regalo de Genes Sen), VSV-N (policlonal dirigido contra la proteína N de Indiana de longitud completa) y Actin (sc-8432).

Construcciones y rescate viral

La creación de la IRF-7 Δ constitutivamente activa (IRF-7 Δ 247-467) ha sido descrita previamente en otra parte (Libn *et al.*, 2000, J. Biol. Chem., 275: 34320-34327). IRF-7 Δ 247-467 se amplificó mediante PCR, utilizando un cebador directo al epítipo Flag con una señal del casquete 5' VSV adicional y un enlazador Xho1:

5'-ATCGCTCGAGAACAGATGACTACAAAGACGATGACGACAAG-3' [SEQ. ID. N°: 7]

junto con un cebador reverso de IRF-7 específico que contiene una señal de poli A de VSV y un enlazador Nhe1:

5'-ATCGGCTAGCAGTTTTTTTCAGGGATCCAGCTCTAGGTGG GCTGC-3' [SEQ. ID. N°: 8]

El fragmento de la PCR se clonó luego en los sitios Xho1 y Nhe1 del vector pVSV-XN2 de replicón de rVSV (proporcionado por John Rose). La recuperación de rVSV ha sido previamente descrita (Lawson *et al.*, 1995, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92;4477-4481).

PCR cuantitativa de ARNm de interferón beta

Se aisló ARN total nuclear y citoplásmico de células OVCAR4 infestadas o infestadas simuladamente según las instrucciones del fabricante (RNeasy; Qiagen, Canadá). Cuatro microgramos de ARN total se trataron con DNasa y se transcribieron inversamente. Se realizó una PCR cuantitativa por triplicado para amplificar IFN- β y dianas de hipoxantina.guanina fosforribosiltransferasa (HPRT) a partir de cada una de ellas, utilizando la tecnología Lightcycler™ de Roche (Roche Diagnostics, Laval, Canadá). Los puntos de cruce fueron convertidos en cantidades absolutas, basadas en curvas patrón generadas a partir de cada amplicón diana. Subsiguientemente se normalizó la señal de IFN- β a HPRT, ya que los niveles de HPRT no se modifican durante el transcurso de estas infestaciones, datos no mostrados. Los cebadores utilizados para amplificar IFN- β eran:

sentido 5'-TTGTGCTTCTCCACTACAGC-3' [SEQ. ID. N°:9];

antisentido 5'-CTGTAAGTCTGTTAATGAAG-3' [SEQ. ID N°: 10]

ES 2 319 424 T3

y los cebadores de HPRT eran:

sentido 5'-TGACACTGGCAAAAACAATGCA-3' [SEQ. ID. N°:11];

antisentido 5'-GGTCCTTTTCACCAGCAAGCT-3' [SEQ. ID N°: 12].

RT-PCR de genes estimulados con interferón alfa e interferón beta

Células A549A cultivadas en medio F12K suplementado con SBF al 10% se infestaron con cepas de VSV WT o mutantes (MDI 10, en donde MDI se refiere a multiplicidad de infección, que es la relación de partículas de virus infecciosas a células). El ARN se extrajo 4 horas después de la infestación utilizando Trizol (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Un microgramo de ARN de transcribió inversamente con cebadores Oligo dT y 5% de RT se utilizó como plantilla en una Taq PCR. Los cebadores utilizados eran como sigue:

cebador directo Mx 5'-ATG GTT GTT TCC GAA GTG GAC-3' [SEQ. ID. N°:13];

cebador reverso Mx 5'-TTT CTT CAG TTT CAG CAC CAG-3' [SEQ. ID. n°:14];

cebador directo de N de VSV 5'-ATG TCT GTT ACA GTC AAG AGA ATC-3' [SEQ. ID. N°: 15];

cebador reverso de N de VSV 5'-TCA TTT GTC AAA TTC TGA CTT AGC ATA-3' [SEQ. ID. N°:16];

cebador directo RANTES 5'-TAC ACC AGT GGC AAG TGC TCC AAC CCA G-3' [SEQ. ID. N°:17];

cebador reverso RANTES 5'-GTC TCG AAC TCC TGA CCT CAA GTG ATC C-3' [SEQ. ID. N°:18];

cebador directo de β -actina 5'-ACA ATG AGC TGC TGG TGG CT-3' [SEQ. ID. N°:19] y

cebador reverso de β -actina 5'-GAT GGG CAC AGT GTG GGT GA -3' [SEQ. ID. N°:20].

Resultados

La atenuación de VSV in vivo depende de las vías de interferón intactas

Se encontró que dos variantes de VSV que producen pequeñas placas en células que responden a interferón (a las que se alude en esta memoria como AV1 y AV2) inducen de veinte a veinticinco veces más VSV de interferón alfa (IFN- α) que el VSV de tipo salvaje (WT) tras la infestación de líneas de células epiteliales (Figura 1A). La secuenciación genómica completa de las variantes reveló que diferían de la cepa de tipo salvaje en sus proteínas M con solamente una sola sustitución de aminoácido en el caso de AV1 (M51R) y dos aminoácidos (V221 F y S226R) en AV2. Se determinó que la DL₅₀ de AV1 y AV2, cuando se administran intranasalmente a ratones Balb/C era 10.000 veces mayor que VSV WT suministrado por la misma vía (Figura 1B). Se observaron resultados similares en ratones CD-1 (WT = 1 x 10⁶ AV1 = 2 x 10⁸ ufp). De manera significativa, AV1 y AV2 eran tan tóxicos como el virus de tipo salvaje cuando se utilizan para infestar animales inactivados con el receptor de interferón, indicando que la atenuación del desarrollo de AV1 y AV2 *in vivo* depende de un sistema de interferón intacto (Figura 1C). Además, cuando se utilizan en combinación con VSV WT, se encontró que la cepa AV2 mutante protegía a ratones muy susceptibles (PKR^{-/-}) de VSV WT (Figura 1D). De hecho, incluso a una dosis 100 veces mayor que la DL₁₀₀ para VSV WT no resultaron evidentes síntomas de morbilidad (deshidratación, erección pilosa, malestar, actividad reducida, distres respiratorio, parálisis de las extremidades traseras) cuando se enfrentó a los ratones a AV2 y VSV WT simultáneamente. Junto con la observación de que estos mutantes permiten la producción de IFN tras la infestación, estos datos son consistentes con un modelo, en el cual la infestación con cepas mutantes AV1 o AV2 de VSV inducen la producción de interferón en el hospedante, estableciendo con ello un estado antiviral que protege al hospedante frente a una infestación patológica.

Mutantes de VSV tanto de tipo salvaje como atenuados disparan respuestas anti-virales innatas

Con el fin de determinar en qué punto durante la infestación los virus de tipo salvaje y atenuados divergen en sus capacidades para inducir o inactivar respuestas anti-virales de células hospedantes, se necesitó primeramente establecer los sucesos de señalización temprana que se producen durante la infestación por VSV de una célula hospedante. El uso del análisis de la microdisposición a lo largo del tiempo de la infestación por virus debería permitir detectar sucesos de señalización temprana disparados por la infestación por VSV que conducen, directa o indirectamente, a la activación

transcripcional de genes anti-virales. A partir de los datos de la microdisposición es evidente que la infestación por VSV conducen a la suprarregulación de un cierto número de genes en un orden secuencial específico. Por lo tanto, se agruparon juntos genes en base a: (1) su cinética de suprarregulación a lo largo del tiempo y (2) su modelo de inducción en respuesta a la infestación por VSV WT frente a mutante. Estos cohortes de genes corresponden, probablemente, a 3 ondas transcripcionales separadas (Tabla 1 y Figuras 2A, B y C). Consistente con esto, los subtipos IFN- β , IRF-7 e IFN- α se segregaron cada uno a cohortes separados. Otros grupos han establecido que, en respuesta a un cierto número de estímulos, los factores de transcripción latentes IRF-3, NF κ B y c-JUN/ATF-2 se activan y ensamblan junto con CBP/p300 en el promotor de IFN- β para inducir la expresión (Wathelet *et al.*, 1998, Mol. Cell 1:507-518). También, se sabe que IFN- β actúa de una manera de autoclave para inducir la activación del complejo transcripcional ISGF3 que conduce a la inducción de IRF-7 y otros genes que contienen elementos ISRE en sus promotores (Lu *et al.*, 2000, J. Biol. Chem., 275:31805-31812; Zhang y Pagano, 1997, Mol. Cell. Biol., 17:5748-5757; Zhang y Pagano, 2001, J. Virol. 75: 341-350). Además, la expresión ectópica de IRF-7 ha demostrado ser crítica para la expresión de IFN- α en células incapaces de formar complejos ISGF3 (Sato *et al.*, 1998, FEBS Lett. 441: 106-110). Esta dependencia atribuida de la inducción de IFN- α sobre IRF-7 y la expresión de IRF-7 sobre IFN- β es reminiscente de los perfiles cinéticos de los genes en la disposición descrita. A la vista de estas observaciones, y asumiendo que IFN- β , IRF-7 e IFN-1 α son genes arquetípicos en un modelo general, parece ser que estos cohortes de genes pueden corresponder a 3 ondas transcripcionales separadas; cada una dependiente de y disparada por la onda transcripcional previa (Tabla 1 y Figuras 2A, B y C).

TABLA 1

Análisis de microdisposición de la respuesta transcripcional a una infestación por VSV a lo largo del tiempo

Nº de acceso	Nombre común	WT			AV1			AV2		
		Horas post infestación			Horas post infestación			Horas post infestación		
		3	6	12	3	6	12	3	6	12
RESPUESTA TRANSCRIPCIONAL PRIMARIA										
NM 000201.1	CD54	2.3	A	A	3.3	3.0	33.6	2.7	5.4	56.3
NM016323.1	CEB1	2.0	21.2	204.4	1.6	3.0	279.3	1.9	73.6	490.5
U83981	GADD34	10.8	57.5	95.0	3.1	48.8	422.7	5.5	159.0	686.7
NM_002176.1	IFN beta	4.2	103.2	488.6	3.2	154.5	1531.6	3.6	487.3	2157.9
NM 000600.1	IL6	7.3	19.1	38.2	3.8	44.7	171.6	7.4	120.3	238.7
BE888744	ISG54	19.5	173.1	804.5	4.7	141.0	721.9	11.4	268.4	1357.8
NM_001548.1	ISG56	32.3	285.9	855.2	20.0	456.8	1411.7	39.8	766.0	1992.1
NM_001549.1	ISG60	7.6	57.5	238.0	4.1	97.7	288.6	7.0	151.6	457.7
AF063612.1	OASL	6.6	71.8	222.0	3.4	81.9	388.9	5.7	172.0	776.9
NM_021127.1	PMAIP1	5.2	22.1	58.6	2.1	17.3	87.5	4.3	34.3	169.8
NM_002852.1	PTX3	5.9	3.1	A	6.4	11.7	114.0	4.9	29.9	117.6
AF332558.1	PUMA	10.6	A	A	A	38.7	211.6	9.8	77.8	428.0

ES 2 319 424 T3

RESPUESTA TRANSCRIPCIONAL PRIMARIA

	NM_002985.1	RANTES	3.4	60.1	945.0	2.6	84.9	1796.7	4.1	301.8	3916.1
	AY029 180.1	SUPAR	3.7	9.8	14.7	2.4	10.5	40.5	2.8	27.7	46.3
5	NM_006290.1	TNFAIP3	2.8	6.3	15.5	2.7	13.8	83.5	3.1	30.5	152.8

RESPUESTA TRANSCRIPCIONAL SECUNDARIA

	NM_030641.1	APOL6	A	A	A	A	153	40.8	A	25.2	37.3
	AF323540.1	APOLL	1.8	A	A	1.0	11.3	25.7	2.2	10.7	34.5
10	U84487	CX3C	2.0	2.5	2.5	1.7	7.0	45.1	2.3	14.1	65.9

**precursor de
quimioquina**

	BC002666.1	GBP1	A	A	4.2	A	35.9	171.6	1.4	66.2	249.2
	NM_006018.1	HM74	A	A	A	2.2	29.1	72.5	A	66.4	45.4
15	NM_031212.1	hMRS3/4	A	A	A	2.5	4.2	21.3	A	10.1	18.3
	NM_005531.1	IFI16	A	A	A	2.4	12.8	38.1	2.8	189	46.2
	NM_005532.1	IF127	A	A	21.9	A	36.6	281.0	A	51.0	295.4
	NM_004509.1	IF141	A	A	A	A	10.0	22.8	13	11.9	18.1
20	NM_022873.1	IFI-6-16	0.9	2.5	2.2	0.7	7.0	15.6	1.1	9.6	15.7
	NM_003641.1	IFTTM1	1.9	A	A	1.2	8.5	67.1	1.9	143	42.1
	AA749101	IFITM1	1.2	3.1	2.3	1.0	6.6	40.9	1.2	9.5	32.6
	NM_000882.1	IL12A	1.6	A	A	A	4.9	13.7	A	6.5	28.8
25	M15329.1	IL1A	nd	A	A	A	8.3	79.4	A	27.0	287.6

	NM_004030.1	IRF7	1.4	A	A	A	19.9	109.9	2.2	33.7	1443
--	-------------	------	-----	---	---	---	------	-------	-----	------	------

	NM_006084.1	IRF9	A	A	12	1.6	6.5	11.2	1.5	7.8	17.4
	BC001356.1	ISG35	1.1	A	A	1.0	5.8	23.2	1.4	7.1	20.2
30	AF280094.1	ISG75	1.3	1.8	2.2	1.5	103	16.2	1.2	12.5	13.8
	AF280094.1	ISG75	0.9	1.7	A	1.2	7.5	10.8	1.5	9.5	11.1
	U 17496.1	LMP7	A	A	A	A	7.6	15.3	0.9	10.0	10.4
	NM_006417.1	MTAP44	A	A	23.3	A	10.8	82.7	A	18.0	133.9
35	NM_002462.1	MXA	A	A	27.6	A	48.1	261.9	A	85.7	232.9
	AB014515	NEDD4 BP1	A	A	9.2	2.0	4.0	13.1	1.5	4.5	19.5
	NM_002759.1	PKR	0.5	0.9	2.0	0.8	43	15.2	1.0	6.6	9.6
	NM_021 105.1	PLSCR1	1.4	1.7	A	2.2	5.0	24.9	2.1	4.9	15.1
40	NM_017912.1	ligasa Ub putativa	A	A	19.1	A	9.6	26.3	A	12.5	24.8

	BF939675	SECTM1	A	A	A	A	20.7	93.8	A	24.8	33.9
	BC004395.1	Similar a apolipoprotefna L	A	A	A	A	11.7	172	A	14.6	21.3

	NM_003141.1	SSA1	A	A	A	1.2	5.9	11.2	1.4	7.9	11.1
	AA083478	STAF50	nd	A	nd	1.7	8.5	96.3	nd	16.7	56.1
	NM_005419.1	STAT2	1.1	A	A	1.3	3.0	9.1	1.1	4.3	9.1
50	NM_003810.1	TRAIL	A	A	A	A	22.4	135.4	0.7	37.3	88.6
	NM_020119.1	ZAP	A	A	19.4	0.9	4.6	79.9	A	11.4	133.8

RESPUESTA TRANSCRIPCIONAL TERCIARIA

	M 12350.1	IFN-27	A	A	A	nd	nd	1023	nd	A	101.4
55	NM_024013.1	IFNA1	nd	A	A	nd	22	53.6	nd	A	44.0
	NM_002171.1	IFNA10	A	A	A	A	A	96.2	A	A	55.1

60

65

RESPUESTA TRANSCRIPCIONAL TERCIARIA

NM_006900.2	IFNA13	A	A	A	A	A	165.4	nd	A	152.1
NM_002172.1	IFNA14	A	A	A	A	A	159.0	A	4.4	91.1
NM_002173.1	IFNA16	1.0	A	1.8	1.1	0.9	139.9	0.7	3.3	95.7
M38289.1	IFNA17	A	A	A	A	A	21.5	A	A	19.8
NM_002169.1	IFNA5	1.0	A	A	0.9	A	16.4	0.9	A	11.6
NM_021057.1	IFNA7	A	A	3.5	A	A	105.0	A	3.4	61.7

Datos representados como cambio múltiple en comparación con muestras infestadas simuladamente.

Todas las muestras son de fracciones nucleares de células infestadas

A = ausente (ningún ARNm detectable); nd = ningún dato; genes enmarcados representan "genes arquetípicos", véase el texto para una explicación

La proteína M de VSV WT bloquea la señalización de interferón beta, mientras que la proteína M de AV1 y AV2 no puede

Para una mejor comprensión de la respuesta transcripcional temprana a una infestación por VSV se buscó una comprensión de la diferencia en estas respuestas entre las cepas WT e "inductoras de IFN". Mediante transferencia Western, parece ser que los virus WT, AV1 y AV2 disparan la fosforilación de IRF-3 con cinéticas similares (Figura 2E). Además, se encontró que algunos de los genes directamente regulados por los factores de transcripción IRF-3, NFκB y c-JUN/ATF-2 estaban suprarregulados al mismo grado en células infestadas con virus WT, AV1 o AV2 (Figura 2A). Por ejemplo, genes de respuesta primaria eran robustamente inducidos 3-6 horas post-infestación por parte de los tres virus (Figuras 2A, D y E). Por otro lado, genes de respuesta secundaria, que requieren la producción de IFN-β y la activación autocrina de la vía JAK/STAT (Figura 2B), eran diferencialmente inducidos por parte de los virus de tipo salvaje y atenuados (véase IRF-7 en las Figuras 2B y 2E). Como consecuencia de la producción perjudicada de IRF-7 en células infestadas con VSV WT, productos génicos de respuesta terciaria, tales como los transcritos IFN-α, no eran inducidos en células infestadas con VSV de tipo salvaje (Figura 2C), aunque eran fuertemente expresados en células infestadas con AV1 y AV2. Considerados juntos, estos resultados sugieren que VSV de tipo salvaje, a través de su proteína M, afecta a un bloque entre las respuestas transcripcionales antivirales primarias y secundarias mostradas en la Figura 2. En experimentos de transfección anteriores se ha sugerido que la proteína M de VSV bloquea la transcripción de IFN-β (Ferran y Lucas-Lenard, 1997, J. Virol., 71: 371-377), inhibe la exportación nuclear de ARNms (Her *et al.*, 1997, Science, 276: 1845-1848; von Kobbe *et al.*, 2000, Mol. Cell., 6:1243-1252) o interfiere con la señalización Jak/Stat (Terstegen *et al.*, 2001, J. Immunol., 167:5209-5216). Los estudios que esbozan el transcrito, descritos en esta memoria, serían consistentes con uno cualquiera de los dos últimos mecanismos, pero no se observó perjuicio alguno en la inducción de la vía Jak/Stat por parte de interferón exógeno en células infestadas (datos no mostrados). Por otra parte, cuando se utilizó una microdisposición o el análisis por RT-PCR para comparar y contrastar transcritos en fracciones nucleares y citoplásmicas, se encontraron diferencias claras entre células infestadas con virus de tipo salvaje y atenuados (Figura 3). De manera importante, el ARNm de IFN-β, a pesar de que era inducido en fracciones nucleares por parte de los tres virus, no se encontró en grado significativo en la agrupación citoplásmica de ARNms en células infestadas de tipo salvaje.

En conjunto, estos resultados son consistentes con la idea de que tras la infestación, VSV de tipo salvaje dispara una respuesta antiviral primaria, pero a través de la expresión coordinada de productos génicos virales entorpece respuestas secundarias y terciarias bloqueando la exportación nuclear de ARNms antivirales críticos. En apoyo de este modelo, se construyó un VSV de tipo salvaje que expresa una versión constitutivamente activa de IRF-7. Como era de esperar, este virus tiene un fenotipo atenuado y es capaz de inducir la expresión de genes de IFN-α en el espacio de 4 horas post-infestación, incluso en presencia de proteína M de VSV de tipo salvaje (Figura 2D; IFN-α no se expresa hasta 12 horas post-infestación en el caso de infestaciones por AV1 y AV2; Tabla 1).

Virus AV1 y AV2 atenuados conservan su capacidad de exterminar células tumorales

Para evaluar las propiedades oncolíticas de las cepas de VSV atenuadas, el panel de células tumorales humanas NCI (60 líneas de células de un espectro de malignidades) fue enfrentado a: virus WT, AV1 o AV2, y se sometió a ensayo en cuanto a la muerte metabólica de las células 48 horas más tarde, según se describe en Materiales y Métodos. Resulta claro de la Tabla 2A que VSV WT es capaz de infestar productivamente y exterminar una amplia gama de diferentes tipos de células cancerosas. Además, como ya había indicado un trabajo anterior de los autores de esta invención (Stojdl DF, Lichty B, Knowles S, Marius R, Atkins H, Sonenberg N, Bell JC 2000 Nature Medicine 6:821-5), la mayor parte de las líneas de células cancerosas sometidas a ensayo (aproximadamente el 80%) demostraron

ES 2 319 424 T3

respuestas perjudicadas a IFN- α o IFN- β (Tabla 2B). Por lo tanto, de manera no sorprendente, AV1 y AV2 eran tan eficaces para exterminar estas líneas de células tumorales como VSV WT, presumiblemente debido a los defectos de señalización de IFN en estas células (Tablas 2A y B).

5

TABLA 2A

10

Cepas de VSV mutantes son altamente líticas en miembros del panel NCI 60 de líneas de células cancerosas

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

	WT		AV1		AV2	
		MOI		MOI		MOI
Leucemia	67% (4/6)*	0,13	nd		60% (3/5)	0,02
Carcinoma de pulmón NSC	70% (7/9)	0,02	60% (3/5)	0,001	75% (6/8)	0,19
Carcinoma de colon	86% (6/7)	0,037	100% (5/5)	0,001	100% (6/8)	0,017
SNC	80% (4/5)	0,02	50% (1/2)	0,6	60% (3/5)	0,38
Melanoma	75% (6/8)	0,1	100% (2/2)	0,15	63% (5/8)	0,25
Carcinoma de ovarios	100% (6/6)	0,3	67% (2/3)	0,0005	60% (3/5)	0,14
Carcinoma renal	88% (7/8)	0,24	100% (3/3)	0,14	100% (7/7)	0,48
Próstata	100% (2/2)	0,06	100% (2/2)	0,035	100% (2/2)	0,04
Mama	83% (5/6)	0,009	75% (3/4)	0,005	60% (3/5)	0,12
Todas las líneas de células testadas	82% (47/57)	0,11	80% (21/26)	0,07	75% (38/51)	0,20
<p>* Porcentaje de líneas de células del panel NCI 60 por tipo de tumor consideradas muy sensibles a la infestación por el virus. () denota el número de líneas de células muy susceptibles del número de líneas de células testadas. La línea de células se consideró muy susceptible si la $CE_{50} \leq$ MOI de 1 después de una infestación de 48. MOI representa CE_{50} (MOI) media de líneas de células susceptibles. nd = no determinado</p>						

TABLA 2B

La mayoría de las líneas de células en el panel de células NCI 60 muestra defectos de IFN

	Defectos de IFN de tipo I
Leucemia	100% (6/6)
Carcinoma de pulmón NSC	71% (5/7)
Carcinoma de colon	100% (7/7)
SNC	75% (3/4)
Melanoma	85% (6/7)
Carcinoma de ovarios	67% (4/6)
Carcinoma renal	75% (6/8)
Próstata	100% (2/2)
Mama	60% (3/5)
Todas las líneas de células testadas	81% (42/52)
*Denota el número de líneas de células en cada grupo que no respondían a tratamiento previo con IFN- α o IFN- β . Se considera que la línea de células no responde si el tratamiento previo con IFN era incapaz de afectar significativamente (< 10 veces) la CE ₅₀ de células infestadas con VSV WT durante 48 horas.	

Actividad oncolítica in vivo de AV1 y AV2

Anteriormente, se informó del tratamiento con éxito de tumores de xenoinjerto subcutáneos en ratones hipotímicos con VSV WT (Stojdl, *et al.* 2000, Nature Medicine 6(7): 821-5, pero en estos experimentos se requirió proteger a los animales inmunodeficientes frente a los tratamientos con virus. Los resultados descritos más arriba sugieren que AV1 y AV2 deberían exterminar eficazmente a células tumorales con una escasa toxicidad en modelos de ratones hipotímicos, incluso en ausencia de interferón administrado de forma exógena. Células de carcinoma de ovarios humano se inyectaron en la cavidad peritoneal de ratones hipotímicos CD-1 y se dejó que se desarrollaran durante 12 días. La mayor parte de los ratones (14/15) que recibieron virus inactivado por UV desarrollaron una ascitis hacia el día 15 post-tratamiento (el ratón restante en este cohorte alcanzó un punto final el día 39). En contraposición, 3 dosis de AV2 suministradas en la cavidad peritoneal proporcionaron curaciones duraderas del 70% de los ratones (Figura 4A). De manera sorprendente, mientras que una dosis individual intraperitoneal de VSV WT es uniformemente letal para ratones hipotímicos, ninguno de los animales tratados con tres dosis de AV2 exhibía incluso síntoma alguno de una infestación por virus (p. ej. malestar, pérdida de peso, deshidratación).

Tratamiento sistémico de tumores subcutáneos con AV1 y AV2

Mientras que las cepas AV1 y AV2 son eficaces cuando se inyectan en el sitio primario de asentamiento del tumor, se necesitó determinar la eficacia terapéutica de cepas atenuadas sistémicamente suministradas. Para ello, se establecieron tumores subcutáneos inyectando células de carcinoma de colon CT26 en el flanco trasero de ratones Balb/c singeneicos. Una vez que los tumores se volvieron palpables (aproximadamente 10 mm³) se administró el virus a través de inyección en la vena de la cola. Doce días después del tratamiento, los ratones que recibieron VSV inactivado por UV alcanzaron el punto final con un tamaño medio del tumor de 750 mm³. En contraposición, un tratamiento sencillo con AV2 mostró una eficacia significativa, demorando el tiempo hasta el punto final en casi 3 veces (34 días). De los 8 animales en este grupo de tratamiento, se consideró que 7 respondían parcialmente, mientras que solamente 1 ratón no respondía al tratamiento (Tabla 3). Cuando se administraron múltiples dosis de AV1 o AV2 por vía intravenosa, se incrementó acusadamente la eficacia de los tratamientos (Figura 4B y Tabla 3). Con la excepción de un animal, todos los tumores respondieron al tratamiento con AV1, mostrando 3/6 ratones una regresión completa del tumor. Dos de estos ratones mostraron regresiones completas en una fase tan temprana como los días 8 y 9, respectivamente, post-infestación. Dos de los animales restantes mostraron respuestas parciales, demorando la progresión del tumor en casi 2 veces en comparación con controles. Todos los ocho ratones infestados con AV2 respondieron bien al tratamiento,

ES 2 319 424 T3

desarrollando cinco de ocho regresiones duraderas de los tumores. Además, estos ratones no consiguieron producir tumores cuando se les volvió a enfrentar a células CT26 7 meses después del tratamiento, sin traza alguna de virus detectable (datos no mostrados), indicando quizás que se había desarrollado una inmunidad, mediada por el hospedante, al tumor.

5

La duplicación del número de dosis virales administradas a animales portadores del tumor no aumentaba el número de regresiones duraderas (Tabla 3), sugiriendo que la inmunidad anti-viral que surge durante el transcurso del tratamiento puede influir sobre el resultado. También, en un enfoque descrito previamente con VHS oncolítico (Lambright *et al.*, 1999, Ann. Thorac. Surg., 68: 1750-1760 y 1761-1772), se testó la utilidad de inyectar células infestadas con el virus, en lugar del virus solo, como una modalidad terapéutica. Se razonó que células infestadas pudieran funcionar como "caballos de Troya" enmascarando al virus mientras que se encuentran en el sistema vascular y facilitando el suministro del virus cuando se depositan en la neo-vasculatura del tumor. Para este fin, células CT-26 infestadas *in vitro* durante dos horas con AV2 fueron inyectadas en la vena de la cola de ratones portadores de tumores. En estos experimentos, pareció que células CT-26 infestadas eran tan eficaces como un modo de suministrar virus a sitios del tumor como el utilizar virus purificados (tres regresiones completas y una respuesta parcial; Figura 4B).

15

Todas las formas de tratamiento intravenoso eran bien toleradas por los ratones, sin que se produjeran muertes, y síntomas mínimos de morbilidad. Los ratones infestados tenían una erección pilosa de suave a media, una suave deshidratación y una cierta pérdida transitoria de peso corporal tras el tratamiento inicial (Figura 4C). Estos síntomas solamente fueron observados después de la infestación inicial, todas las dosis subsiguientes no consiguieron provocar síntoma alguno de infección.

20

TABLA 3

25

Tasa de respuesta incrementada con el número incrementado de dosis en el modelo de tumores subcutáneos

30

35

40

45

50

55

60

65

		AV2 UV	AV2
1 dosis			
	CR	0%* (0/5)	0% (0/8)
	PR	0% (0/5)	88% (7/8)
	NR	100% (0/5)	12% (1/8)
6 dosis			
	CR	0% (0/5)	63% (5/8)
	PR	0% (0/5)	37% (3/8)
	NR	100% (5/5)	0% (0/8)
12 dosis			
	CR	0% (0/5)	63% (5/8)
		AV2 UV	AV2
	PR	0% (0/5)	37% (3/8)
	NR	100% (5/5)	0% (0/8)

* Porcentaje de ratones que muestra respuestas completas (CR), respuestas parciales (PR) y ninguna respuesta (NR) para cada grupo de tratamiento. Las respuestas completas se refieren a ratones con una regresión completa de sus tumores sin síntoma alguno de tumores al final del experimento (80 días). Las respuestas parciales son tumores que mostraron demoras en el tamaño al tiempo hasta el punto final en comparación con ratones control (AV2 UV). 0 denota el número de ratones positivos del número total de ratones en el grupo.

La administración sistémica de AV1 y AV2 es eficaz contra una enfermedad diseminada

Células CT-26, cuando se inyectan en la vena de la cola, siembran tumores por todo el ratón, aunque, predominantemente, en los pulmones, conduciendo a una mortalidad en el espacio de 3-4 semanas. Se examinaron los pulmones de cuatro ratones 16 días después de la inyección de células tumorales y cuatro días después del tratamiento con virus inactivados por UV (Figura 4D). Estos pulmones tenían 3 veces su masa normal debido a la carga del tumor, que se evidencia como nódulos sobre la superficie de los pulmones. En contraposición, ratones compañeros de jaula portadores de tumores que recibieron una dosis única intravenosa de AV2, 4 días antes del momento del sacrificio, tenían pulmones con una masa normal y unos pocos nódulos tumorales obvios. AV2 administrado por instilación intranasal mostraron también una eficacia significativa, mientras que parecía óptima una combinación de administración intravenosa e intranasal (Figura 4D).

La Figura 4E muestra los lugares de supervivencia de ratones a los que se sembraron tumores en los pulmones y luego se trataron por vía intranasal con virus inactivados por UV, AV1 o AV2. El tiempo medio hasta la muerte (MTD - siglas en inglés) de los animales tratados con virus inactivados por UV era de aproximadamente 20 días. Sin embargo, ratones tratados con AV1 o AV2 estaban protegidos por completo. Este experimento demuestra la capacidad sorprendente de AV1 y AV2 de producir curaciones duraderas en un modelo de tumores agresivo, diseminado, inmunocompetente.

20 *Discusión*

Una diferencia clave entre estos virus atenuados y las versiones oncolíticas de VSV, de las que se informó previamente, es la incapacidad de proteínas M mutantes de bloquear la producción de interferón en células infestadas. M de VSV es una proteína multifuncional, requerida para varias funciones virales claves, que incluyen: germinación (Jayakar, *et al.* 2000, *J. Viral*, 74: 9818-9827), montaje del virión (Newcomb, *et al.* 1982, *J. Viral*, 41: 1055-1062), efecto citopático (Blondel, *et al.* 1990, *J. Virol.*, 64: 1716-1725) e inhibición de la expresión del gen en el hospedante (Lyles, *et al.* 1996, *Virology* 225: 172-180). La última propiedad ha sido atribuida a la capacidad de M de bloquear la actividad de la ARN polimerasa en el hospedante (Yuan *et al.*, 2001, *J. Virol.*, 75:4453-4458) o de inhibir el transporte nuclear tanto de las proteínas como de los ARNs hacia y fuera del núcleo hospedante (Her *et al.*, 1997, *ibid*; von Kobbe *et al.*, 2000, *ibid*). Los resultados que se presentan aquí utilizando una infestación con virus son consistentes con los bloqueos en el transporte nuclear que son el mecanismo principal mediante el cual cepas de VSV de tipo salvaje mitigan la respuesta antiviral en el hospedante. El presente análisis de transcritos de células infestadas proporcionó poca evidencia que sustentara un papel de la proteína M en la inhibición de la transcripción de células hospedantes, sino que, más bien, demuestra que la infestación por VSV dispara una estimulación, mediada por IRF-3, de genes antivirales, seguido de un bloqueo, mediado por la proteína M, de transcritos de respuesta primaria procedentes de núcleos de células infestadas. Particularmente vinculado a este estudio está el trabajo del grupo de Dahlberg (Petersen *et al.*, 2000, *Mol. Cell. Biol.*, 20:8590-8601) y otros (von Kobbe *et al.*, 2000, *ibid*) que ha demostrado, mediante estudios de transfección, que la proteína M se puede asociar con proteínas de poro nucleares y realizan un bloqueo en la exportación de ARNm.

Aunque no se pretende estar ligado por la teoría, parece ser que los programas antivirales en células hospedantes se inician mediante activación de los factores de transcripción latentes NF κ B, c-JUN/ATF2 e IRF-3. Tras la entrada del virus en la célula hospedante, los factores de transcripción c-JUN e IRF-3 son fosforilados por parte de JNK y una quinasa viralmente activada, recientemente identificada (John Hiscott, comunicación personal), respectivamente, mientras que NF κ B es liberado desde su inhibidor I κ B a través de la acción de IKK(s) situados más arriba (DiDonato *et al.*, 1997, *Nature*, 388:548-554). Los factores de transcripción activados se desplazan al núcleo y forman coordinadamente un complejo de potenciosoma ("enhanceosome") en el promotor de IFN- β , conduciendo a la inducción de IFN- β (Wathelet *et al.*, 1998, *ibid*). A esto se alude en esta memoria como la respuesta transcripcional primaria a una infestación por virus. Se ha postulado que una onda transcripcional secundaria es disparada por la inducción, dependiente de IFN- β , de una diversidad de genes estimulados por interferones. Los datos presentados en esta memoria con la proteína M de tipo salvaje ayudan a delinear la distinción entre estos eventos transcripcionales primarios y secundarios, así como a identificar varios nuevos genes de respuesta viral (GADD34, PUMA). Tras la infestación con virus que albergan proteínas M mutantes, resulta claro que la estimulación autocrina de la vía de señalización JAK/STAT por parte de IFN- β conduce a la producción de genes de respuesta secundaria, tal como IRF-7, que, a su vez, son críticos para la inducción terciaria de genes de IFN- α (Morin *et al.*, 2002, *J. Mol. Biol.*, 316:1009-1022). De hecho, el bloqueo por parte de la proteína M de transcritos secundarios y terciarios se puede superar expresando una versión de IRF-7 constitutivamente activa (a partir de un promotor viral), incluso en presencia de proteína M de tipo salvaje.

Una de las limitaciones de la terapia oncolítica puede ser la neutralización del virus por parte de anticuerpos pre-existentes, presentes en la población humana (Ikeda *et al.*, 1999, *Nature Medicine*, 5:881-887). El uso de un virus oncolítico, tal como VSV, el cual no es endémico en la población humana, debería proporcionar una significativa ventaja terapéutica. Mientras que en este estudio se encontró en algún instante una dependencia de la dosis a la actividad oncolítica (seis tratamientos son superiores a uno), presumiblemente ya que se desarrollan anticuerpos neutralizantes, dosis adicionales no proporcionan beneficio terapéutico alguno. Estos resultados sugieren que uno de los determinantes críticos para una terapia viral con éxito será el suministro eficaz al lugar del tumor antes del desarrollo de una respuesta inmune anti-viral. Probablemente será importante suministrar la dosis de virus máxima tolerable con la mayor frecuencia posible antes de la evolución de la respuesta anti-viral mediada por el hospedante.

La determinación de la dosis exacta requerida para pacientes individuales es bien conocida dentro de las capacidades de los médicos que trabajan en el sector y, por lo tanto, no es necesario discutir en esta memoria dosificaciones específicas.

5 En principio, podrían ser útiles estrategias que implicaran una inmunosupresión de los pacientes antes de la terapia vírica, pero se ha encontrado que un componente importante de la terapia oncolítica viral es una respuesta anti-tumor la cual se inicia por la expresión de proteínas virales en las superficies de células tumorales (datos no mostrados y Todo *et al.*, 1999, *Human Gene Therapy*, 10:2741-2755). Quizás otras estrategias, tales como la infusión de células infestadas con virus tal como se muestra en esta memoria, o el revestimiento con polímeros de preparaciones virales
10 (Fisher *et al.*, 2001, *Gene Ther.*, 8:341-348) proporcionarán una oportunidad de suministrar productos terapéuticos a sitios de tumores sin comprometer valiosas respuestas inmunes del hospedante.

Los datos presentados en esta memoria indican que durante la evolución del tumor se producen, con frecuencia, defectos en la señalización de interferones, teniendo una gran mayoría de las líneas de células en el panel NCI una
15 respuesta perjudicada. Datos acumulativos han indicado que el interferón es una citoquina multifuncional que puede regular de forma coordinada el desarrollo de la célula, la apoptosis y las vías antivirales. Quizás, durante la evolución del tumor, la selección de un desarrollo incesante y la pérdida de la apoptosis sobrepasa la necesidad ocasional de una actividad anti-viral.

20 De manera ideal, un virus oncolítico se replicará, de manera preferente, en células malignas, tendrá la capacidad de diseminarse desde el tumor primario a sitios de la metástasis y, en última instancia, será desalojado por parte del hospedante. En esta memoria se presenta una evidencia de que los virus AV1 y AV2 atenuados encarnan todos estos tratados y, debido a su capacidad de disparar respuestas antivirales en células normales, pueden estar excepcionalmente seguros *in vivo*. Hasta la fecha ha demostrado ser imposible seleccionar variantes de VSV que sean resistentes a los
25 efectos antivirales de los interferones (Novella *et al.*, 1996, *J. Virol.*, 70:6414-6417) y se ha demostrado la capacidad de estos mutantes inductores de IFN de proteger al hospedante en trans frente a una infestación con VSV WT (Figura 1D). Por lo tanto, es posible que en una población de virus, en la que la mayoría de las partículas son potentes inductores de interferón, es remota la posibilidad de que surja con dominancia una variante de tipo salvaje. La “nube de citoquinas” resultante, producida por la infestación con el virus inductor de IFN, protegería al hospedante de una cepa WT más
30 virulenta (véase la Figura 5). Sin embargo, no se veía afectado el exterminio del tumor, ya que estas células han demostrado ser defectuosas para responder a una “nube de citoquinas” de este tipo. Por ello, se incrementa el índice terapéutico, mejorando adicionalmente el potencial de los virus oncolíticos en calidad de agentes terapéuticos contra el cáncer.

35 Ejemplo 2

VSV's mutantes rescatados

40 Se construyó una serie de virus recombinantes para testar el intervalo de mutaciones que son útiles para la generación de mutantes inductores de interferón. Para este fin se creó una cadena principal que contenía los genes N, G y L del plásmido pXN-1 (Scnell MJ, Buoncore L, Whitt MA y Rose JK (1996) *J. Virology* 4, 2318-2323) y los genes P y M de AV1. Una vez creada una serie de virus que diferían solamente en sus genes M, sustituyendo secuencialmente variantes en el gen M tal como se muestra en las figuras acompañantes (Figuras 6 y 7). Por ejemplo, XNDG M4 contiene los genes N, G y L de pXN-1, el gen P de AV1 y un gen M con la metionina 51 suprimida. XNDG M5 alberga
45 un gen M que tiene una delección de cuatro aminoácidos de metionina 51.

Aspartato 52, treonina 53 e histidina 54 (Figura 7). Tal como muestran los autores de la invención en la Tabla 4 (que figura más abajo), estos dos mutantes son igualmente eficaces para exterminar tres líneas de células humanas de células tumorígenas como un mutante que se produce de forma natural (Mut2 o AV1) que tiene una metionina 51 convertida en una arginina (es decir, M51R). Dado que XNDG M4 y M5 son mutantes por delección, resultará mucho más difícil que estos virus recombinantes reviertan de nuevo al genotipo de metionina 51 original. Además, mientras que virus tratados mediante ingeniería siguen siendo capaces de exterminar eficazmente células tumorales, forman
50 pequeñas placas en células que responden a interferones, indicando que estos virus están atenuados para el desarrollo en células que no pueden responder a interferones (Figura 8).

Para ejecutar el ensayo de placa, se sembraron células Vero en placas de cultivo tisular de 60 mm de diámetro a una confluencia en aMEM + suero bovino al 10% y se permitió que se fijaran durante al menos 3 horas bajo condiciones de cultivo tisular normales. Se realizan diluciones en serie de la suspensión de virus de muestra a incrementos de semi-
60 log (p.ej. 10⁻⁴, 10⁻⁴ ½, 10⁻⁵, 10⁻⁵ ½, ... etc.) en aMEM exento de suero. Los medios se aspiraron de las placas de 60 mm, se añadieron 100 µl de suspensión de virus por cada placa y las placas se incubaron bajo condiciones de cultivo tisular normales durante 45 minutos. Tras la incubación durante 45 minutos, las placas se cubrieron con 3 ml de una mezcla 1:1 de agarosa al 1% + (2X aMEM + suero bovino fetal al 20%) a 42°C. Después, las placas se incubaron durante una noche y se hizo el recuento de las placas a la mañana siguiente.

65 Líneas de células OVCAR (una línea de células de cáncer de ovarios humana), 283T (una línea de células de riñón humanas transformada por el antígeno-T grande de SV 40) y U2OS (línea de células de osteosarcoma humana) se infestaron con virus AV1 (Mut2), XNDG M4 y XNDG M5 y se determinó la viabilidad de las células después

de un periodo de tiempo, utilizando el ensayo MTS según se describe más arriba. Los datos proporcionados en la Tabla 4 demuestran que VSVs mutantes rescatados tienen propiedades de exterminio similares en comparación con AV1.

TABLA 4

MOI requerida para exterminar el 50% de células en 48 horas, según se mide por el ensayo MTS

	AV1	XNDG M4	XNDG M5
OVCAR3	0,0096	0,0228	0,0105
293T	0,0096	0,0138	0,04056
U20S	0,03	0,0136	0,0156

Ejemplo 3

Proteínas de fusión de la proteína M de GFP

Cuando se condensa al extremo amino de la proteína fluorescente verde (GFP - siglas en inglés), el extremo amino de la proteína de la matriz (M) de VSV (aminoM + 72-GFP-N1) fija como objetivo esta proteína de fusión a las mitocondrias (Figuras 9 y 10). Los primeros 72 aminoácidos de la M de Indiana de VSV son capaces de fijar como objetivo a GFP. Una proteína de fusión iniciada en la metionina 33 (M33) es también capaz de fijar como objetivo GFP a las mitocondrias, mientras que los primeros 50 aminoácidos solos no son capaces. No se requiere metionina 51 (M51). Cuando se condensa al extremo C de la GFP, estas secuencias no fijan como objetivo la proteína de fusión a las mitocondrias, por lo tanto estas secuencias deben estar en el extremo amino de una proteína recombinante para ejecutar esta fijación.

Como se muestra en las Figuras 9 y 10, cuando una fusión entre los 72 aminoácidos amino-terminales y GFP (aminoM + 72-GFP-N1) se expresa transitoriamente en células cultivadas: 1) la proteína de fusión es fijada como objetivo a las mitocondrias, 2) las mitocondrias pierden la organización reticulotubular usual y se desmoronan en estructuras perinucleares punteadas que 3) pierden el potencial de la membrana. Estas son las características distintivas de una célula moribunda.

Se ha reconocido a la proteína de la matriz de VSV como una proteína tóxica que juega un papel en la citotoxicidad del virus. La transcripción de la proteína M se inicia en tres codones ATG alternativos (M1, M33 y M51) y un virus mutado en M33 y M51 de modo que no pueda producir las isoformas más cortas tiene una citotoxicidad significativamente reducida. Un virus que tiene una proteína M de VSV mutante, que ya no fija como objetivo las mitocondrias, será menos citotóxico.

Ejemplo 4

Protección contra la morbilidad inducida por VSV

Este estudio demuestra que VSV mutante (Δ M51) sistémicamente administrado puede proteger frente a una dosis intracraneal letal de VSV.

A grupos de ratones Balb/C hembras de 8 semanas de edad se les inyectaron por vía intravenosa (se les cebó) con PBS, VSV WT GFP (1e8 ufp) o VSV Δ M51 GFP (1e8 ufp). Veinticuatro horas más tarde, todos los ratones fueron inoculados intracranealmente con 2e7 ufp de VSV Δ M51 (en 5 μ l de PBS) y se les vigiló en cuanto a síntomas de morbilidad y parálisis.

Los resultados se presentan en las Figuras 17A y 17B. La Figura 17A proporciona una gráfica de supervivencia de Kaplan Meyer que demuestra que sobrevivió el 100% de ratones cebados con Δ M51, mientras que todos los ratones cebados con WT y PBS control desarrollaron una parálisis de las extremidades traseras y fueron eutanizados. La Figura 17B es una gráfica de los pesos de los ratones a lo largo del tiempo, tras tratamiento intravenoso. Los ratones cebados con Δ M51 no mostraron pérdida de peso alguna, mientras que los ratones WT y PBS control mostraron una pérdida de peso extrema antes de la eutanasia.

ES 2 319 424 T3

Ejemplo 5

Producción de interferón tras infestación con VSV

5 Los datos que se presentan en este estudio demuestran que las células infestadas con VSV mutante secretaban IFN- α e IFN- β , mientras que las células infestadas con VSV WT no producían IFN- α e IFN- β , o lo hacían en cantidades mucho menores.

Interferón- β

10 Células OVCAR4, CAKI-1 y HOP62 fueron infestadas (MOI de 10 ufp) con cepas de VSV WT o mutante. Las células infestadas fueron analizadas mediante ELISA para la producción de IFN- β 10 horas post-infestación. Células infestadas con AV1 y AV2 y células no infestadas con VSV WT producen IFN- β secretado. El ELISA se realizó utilizando un kit de detección de IFN- β humano comercialmente disponible (TFB INC; Tokio, Japón). Los resultados de este estudio se muestran gráficamente en la Figura 18.

15 Las tres líneas de células son todos cánceres humanos que se seleccionaron para este estudio, ya que caen en el 20% de cánceres que en cierta medida responden a interferones. OVCAR son células de cáncer de ovarios, HOP62 son células de cáncer de pulmón y CAKI-1 son cánceres renales. En cada caso, las células fueron infestadas según se describe en el ensayo MTS (véase el Ejemplo 1).

Interferón- α

25 Se analizaron los niveles de IFN- α en suero de ratones utilizando un kit ELISA de Interferón-Alfa de ratón (PBL Biomedical). A ratones Balb/C hembras (de 10 semanas de edad; Charles River) se les inyectaron por vía intravenosa PBS ó 1×10^8 ufp de GFP WT o GFP AV3 (en donde AV3 es una versión tratada mediante ingeniería de VSV, en donde la metionina 51 ha sido suprimida por completo) diluida en PBS. A los instantes post-infestación indicados se recogió sangre de la vena sáfena de cada uno de los ratones en tubos heparinizados y se centrifugó para obtener suero. Para cada muestra $5 \mu\text{l}$ de suero se diluyeron en $95 \mu\text{l}$ de PBS y se analizaron siguiendo las instrucciones del fabricante. Los resultados proporcionados en la Tabla 5 que figura más abajo demuestran que los ratones infestados con el ΔM51 producían IFN- α en una fase más temprana y en mayores cantidades que los ratones infestados con VSV WT. Los ratones nativos no producían cantidades detectables de IFN- α .

TABLA 5

Interferón- α en el suero (pg/ml)

Tiempo (h)	Nativo (n = 2)	WT (n = 3)	ΔM51 (n = 3)
0	neg.	neg.	neg.
1	neg.	neg.	559 ± 116
6	neg.	8197 ± 2726	25.213 ± 322
neg. = por debajo del nivel de detección del ensayo (< 200 pg/ml); tiempo se refiere a horas post-infestación			

Ejemplo 6

55 Se encontró que el tratamiento *in vivo* de ratones con $\Delta\text{51-VSV}$ aumentaba drásticamente la lisis de dianas de células tumorales CT26 mediada por linfocitos T citotóxicos (CTL - siglas en inglés), en comparación con la lisis por parte de esplenocitos procedentes de ratones portadores de tumores y no tratados con VSV.

60 Ratones Balb/c con tumores subcutáneos de CT26 establecidos fueron tratados, por vía intravenosa, con o sin 5×10^8 ufp de $\Delta\text{M51-VSV}$. Al cabo de 7 días, se recolectaron los esplenocitos y se cultivaron en una relación 5:1 con células tumorales CT26 irradiadas. Después de 7 días de estimulación *in vitro* se analizaron los esplenocitos en cuanto a actividad de CTL anti-CT26. Los resultados de este estudio se representan gráficamente en la Figura 19A, en la que se representa el % de lisis específica para tumores por encima del fondo de lisis espontánea de células tumorales diana CT26 en ausencia de esplenocitos efectoras frente a la relación efector:diana (las células diana son las células tumorales, los esplenocitos son las células efectoras o exterminadoras).

65 También se observaron diferencias cualitativas en las respuestas inmunes provocadas por virus WT o ΔM51 . Ratones Balb/c fueron tratados, por vía intravenosa, con 5×10^8 ufp de VSV de tipo salvaje o Δ51 , y al cabo de 7 días se

recolectaron los esplenocitos y se co-cultivaron con células tumorales CT26 irradiadas. Después de 7 días en cultivo, los esplenocitos se analizaron en cuanto a la lisis contra células CT26, con o sin un agotamiento previo de células NK con perlas magnéticas conjugadas con anticuerpos. El tratamiento de los ratones con VSV tanto de tipo salvaje como con Δ M51-VSV, cebó a los esplenocitos para la potente generación de respuesta inmune primaria a antígenos tumorales CT26 *in vitro*, sin exposición previa *in vivo* a los antígenos tumorales durante la infestación viral. Esto indica que la terapia con VSV ceba a los esplenocitos *in vivo* para la subsiguiente generación de la respuesta primaria *in vitro* contra antígenos nuevos. La actividad lítica contra células CT26 tras una terapia con VSV de tipo salvaje era dependiente de NK. La actividad lítica contra células CT26 tras una terapia con Δ M51-VSV fue mediada por CTL, lo que indica eventos de cebado inmunológicos cualitativamente distintos tras una terapia con Δ M51-VSV frente a VSV WT. Estos resultados se representan en la Figura 19B. Estos datos sugieren también la superior capacidad de Δ M51-VSV para provocar potentes respuestas inmunes adaptativas (lisis mediada por células T CD8+) con un potencial para el desarrollo de una memoria inmunológica protectora, en contraposición con una infestación de tipo salvaje que generaba un mecanismo efector mediado por células NK, fundamentalmente innato, contra células CT26.

Este estudio demuestra que el virus mutante induce una respuesta cualitativamente diferente a la del virus de tipo salvaje. La inducción de células CTL en este ensayo sólo se observa con el virus mutante. La respuesta por parte de CTL también será una respuesta protectora a largo plazo, mientras que la respuesta por NK no tendrá memoria. La inducción de esta respuesta diferenciada es posiblemente atribuible a la inducción de citoquinas por parte del virus mutante.

Ejemplo 7

Tinción inmunohistoquímica de tumores tratados con VSV mutante

Con el fin de estudiar el efecto de VSV mutante sobre tumores, ratones Balb/c, portadores de tumores CT26 subcutáneos, fueron tratados por vía intravenosa con GFP de Δ M51-VSV. Al cabo de 2, 5 u 8 días, se eutanizó a los ratones y los tumores fueron congelados instantáneamente y posteriormente seccionados ($5 \mu\text{m}$) y fueron teñidos inmunohistoquímicamente para VSV, caspasa 3 activa y CD45, un marcador de panleucocitos. En este estudio se utilizaron técnicas convencionales. En la Figura 20 se muestran fotografías de las secciones teñidas. La mancha positiva es de color pardo, mientras que todos los núcleos se tiñen de azul con hematoxilina. La tinción H&E muestra la morfología del tumor (la tinción H&E es una mancha no específica que muestra la estructura global del tumor).

La tinción inmunohistoquímica de tumores tratados con VSV mutante reveló una apoptosis masiva y la acumulación de leucocitos. Este estudio demuestra que VSV mutante es un excelente agente oncolítico, ya que induce la muerte de células tumorales que incluso no habían sido infestadas (es decir, células caspasa 3+ que han sufrido apoptosis). Aun cuando no se pretende estar ligado por la teoría, esto es probable, ya que de nuevo el virus mutante indica la producción de citoquinas citotóxicas que exterminan células tumorales antes que el virus infestante. Además, el virus mutante recluta leucocitos (células CD45+) que pueden infiltrarse y atacar al tumor. Las células CD45+ penetran después de las células infestadas con el virus mutante, de nuevo en respuesta a las citoquinas inducidas por la infestación con virus de células tumorales.

ES 2 319 424 T3

REIVINDICACIONES

1. Un virus de la estomatitis vesicular (VSV) mutante que tiene la mutación $\Delta M51$ en la proteína de la matriz (M).
- 5 2. El VSV mutante de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende una o más mutaciones seleccionadas del grupo que consiste en $\Delta M51-54$, $\Delta M51-57$, V221F, S226R, $\Delta V221-S226$, V221X, S226X, o una combinación de las mismas.
- 10 3. El VSV mutante de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende una o más mutaciones seleccionadas del grupo que consiste en $\Delta M51/V221F$; $\Delta M51-54/V221F$; $\Delta M51-57/V221F$, $\Delta M51/S226R$, $\Delta M51-54/S226R$ y $\Delta M51-57/S226R$.
- 15 4. El VSV mutante de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende una o más mutaciones seleccionadas del grupo que consiste en $\Delta M51/V221F/S226R$; $\Delta M51-54/V221F/S226R$ y $\Delta M51-57/V221F/S226R$.
5. Un vector viral que comprende un VSV mutante de acuerdo con cualquier reivindicación precedente.
6. El vector viral de acuerdo con la reivindicación 5, que comprende, además, un ácido nucleico heterólogo.
- 20 7. Un vector de vacuna que comprende un VSV mutante de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4 y un ácido nucleico heterólogo que codifica uno o más antígenos.
8. Un adyuvante de vacuna que comprende un VSV mutante de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4 y, opcionalmente, un soporte farmacéuticamente aceptable.
- 25 9. Un agente oncolítico que comprende un VSV mutante de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4 y, opcionalmente, un soporte farmacéuticamente aceptable.
- 30 10. Una composición farmacéutica que comprende un VSV mutante de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4 y un soporte farmacéuticamente aceptable.
11. Una composición inmunogénica que comprende un VSV mutante de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4 y un soporte farmacéuticamente aceptable.
- 35 12. Uso del VSV mutante de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4 en calidad de un aditivo para preparaciones farmacéuticas de virus para la protección frente a revertantes virulentos que surgen en dicha preparación.
13. Uso del VSV mutante de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad o trastorno que puede ser aliviado por la liberación de citoquinas.
- 40 14. El uso de acuerdo con la reivindicación 13, en donde dicha enfermedad o trastorno es cáncer, infección bacteriana, infección viral o infección por hongos.
- 45 15. Un kit que comprende uno o más recipientes y un VSV mutante de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4.

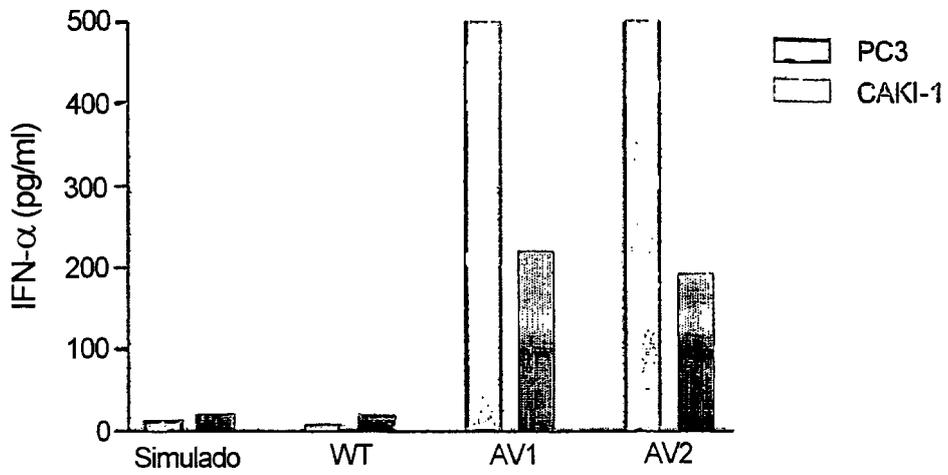
50

55

60

65

A



B

	<i>DL50(ufp)</i>		
	WT	AV1	AV2
<i>IN</i>			
Balb/c	1×10^4	3×10^8	2.5×10^8
CD-1	1×10^8	2×10^8	nd
<i>IV</i>			
CD-1	1×10^8	8×10^9	nd

C

	<i>UFP</i>	<i>Morbidez</i>	<i>Mortalidad</i>
VSV WT	10^1	3/3	3/3
AV2	10^7	0/3	0/3
AV@(10^6) + VSV WT	10^1	0/3	0/3
	10^2	0/3	0/3
	10^3	0/3	0/3

FIGURA 1A-C

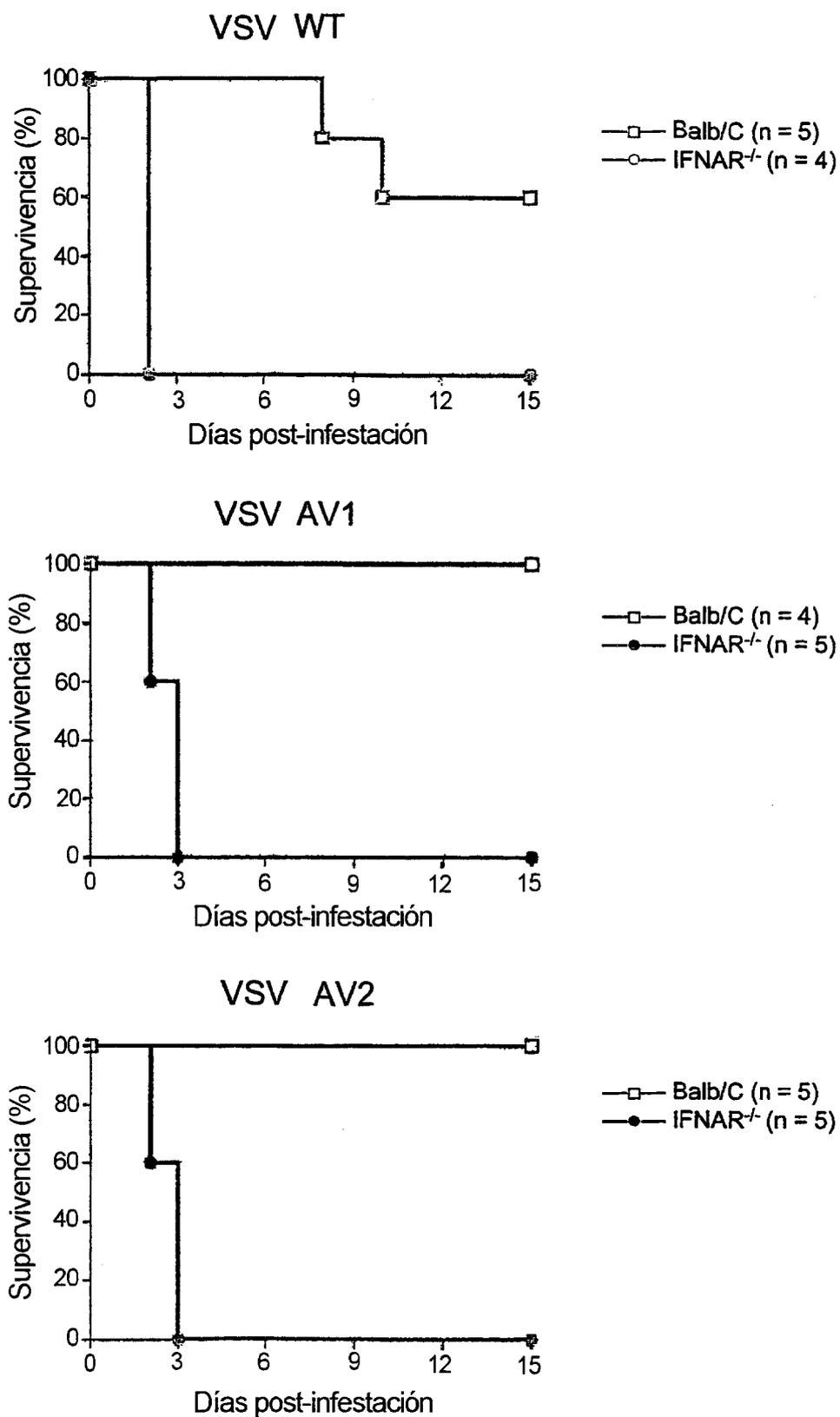


FIGURA 1D

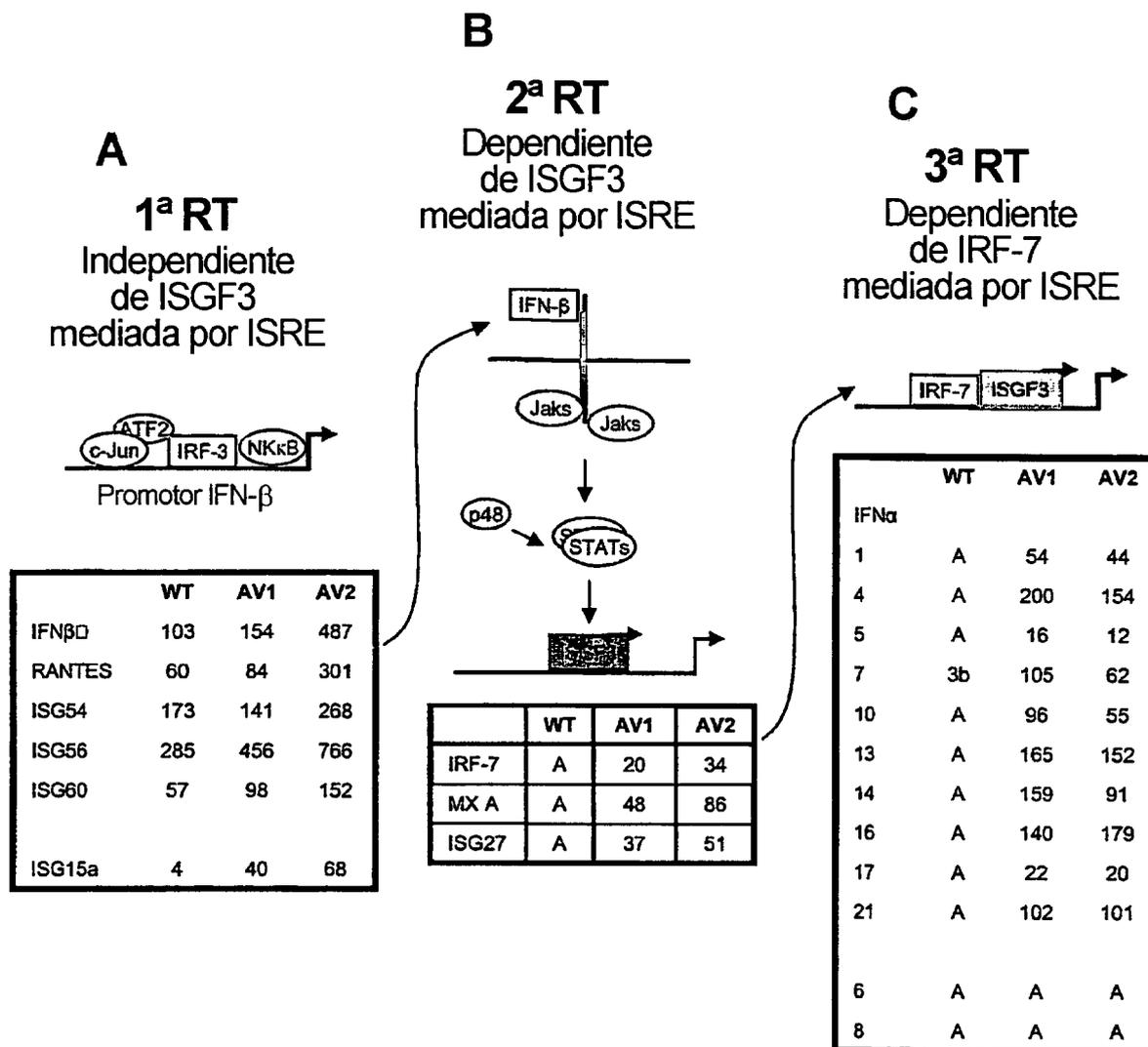


FIGURA 2A-C

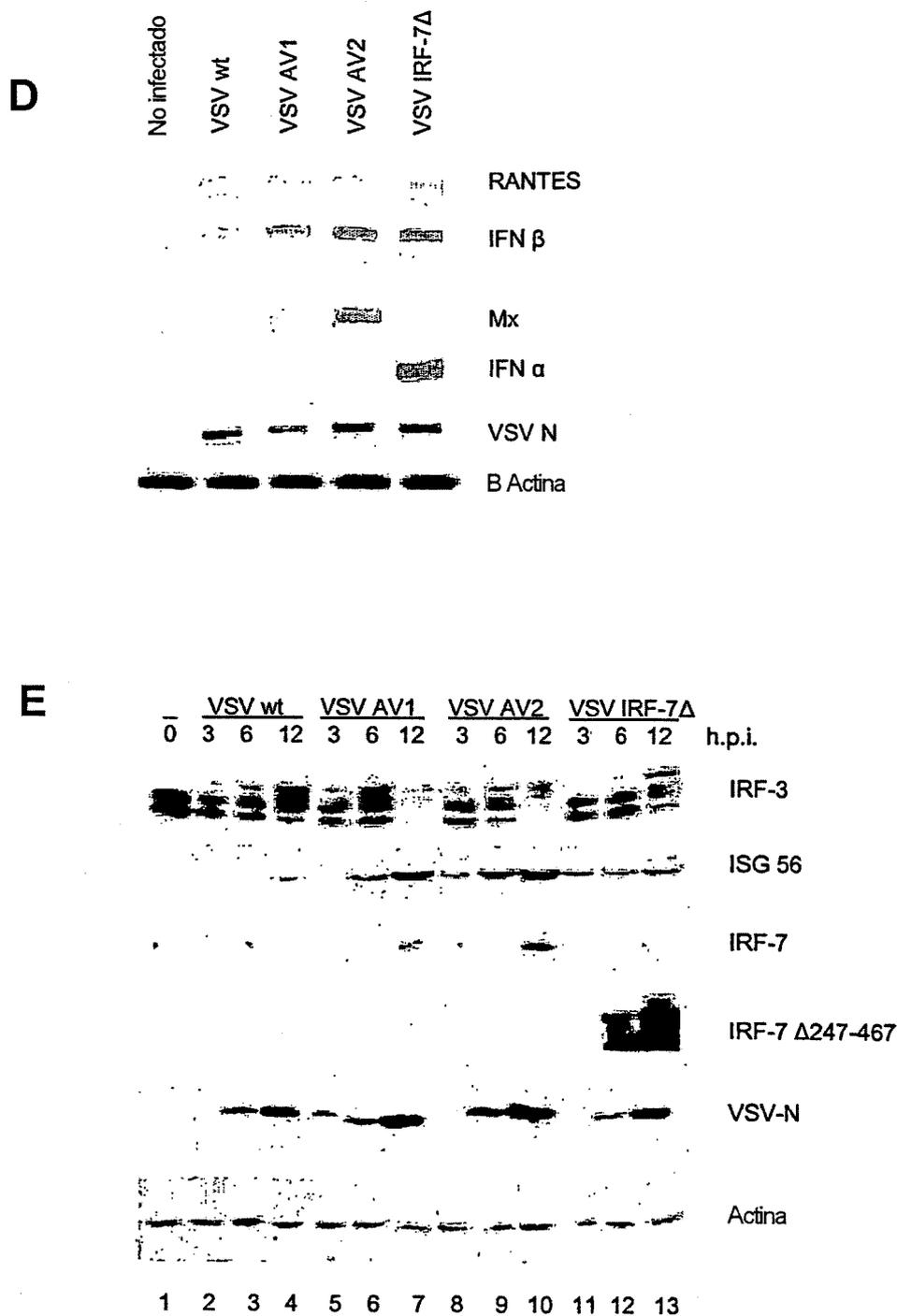


FIGURA 2D-E

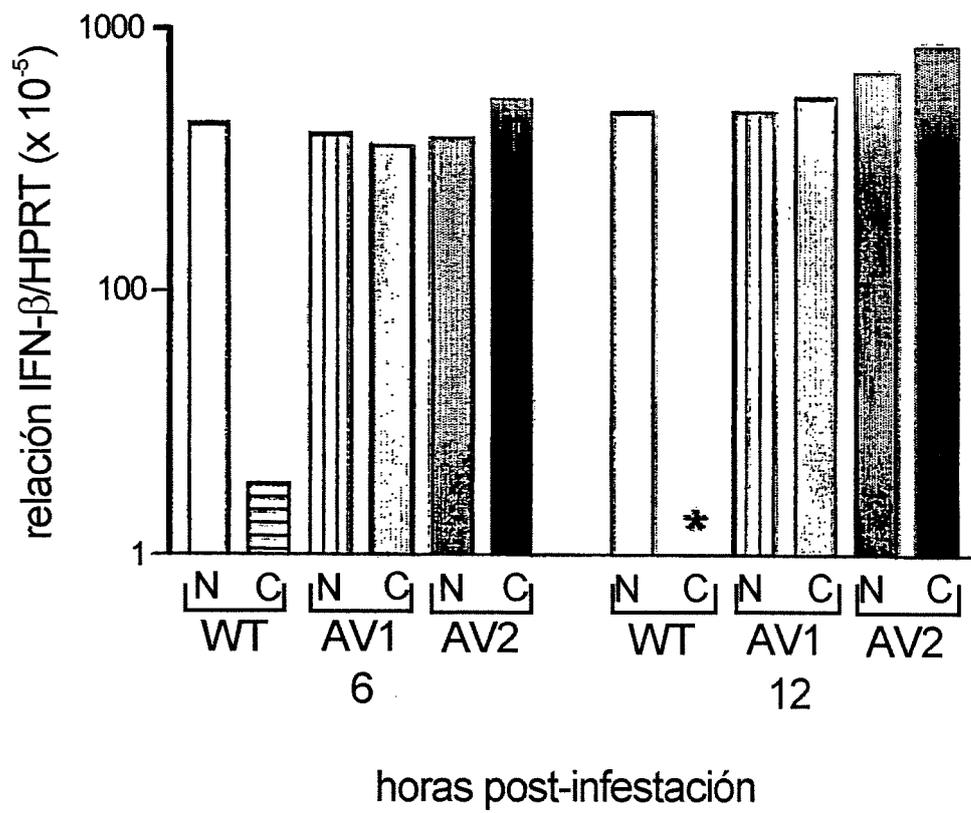


FIGURA 3

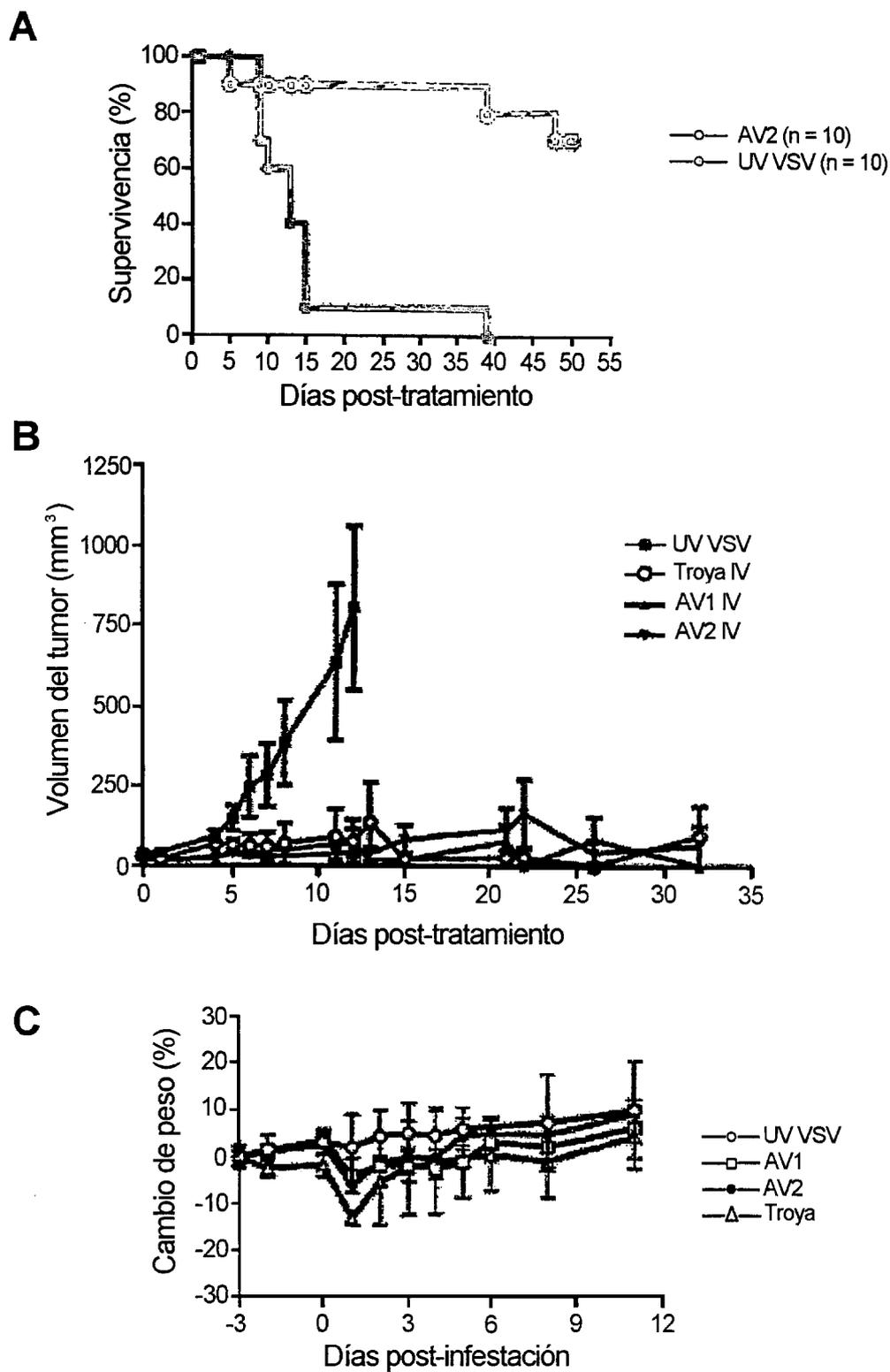
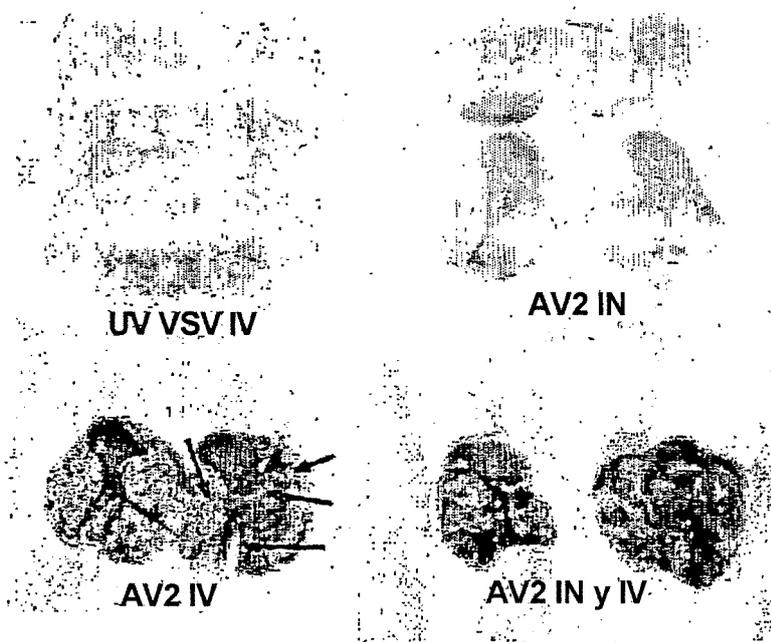


FIGURA 4A-C

D



E

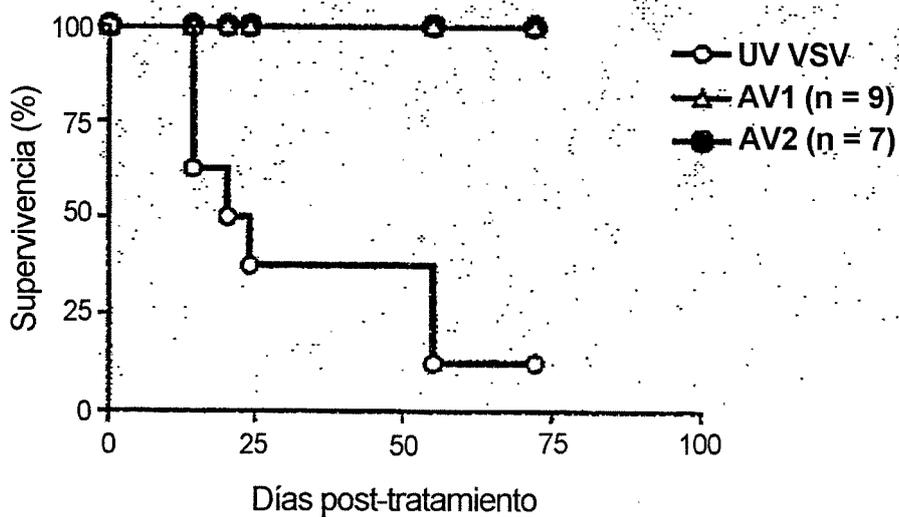
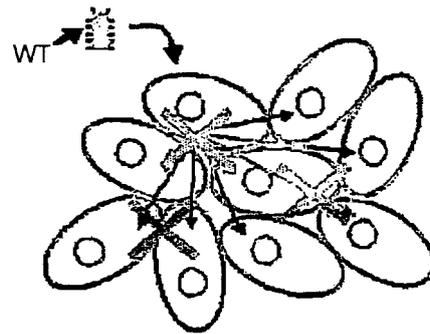


FIGURA 4D-E

A



B

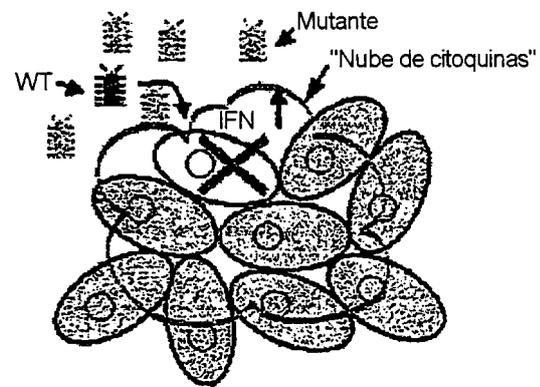
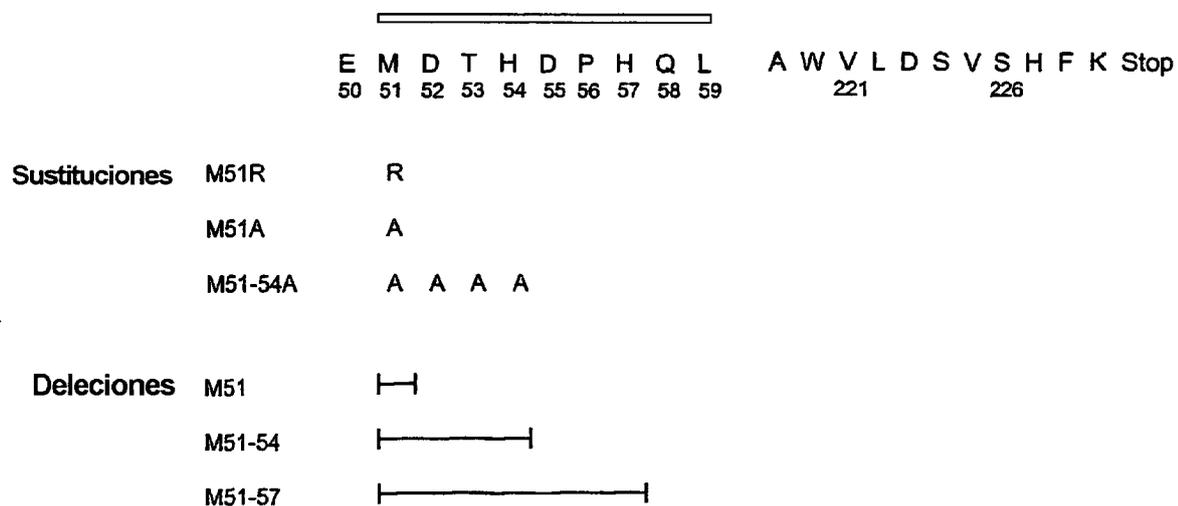


FIGURA 5



Mutantes similares a Mut2

M51R
M51A
M51-54A
ΔM51
ΔM51-54
ΔM51-57

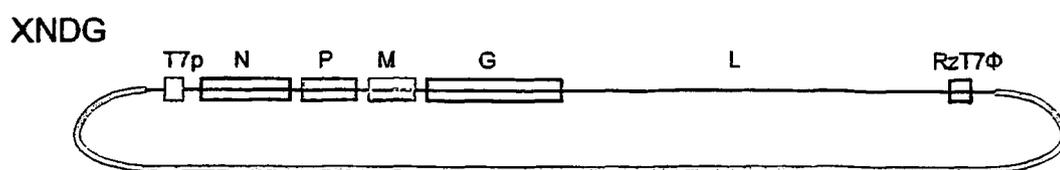
Mutantes similares a Mut3

V221F S226R
*S226R
*V221F
*ΔV221-S226

Mutantes compuestos

M51R & V221F S226R
M51A & V221F S226R
M51-54A & V221F S226R
ΔM51 & V221F S226R
ΔM51-54 & V221F S226R
ΔM51-57 & V221F S226R

FIGURA 6



XNDG

—————
 E M D T H D P H Q L
 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59

XNDG M4

—————
 E X D T H D P H Q L
 50 52 53 54 55 56 57 58 59

XNDG M5

—————
 E X X X X D P H Q L
 50 55 56 57 58 59

FIGURA 7

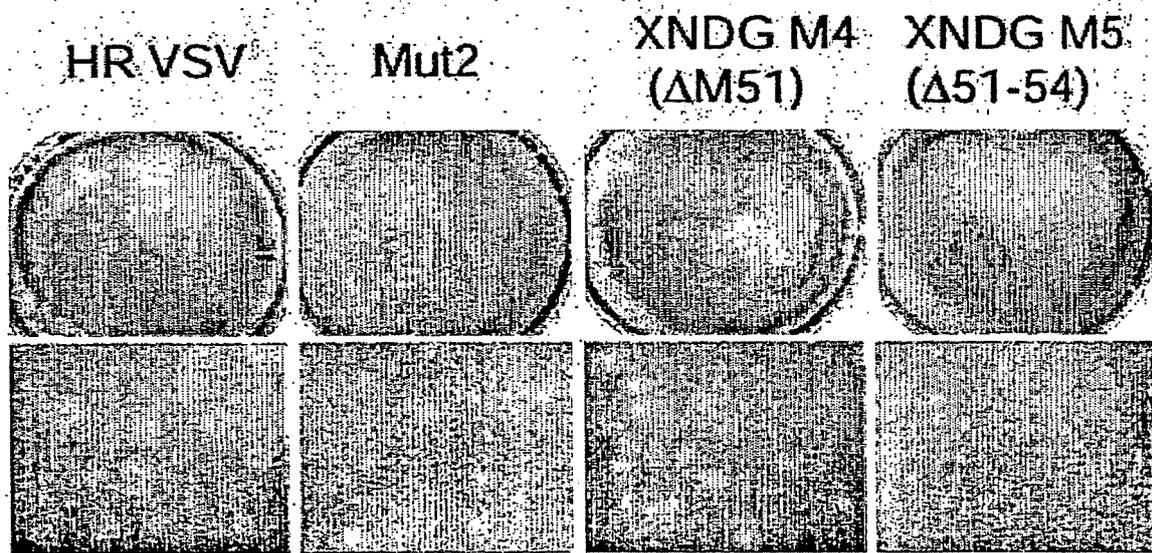


FIGURA 8

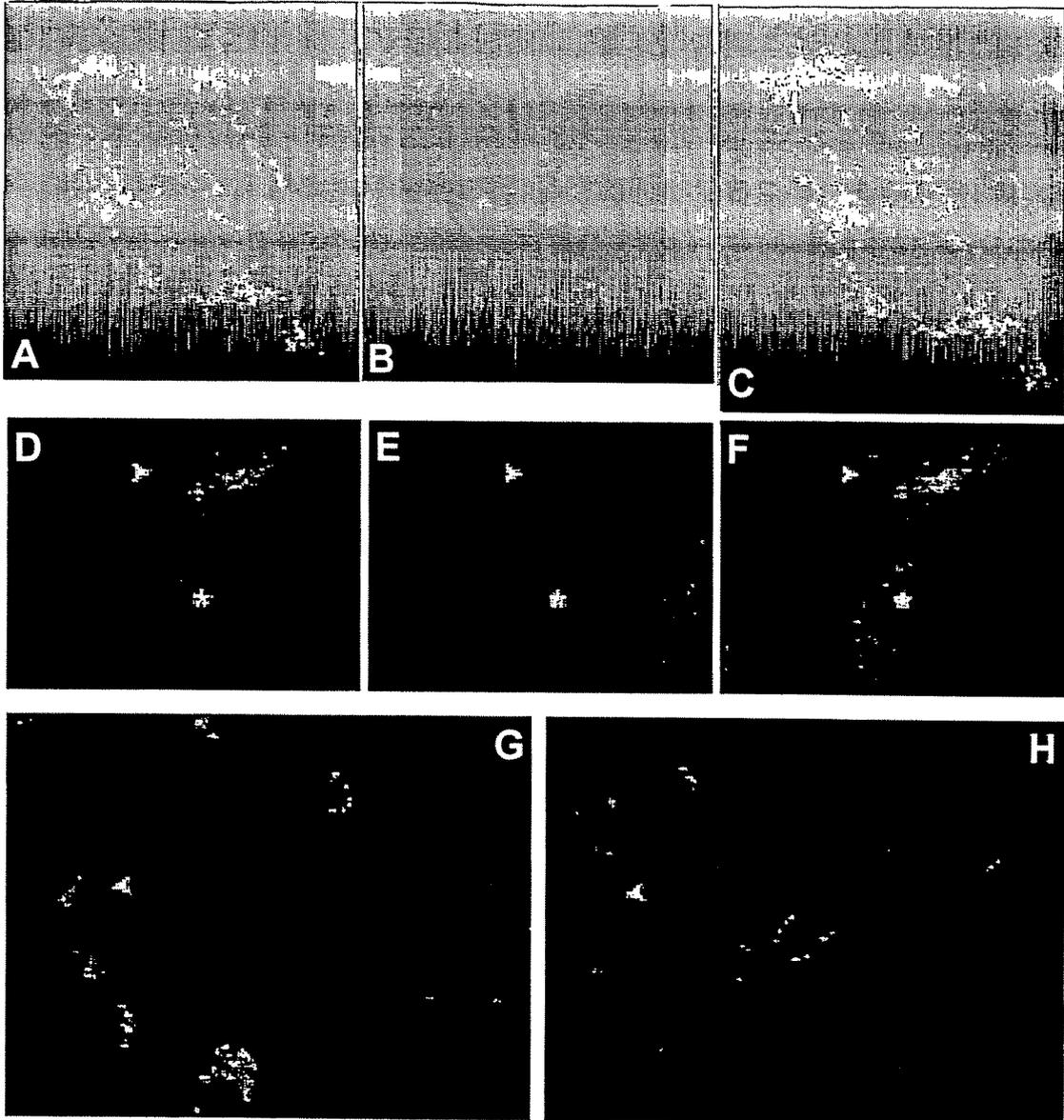


FIGURA 9A-H

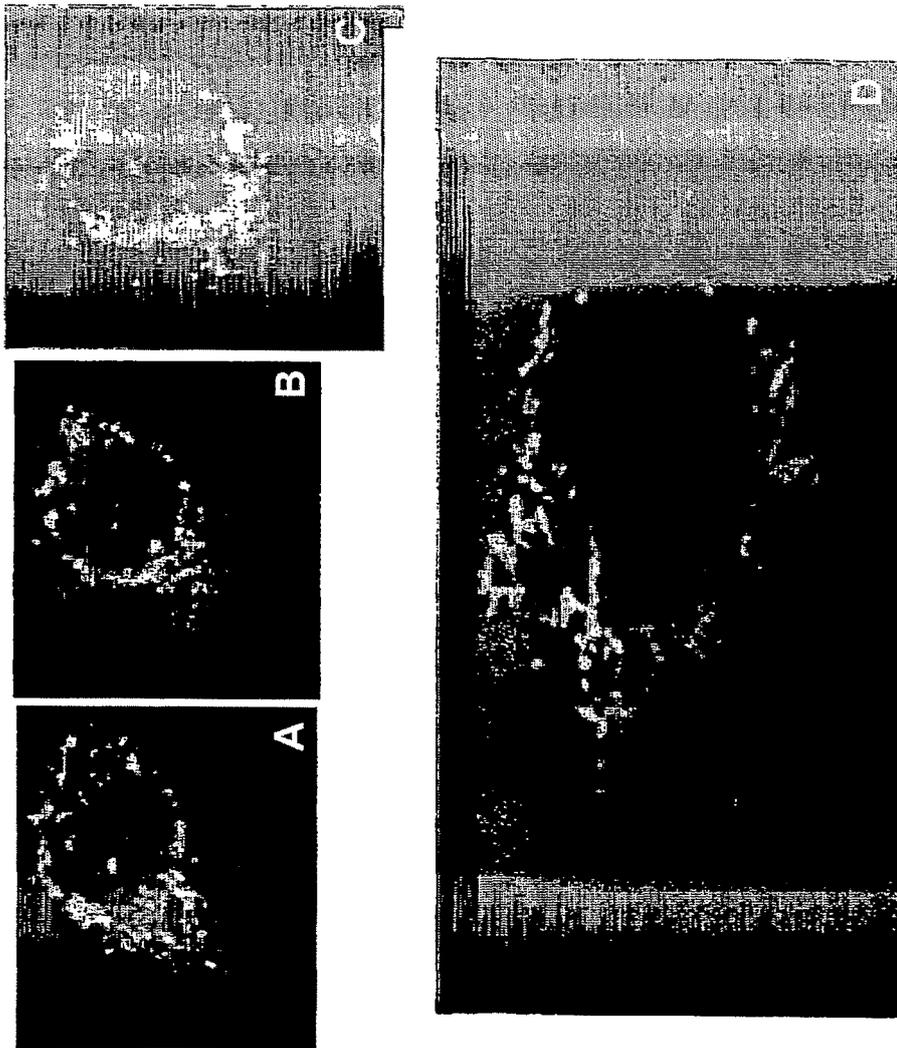


FIGURA 10

Secuencia del genoma para el mutante de VSV AV1

ACGAAGACAAACAAACCAATTATTATCATTTAAAAGGCTCAGGAGAACTTTAACAGTAATCAAAATGTCTGTT
 ACAGTCAAGAGAATCATTTGACAACACAGTCATAGTTCCAAAACCTTCTTGCAAATGAGGATCCAGTGGAAATAC
 CCGGCAGATTACTTCAGAAAATCAAAGGAGATTCTCTTTACATCAATACTACAAAAAGTTTGTTCAGATCTA
 AGAGGATATGTCTACCAAGGCCTCAAATCCGGAAATGTATCAATCATACATGTCAACAGCTACTTGTATGGA
 GCATTGAAGGACATCCGGGGTAAGTTGGATAAAGATTGGTCAAGTTTTCGGAATAAACATCGGGAAGGCAGGG
 GATACAATCGGAATATTTGACCTTGTATCCTTGAAAGCCCTGGACGGTGTACTTCCAGATGGAGTATCCGGAT
 GCTTCCAGAACCAGCGCAGATGACAAATGGTTGCCCTTTGTATCTACTTGGCTTATACAGAGTGGGCAGAAAC
 CAAATGCCCTGAATACAGAAAAGGCTCATGGATGGGCTGACAAATCAATGCAAAAATGATCAATGAACAGTTT
 GAACCTCTTGTGCCAGAAGGTCGTGACATTTTGTATGTGTGGGGAAATGACAGTAATTACACAAAAATTGTC
 GCTGCAGTGGACATGTTCTTCCACATGTTCAAAAAACATGAATGTGCCTCGTTCAGATACGGAACATAATTGT
 TCCAGATTCAAAGATTGTGCTGCATTGGCAACATTTGGACACCTCTGCAÁAATAACCGGAATGTCTACAGAA
 GATGTAACGACCTGGATCTTGAACCGAGAAGTTCAGATGAGATGGTCCAAATGATGCTTCCAGGCCAAGAA
 ATTGACAAGGCCGATTTCATACATGCCCTTATTTGATCGACTTTGGATTGTCTTCTAAGTCTCCATATCTTCC
 GTCAAAAACCTTGCTTCCACTTCTGGGGGCAATTGACAGCTCTTCTGCTCAGATCTACCAGAGCAAGGAAT
 GCCCGACAGCCTGATGACATTGAGTATACATCTCTTACTACAGCAGGTTTGTGTACGCTTATGCAGTAGGA
 TCCTCTGCTGACTTGGCACAACAGTTTTGTGTTGGAGATAGCAAATACACTCCAGATGATAGTACCGGAGGA
 TTGACGACTAATGCACCGCCACAAGGCAGAGATGTGGTGAATGGCTCGGATGGTTTGAAGATCAAAACAGA
 AAACCGACTCCTGATATGATGCAGTATGCGAAACGAGCAGTCATGTCACTGCAAGGCCAAGAGAGAAGACA
 ATTGGCAAGTATGCTAAGTCAGAAATTTGACAAATGACCCTATAATTCTCAGATCACCTATTATATATTATGC
 TACATATGAAAAAACTAACAGATATCATGGATAATCTCACAAAAGTTTCGTGAGTATCTCAAGTCTATTCTC
 CGTCTAGATCAGGCGGTAGGAGAGATAGATGAGATCGAAGCACAAACGAGCTGAAAAGTCCAATTATGAGTTG
 TTCCAAGAGGACGGAGTGAAGAGCATACTAGGCCCTCTTATTTTTCAGGCAGCAGATGATTTCTGACACAGAA
 TCTGAACCAGAAATTGAAGACAATCAAGGCTTGTATGTACCAGATCCGGAAGCTGAGCAAGTTGAAGGCTTT
 ATACAGGGGCTTTAGATGACTATGCGGATGAGGACGTGGATGTTGTATTCACTTCGGACTGGAAACAGCCT
 GAGCTTGAATCCGACGAGCATGGAAAGACCTTACGGTTGACATTGCCAGAGGGTTAAGTGGAGAGCAGAAA
 TCCCAGTGGCTTTTGTACGATTAAGCAGTCGTTCAAAGTGCCAAACACTGGAATCTGGCAGAGTGCACATTT
 GAAGCATCGGGAGAAGGGGTTCATCAAAAAAGCGCCAGATAACTCCGGATGTATATAAGGTCACTCCAGTG
 ATGAACACACATCCGTCCCAATCAGAAGCCGTATCAGATGTTTGGTCTCTCTCAAAGACATCCATGACTTTC
 CAACCAAGAAAGCAAGTCTTCAGCCTCTCACCATATCCTTGGATGAATTGTTCTCATCTAGAGGAGAATTC
 ATCTCTGTGCGGAGGTAACGGACGAATGTCTCATAAAGAGGCCATCCTGCTCGGTCTGAGGTACAAAAAGTTG
 TACAATCAGGCGAGAGTCAAATATCTCTGTAGACTATGAAAAAAGTAACAGATATCACAATCTAAGTGT
 ATCCCAATCCATTTCATCATGAGTTCCCTTAAAGAAGATTCTCGGTCTGAAGGGGAAAGGTAAGAAATCTAAGA
 AATTAGGGATCGCACCCCTTATGAAGAGGACACTAACATGGAGTATGCTCCGAGCGCTCCAATTGACA
 AATCCTATTTTGGAGTTGACGAGAGGGACACTCATGATCCGCATCAATTAAGATATGAGAAATCTTCTTTA
 CAGTGAATAATGACGGTTAGATCTAATCGTCCGTTTCAAGACATACTCAGATGTGGCAGCCGCTGTATCCCAT

FIGURA 11

GGGATCACATGTACATCGGAATGGCAGGGAAACGTCCCTTCTACAAGATCTTGGCTTTTTTGGGTTCTTCTA
 ATCTAAAGGCCACTCCAGCGGTATTGGCAGATCAAGGTCAACCAGAGTATCACGCTCACTGTGAAGGCAGGG
 CTTATTTGCCACACAGAATGGGGAAGACCCCTCCCATGCTCAATGTACCAGAGCACTTCAGAAGACCATTCA
 ATATAGGTCTTTACAAGGGAAACGGTTGAGCTCACAAATGACCATCTACGATGATGAGTCACTGGAAGCAGCTC
 CTATGATCTGGGATCATTTCATTTCTTCCAAATTTTCTGATTTTCAGAGAGAAGGCCTTAATGTTTGGCCTGA
 TTGTCGAGAAAAAGGCATCTGGAGCTTGGGTCTGGATTCTGTCCAGCCACTTCAAATGAGCTAGTCTAGCTT
 CCAGCTTCTGAACAATCCCGGTTTACTCAGTCTCTCTTAATTCAGCCCTTTCGAACAACTAATATCCTGTCT
 TTTTCTATCCCTATGAAAAAACTAACAGAGATCGATCTGTTTCTTGACACCATGAAGTGCCTTTTGTACT
 TAGCTTTTTTATTTCATCGGGGTGAATTGCAAGTTCACCATAGTTTTTCCATACAACCGAAAAGGAACTGGA
 AAAATGTTCTTCCAATTACCATATTGCCCCGTCAAGCTCAGATTTAAATGGCATAATGACTTAATAGGCA
 CAGCCTTACAAGTCAAAATGCCCAAGAGTCACAAGGCTATTCAAGCAGACGGTTGGATGTGTCAATGCTTCCA
 AATGGGTCACTACTTGTGATTTCCGCTGGTACGGACCGAAGTATATAACACATTCATCCGATCCTTCACTC
 CATCTGTAGAACAATGCAAGGAAAGCATTGAACAAACGAAACAAGGAACCTGGCTGAATCCAGGCCTCCCTC
 CTCAAAGTTGTGGATATGCAACTGTGACGGATGCTGAAGCAGCGATTGTCCAGGTGACTCCTCACCATGTGC
 TTGTTGATGAATACACAGGAGAATGGGTTGATTACAGTTCATCAACGGAAAATGCAGCAATGACATATGCC
 CCACTGTCCATAACTCCACAACCTGGCATTCCGACTATAAGGTCAAAGGGCTATGTGATTTCTAACCTCATTT
 CCATGGACATCACCTTCTTCTCAGAGGACGGAGAGCTATCATCCCTAGGAAAGGAGGGGCACAGGGTTCAGAA
 GTAACACTTTTGCTTATGAAACTGGAGACAAGGCCTGCAAAATGCAGTACTGCAAGCATTTGGGGAGTCAGAC
 TCCCATCAGGTGTCTGGTTCCGAGATGGCTGATAAGGATCTCTTTGCTGCAGCCAGATTCCTGAATGCCAG
 AAGGGTCAAGTATCTCTGCTCCATCTCAGACCTCAGTGGATGTAAGTCTCATTCAAGGACGTTGAGAGGATCT
 TGGATTATTTCCCTCTGCCAAGAAACCTGGAGCAAAATCAGAGCGGGTCTTCCCATCTCTCCAGTGGATCTCA
 GCTATCTTGCTCCTAAAAACCCAGGAACCGGTCTGTCTTTACCATAATCAATGGTACCCTAAAATACTTTG
 AGACCAGATACATCAGAGTCGATATTGCTGCTCCAATCCTCTCAAGAATGGTCGGAATGATCAGTGGAACTA
 CCACAGAAAGGGAACTGTGGGATGACTGGGCTCCATATGAAGACGTGGAAATTTGGACCCAATGGAGTTCTGA
 GGACCAGTTCAGGATATAAGTTTCTTTATATATGATTGGACATGGTATGTTGGACTCCGATCTTCACTTA
 GCTCAAAGGCTCAGGTGTTTGAACATCCTCACATTCAAGACGCTGCTTCGCAGCTTCTGATGATGAGACTT
 TATTTTTTGGTGATACTGGGCTATCCAAAATCCAATCGAGTTTGTAGAAGGTTGGTTCAGTAGTTGGAAGA
 GCTCTATTGCCTCTTTTTTCTTTATCATAGGGTTAATCATTGGACTATTCTTGGTTCCTCCAGTTGGTATTT
 ATCTTTGCATTAAATTAAGCACACCAAGAAAAGACAGATTTATAACAGACATAGAGATGAACCGACTTGGGA
 AGTAACTCAAATCCTGCACAACAGATTCTTCATGTTTGAACCAAATCAACTTGTGATATCATGCTCAAAGAG
 GCCTTAATTATATTTTAATTTTAAATTTTATGAAAAAACTAACAGCAATCATGGAAGTCCACGATTTTGA
 GACCGACGAGTTCAATGATTTCAATGAAGATGACTATGCCACAAGAGAATTCCTGAATCCCGATGAGCGCAT
 GACGTAATTGAATCATGCTGATTACAATTTGAATTTCTCTTAATTAGTGATGATATTGACAATTTGATCAG
 GAAATTCAAATTTCTTCCGATTCCTCGATGTGGGATAGTAAGAACTGGGATGGAGTTCCTGAGATGTTAAC
 ATCATGTCAAAGCCAATCCCATCTCAACATCTCAGATGCATAAATGGATGGGAAGTTGGTTAATGTCTGATAA
 TCATGATGCCAGTCAAGGGTATAGTTTTTTTACATGAAGTGGACAAAGAGGCAGAAATAACATTTGACGTGGT

FIGURA 11 continúa

GGAGACCTTCATCCGCGGCTGGGGCAACAAACCAATTGAATACATCAAAAAGGAAAGATGGACTGACTCATT
CAAAATTCTCGCTTATTTGTGTCAAAAGTTTTTGGACTTACACAAGTTGACATTAATCTTAAATGCTGTCTC
TGAGGTGGAATTGCTCAACTTGGCGAGGACTTTCAAAGGCAAAGTCAGAAGAAGTTCTCATGGAACGAACAT
ATGCAGGCTTAGGGTTCCCAGCTTGGGTCTACTTTTTATTTCAGAAGGATGGGCTTACTTCAAGAACTTGA
TATTTCTAATGGACCGAACTTTCTGTTAATGGTCAAAGATGTGATTATAGGGAGGATGCAAACGGTGCTATC
CATGGTATGTAGAATAGACAACCTGTTCTCAGAGCAAGACATCTTCTCCCTTCTAAATATCTACAGAATTGG
AGATAAAATTGTGGAGAGGCAGGGAAATTTTTCTTATGACTTGATTAAAATGGTGGAAACCGATATGCAACTT
GAGGCTGATGAAATTAGCAAGAGAATCAAGGCCTTTAGTCCCACAATTCCCTCATTTTTGAAAATCATATCAA
GACTTCTGTTGATGAAGGGGCAAAAATTGACCGAGGTATAAGATTCTCCATGATCAGATAATGAGTGTGAA
AACAGTGGATCTCACACTGGTGTATTTATGGATCGTTCAGACATTGGGGTCATCCTTTTATAGATTATTACGC
TGGACTAGAAAATTAACATTCCCAAGTAACCATGAAGAAAGATATTGATGTGTATATGCAAAAAGCATTGC
AAGTGATTTAGCTCGGATTGTTCTATTTCAACAGTTCAATGATCATAAAAAGTGGTTTCGTGAATGGAGACTT
GCTCCCTCATGATCATCCCTTTAAAAGTCATGTTAAAGAAAATACATGGCCACAGCTGCTCAAGTTCAGA
TTTTGGAGATAAATGGCATGAACTTCCGCTGATTAATGTTTTGAAATACCCGACTTACTAGACCCATCGAT
AATATACTCTGACAAAAGTCATTCAATGAATAGGTGAGAGGTGTTGAAACATGTCCGAATGAATCCGAACAC
TCCTATCCCTAGTAAAAGGTGTTGCAGACTATGTTGGACACAAAGGCTACCAATTGGAAAGAATTTCTTAA
AGAGATTGATGAGAAGGGCTTAGATGATGATGATCTAATTATTGGTCTTAAAGGAAAGGAGAGGGAACTGAA
GTTGGCAGGTAGATTTTTCTCCCTAATGTCTTGGAAATTGCGAGAATACTTTGTAATTACCGAATATTTGAT
AAAGACTCATTTCGTCCCTATGTTTTAAAGGCCTGACAATGGCGGACGATCTAACTGCAGTCATTAAAAAGAT
GTTAGATTCCCTCATCCGGCCAAGGATTGAAGTCATATGAGGCAATTTGCATAGCCAATCACATTGATTACGA
AAAATGGAATAACCACCAAAGGAAGTTATCAAACGGCCAGTGTTCGGAGTTATGGGCCAGTTCTTAGGTTA
TCCATCCTTAATCGAGAGAACTCATGAATTTTTTGGAGAAAAGTCTTATATACTACAATGGAAGACCAGACTT
GATGCGTGTTCACAACAACACTGATCAATTCACCTCCCAACGAGTTTGTGGCAAGGACAAGAGGGTGG
ACTGGAAGGTCTACGGCAAAAAGGATGGAGTATCCTCAATCTACTGGTTATTCAAAGAGAGGCTAAAATCAG
AAACACTGCTGTCAAAGTCTTGGCACAAGGTGATAATCAAGTTATTTGCACACAGTATAAAAACGAAGAAATC
GAGAAAACGTTGTAGAATTACAGGGTGCTCTCAATCAAATGGTTTCTAATAATGAGAAAATTATGACTGCAAT
CAAAATAGGGACAGGGAAGTTAGGACTTTTGATAAATGACGATGAGACTATGCAATCTGCAGATTACTTGAA
TTATGGAAAATAACCGATTTTCCGTGGAGTGATTAGAGGGTTAGAGaCCAAGAGATGGTCACGAGTGACTTG
TGTACCAATGACCAAATACCCACTTGTGCTAATATAATGAGCTCAGTTTCCACAAATGCTCTCACCGTAGC
TCATTTTGCTGAGAACCCAATCAATGCCATGATACAGTACAATTATTTGGGACATTTGCTAGACTCTTGTT
GATGATGCATGATCCTGCTCTTCGTCAATCATTGTATGAAGTTCAAGATAAGATACCGGGCTTGCACAGTTC
TACTTTCAAATACGCCATGTTGTATTTGGACCTTCCATTGGAGGAGTGTGGGCATGTCTTTGTCCAGGTT
TTTGATTAGAGCCTTCCAGATCCCGTAACAGAAAGTCTCTCATTTCTGGAGATTATCCATGTaCATGCTCG
AAGTGAGCATCTGAAGGAGATGAGTGCAGTATTTGGAAACCCCGAGATAGCCAAGTTTCGAATAACTCACAT
AGACAAGCTAGTAGAAGATCCAACCTCTCTGAACATCGCTATGGGAATGAGTCCAGCGAACTTGTTAAAGAC
TGAGGTTAAAAATGCTTAATCGAATCAAGACAAACCATCAGGAACCAGGTGATTAAGGATGCAACCATATA

FIGURA 11 continúa

TTTGTATCATGAAGAGGATCGGCTCAGAAGTTTCTTATGGTCAATAAATCCTCTGTTCCCTAGATTTTTAAG
 TGAATTCAAATCAGGCACTTTTTTGGGAGTCGCAGACGGGCTCATCAGTCTATTTCAAATTTCTCGTACTAT
 TCGGAACCTCTTTAAGAAAAAGTATCATAGGGAAATTGGATGATTTGATTGTGAGGAGTGAGGTATCCTCTTT
 GACACATTTAGGGAACTTCATTTGAGAAGGGGATCATGTAAAATGTGGACATGTTAGCTACTCATGCTGA
 CACATTAAGATACAAATCCTGGGGCCGTACAGTTATTGGGACAACTGTACCCCATCCATTAGAAATGTTGGG
 TCCACAACATCGAAAAGAGACTCCTTGTGCACCATGTAACACATCAGGGTTCAATTATGTTTTCTGTGCATTG
 TCCAGACGGGATCCATGACGTCCTTAGTTTACGGGGACCATTGCCCTGCTTATCTAGGGTCTAAAACATCTGA
 ATCTACATCTATTTTGCAGCCTTGGGAAAGGGAAAGCAAAGTCCCACTGATTA AAAAGAGCTACACGTCCTTAG
 AGATGCTATCTCTGGTTTGTGTAACCCGACTCTAAACTAGCAATGACTATACTTTCTAACATCCACTCTTT
 AACAGGCGAAGAATGGACCAAAGGCAGCATGGGTTCAAAGAACAGGGTCTGCCCTTCATAGGTTTTCGAC
 ATCTCGGATGAGCCATGGTGGGTTTCGCATCTCAGAGCACTGCAGCATTGACCAGGTTGATGGCAACTACAGA
 CACCATGAGGGATCTGGGAGATCAGAA_aTTTTCGACTTTTTTATCCAGGCAACGTTGCTCTATGCTCAGATTAC
 CACCCTGTTGCAAGAGACGGATGGATCACCAGTTGTACAGATCATTATCATATTCCTGTAAAGTCTGTTTT
 GAGACCCATAGAAGAGATCACCCTGGACTCAAGTATGGACTACACGCCCCCAGATGTATCCCATGTGCTGAA
 GACATGGAGGAATGGGAAGGTTTCGTGGGGACAAGAGATAAAACAGATCTATCCTTTAGAAGGGAATGGAA
 GAATTTAGCACCTGCTGAGCAATCCTATCAAGTCGGCAGATGTATAGGTTTTCTATATGGAGACTTGGCGTA
 TAGAAAATCTACTCATGCCGAGGACAGTTCTCTATTTCTCTATCTATAACAAGGTCGTATTAGAGGTCGAGG
 TTTCTTAAAAGGGTTGCTAGACGGATTAATGAGAGCAAGTTGCTGCCAAGTAATACACCGGAGAAGTCTGGC
 TCATTTGAAGAGGCCGGCCAACGCAGTGTACGGAGGTTTGATTTACTTGATTGATAAATGAGTGTATCACC
 TCCATTCCTTTCTCTTACTAGATCAGGACCTATTAGAGACGAA_aTTAGAAACGATTC_{CC}CCACAAGATCCCAAC
 CTCTATCCGACAAGCAACCGTGATATGGGGGTGATTGTGAGAAATTA_{CT}TTCAAATACCAATGCCGTCTAAT
 TGAAAAGGGAAAATACAGATCACATTATTCACAATTATGGTTATTTCTCAGATGTCTTATCCATAGACTTCAT
 TGGACCATTCTCTATTTCCACCACCCTCTTGCAAATCCTATAACAAGCCATTTTTATCTGGGAAAGATAAGAA
 TGAGTTGAGAGAGCTGGCAAATCTTTCTTCATTGCTAAGATCAGGAGAGGGGTGGGAAGACATACATGTAAA
 ATTCTTCACCAAGGACATATTATTGTGTCCAGAGGAAATCAGACATGCTTGCAAGTTCCGGGATTGCTAAGGA
 TAATAATAAAGACATGAGCTATCCCCCTTGGGGAAGGGAATCCAGAGGGACAATTACAACAATCCCCTGTTTA
 TTATACGACCACCCTTACC_{CC}CAAAGATGCTAGAGATGCCTCCAAGAATCCAAAATCCCCTGCTGTCCGGAAT
 CAGGTTGGGCCAGTTACCAACTGGCGCTCATTATAAAATTCGGAGTATATTACATGGAATGGGAATCCATTA
 CAGGGACTTCTTGAGTTGTGGAGACGGCTCCGGAGGGATGACTGCTGCATTACTACGAGAAAATGTGCATAG
 CAGAGGAATATTCAATAGTCTGTTAGAATTATCAGGGTCAGTCATGCGAGGCGCCTCTCCTGAGCCCCCAG
 TGCCCTAGAAACTTTAGGAGGAGATAAATCGAGATGTGTAAATGGTGAAACATGTTGGGAATATCCATCTGA
 CTTATGTGACCCAAGGACTTGGGACTATTTCTCCGACTCAAAGCAGGCTTGGGGCTCAAATGATTTAAT
 TGTAATGGATATGGAAGTTCCGGATTCTTCTACTAGCCTGAAAATGAGACGAATGTTAGAAATATGTGCA
 CCGGATTTTGGATGAGCAAGGAGTTTAAATCTACAAGACTTATGGAACATATATTTGTGAGAGCGAAAAGAA
 TGCAGTAACAATCCTTGGTCCCATGTTCAAGACGGTCCGACTTAGTTCAAACAGAATTTAGTAGTTCTCAAAC
 GTCTGAAGTATATATGGTATGTAAAGGTTTGAAGAAATTAATCGATGAACCCAATCCCATTGGTCTTCCAT

FIGURA 11 continúa

CAATGAATCCTGGAAAAACCTGTACGCATTCCAGTCATCAGAACAGGAATTTGCCAGAGCAAAGAAGGTTAG
TACATACTTTACCTTGACAGGTATTCCTCCCAATTCATTCCCTGATCCTTTTGTAAACATTGAGACTATGCT
ACAAATATTCGGAGTACCCACGGGTGTGTCTCATGCGGCTGCCTTAAAATCATCTGATAGACCTGCAGATTT
ATTGACCATTAGCCTTTTTTATATGGCGATTATATCGTATTATAACATCAATCATATCAGAGTAGGACCGAT
ACCTCCGAACCCCCATCAGATGGAATTGCACAAAATGTGGGGATCGCTATAACTGGTATAAGCTTTTGGCT
GAGTTTGATGGAGAAAGACATTCCACTATATCAACAGTGTTTAGCAGTTATCCAGCAATCAATCCCGATTAG
GTGGGAGGCTGTTTCAGTAAAAGGAGGATACAAGCAGAAGTGGAGTACTAGAGGTGATGGGCTCCCAAAGA
TACCCGAATTTTCAGACTCCTTGGCCCAATCGGGAAGTGGATCAGATCTCTGGAATGGTCCGAAACCAAGT
TCGTCTGAATCCATTCAATGAGATCTTGTTCATCAGCTATGTCGTACAGTGGATAATCATTTGAAATGGTC
AAATTTGCGAAAAACACAGGAATGATTGAATGGATCAATAGACGAATTTCAAAGAAGACCGGCTTATACT
GATGTTGAAGAGTGACCTACATGAGGAAAACTCTTGGAGAGATTAAAAAATCATGAGGAGACTCCAACTTT
AAGTATGAAAAAACTTTGATCCTTAAGACCCCTTGTGGTTTTTATTTTTTATCTGGTTTTGTGGTCTTCG
T

FIGURA 11 continúa

Secuencia de ácidos nucleicos del gen de la proteína M para el mutante de VSV AV1

ATGAGTTCCTTAAAGAAGATTCTCGGTCTGAAGGGGAAAGGTAAGAAATCTAAGAAATTAGGGATCGCACCA
CCCCCTTATGAAGAGGACACTAACATGGAGTATGCTCCGAGCGCTCCAATGACAAATCCTATTTTGGAGTT
GACGAGATGGACACTCATGATCCGCATCAATTAAGATATGAGAAATCTTCTTTACAGTGAAAATGACGGTT
AGATCTAATCGTCCGTTCAGAACATACTCAGATGTGGCAGCCGCTGTATCCCATTTGGGATCACATGTACATC
GGAATGGCAGGGAAACGTCCCTTCTACAAGATCTTGGCTTTTTTGGGTTCTTCTAATCTAAAGGCCACTCCA
GCGGTATTGGCAGATCAAGGTCAACCAGAGTATCACGCTCACTGTGAAGGCAGGGCTTATTTGCCACACAGA
ATGGGGAAGACCCCTCCCATGCTCAATGTACCAGAGCACTTCAGAAGACCATTCAATATAGGTCTTTACAAG
GGAACGGTTGAGCTCACAATGACCATCTACGATGATGAGTCACTGGAAGCAGCTCCTATGATCTGGGATCAT
TTCAATTCTTCAAATTTTCTGATTTCAAGAGAGAAGGCCTTAATGTTTGGCCTGATTGTCGAGAAAAAGGCA
TCTGGAGCTTGGTTCCTGGATTCTGTCAAGACTTCAAATGA

FIGURA 12

Secuencia de aminoácidos para la proteína M del mutante de VSV AV1

MSSLKKILGLKKGKSKKLGIAAPPYEEDTNMEYAPSAPIDKSYFGVDERDTHDPHQLRYEKFFFTVKMTV
RSNRPFRITYSDVAAAVSHWDHMYIGMAGKRPFYKILAF LGSSNLKATPAVLADQGQPEYHAHCEGRAYLPHR
MGKTPPMLNVPEHFRPFNIGLYKGTVELTMTIYDDESLEAAPMIWDFNSKFSDFREKALMFGLIVEKKA
SGAWVLDVSHFK.

FIGURA 13

Secuencia del genoma para el mutante de VSV AV2

ACGAAGACAAACAAACCATTTATTATCATTTAAAAGGCTCAGGAGAACTTTAACAGTAATCAAAATGTCTGTT
 ACAGTCAAGAGAATCATTTGACAACACAGTCATAGTTCCAAAACCTTCCTGCAAATGAGGATCCAGTGGAAATAC
 CCGGCAGATTACTTCAGAAAATCAAAGGAGATTCCTCTTTACATCAATACTACAAAAAGTTTGTCTAGATCTA
 AGAGGATATGTCTACCAAGGCCTCAAATCCGGAAATGTATCAATCATACTGTCAACAGCTACTTGTATGGA
 GCATTGAAGGACATCCGGGGTAAGTTGGATAAAGATTTGGTCAAGTTTTCGGAATAAACATCCGGGAAGGCAGGG
 GATACAATCCGGAATATTTGACCTTGTATCCTTGAAAGCCCTGGACGGTGTACTTCCAGATGGAGTATCCGGAT
 GCTTCCAGAACCAGCGCAGATGACAAATGGTTGCCTTTGTATCTACTTGGCTTATACAGAGTGGGCAGAAACA
 CAAATGCCTGAATACAGAAAAGGCTCATGGATGGGCTGACAAATCAATGCAAATGATCAATGAACAGTTT
 GAACCTCTTGTGCCAGAAGGTCGTGACATTTTTGTATGTGTGGGGAAATGACAGTAATTACACAAAAATTGTC
 GCTGCAGTGGACATGTTCTTCCACATGTTCAAAAACATGAATGTGCCTCGTTCAGATACGGAACTATTGTT
 TCCAGATTCAAAGATTGTGCTGCATTGGCAACATTTGGACACCTCTGCAAATAACCGGAATGTCTACAGAA
 GATGTAAACGACCTGGATCTTGAACCGAGAAGTTGCAGATGAGATGGTCCAAATGATGCTTCCAGGCCAAGAA
 ATTGACAAGGCCGATTCATACATGCCTTATTTGATCGACTTTGGATTGTCTTCTAAGTCTCCATATTCTTCC
 GTCAAAAACCTGCCTTCCACTTCTGGGGGCAATTGACAGCTCTTCTGCTCAGATCCACCAGAGCAAGGAAT
 GCCCGACAGCCTGATGACATTTGAGTATACATCTTTACTACAGCAGGTTTGTGTACGCTTATGCAGTAGGA
 TCCTCTGCTGACTTGGCACAACAGTTTTGTGTTGGAGATAGCAAATACACTCCAGATGATAGTACCGGAGGA
 TTGACGACTAATGCACCGCCACAAGGCAGAGATGTGGTGAATGGCTCGGATGGTTTGAAGATCAAAACAGA
 AAACCGACTCCTGATATGATGCAGTATGCGAAACGAGCAGTCATGTCACTGCAAGGCCTAAGAGAGAAGACA
 ATTGGCAAGTATGCTAAGTCAGAAATTTGACAAATGACCCTATAATTCTCAGATCACCTATTATATATTATGC
 TACATATGAAAAAACTAACAGATATCATGGATAATCTCACAAAAGTTCTGTGAGTATCTCAAGTCTTATTCT
 CGTCTAGATCAGGCCGTAGGAGAGATAGATGAGATCGAAGCACAACGAGCTGAAAAGTCCAATTATGAGTTG
 TTCCAAGAGGACGGAGTGGAAAGAGCATACTAGGCCCTCTTATTTTTAGGCAGCAGATGATTCTGCACAGAA
 TCTGAACCAGAAATTTGAAGACAATCAAGGCTTGTATGTACCAGATCCGGAAGCTGAGCAAGTTGAAGGCTTT
 ATACAGGGGCTTTAGATGACTATGCGGATGAGGACGTGGATGTTGTATTCACTTCGGACTGGAAACAGCCT
 GAGCTTGAATCCGACGAGCATGGAAAGACCTTACGGTTGACATTGCCAGAGGGTTTAAGTGGAGAGCAGAAA
 TCCCAGTGGCTTTTTCAGGATTTAAAGCAGTCGTTCAAAGTGCCAAACACTGGAATCTGGCAGAGTGCACATTT
 GAAGCATCGGGAGAAGGGGTATCATATAAAAAGCGCCAGATAACTCCGGATGTATATAAGGTCACTCCAGTG
 ATGAACACACATCCGTCCCAATCGGAAGCCGTATCAGATGTTTGGTCTCTCTCAAAGACATCCATGACTTTC
 CAACCCAAGAAAGCAAGTCTTCAGCCTCTACCATATCCTTGGATGAATTGTTCTCATCTAGAGGAGAATTC
 ATCTCTGTCCGAGGTAACGGACGAATGTCTCATAAAGAGGCCATCCTGCTCGGTCTGAGGTACAAAAAGTTG
 TACAATCAGGCGAGAGTCAAATATTCTCTGTAGACTATGAAAAAAGTAACAGATATCACAATCTAAGTGT
 ATCCCAATCCATTCATCATGAGTTCTTAAAGAAGATTCTCGGTCTGAAGGGGAAAGGTAAGAAATCTAAGA
 AATTAGGGATCGCACCCCTTATGAAGAGGACACTAACATGGAGTATGCTCCGAGCGCTCCAATTGACA
 AATCCTATTTTGGAGTTGACGAGATGGACACTCATGATCCGCATCAATTAAGATATGAGAAATTTCTTCTTTA
 CAGTGAATGACGGTTAGATCTAATCGTCCGTTCCAGAACATACTCAGATGTGGCAGCCGCTGTATCCCATT

FIGURA 14

GGGATCACATGTACATCGGAATGGCAGGGAAACGTCCCTTCTACAAGATCTTGGCTTTTTTGGGTTCTTCTA
 ATCTAAAGGCCACTCCAGCGGTATTGGCAGATCAAGGTCAACCAGAGTATCACGCTCACTGTGAAGGCAGGG
 CTTATTTGCCACACAGAATGGGGAAGACCCCTCCCATGCTCAATGTACCAGAGCACCTCAGAAGACCATTCA
 ATATAGGTCTTTACAAGGGAACGGTTGAGCTCACAATGACCATCTACGATGATGAGTCACTGGAAGCAGCTC
 CTATGATCTGGGATCATTTCAATTCTTCCAAATTTTCTGATTTTCAGAGAGAAGGCCTTAATGTTTGGCCTGA
 TTGTGAGAAAAAGGCATCTGGAGCTTGGTTCCTGGATTCTGTCCAGACACTTCAAATGAGCTAGTCTAGCTT
 CCAGCTTCTGAACAATCCCCGGTTTACTCAGTCTCTCCTAATTCAGCCTTTCGAACAACATAATCCTGTC
 TTTTCTATCCCTATGAAAAAACTAACAGAGATCGATCTGTTCCTTGACACCATGAAGTGCCTTTTGTACT
 TAGCTTTTTTATTCATCGGGGTGAATTGCAAGTTCACCATAGTTTTTCCATAACAACAAAAAGGAACTGGA
 AAAATGTTCCCTTCCAAATACCAATTATTGCCCGTCAAGTCTCAGATTTAAATTGGCATAATGACTTAATAGGCA
 CAGCCTTACAAGTCAAAATGCCCAAGAGTCACAAGGCTATTCAAGCAGACCGTTGGATGTGTGATGCTTCCA
 AATGGGTCACTACTTGTGATTTCCGCTGGTACGGACCGAAGTATATAACACATTCCATCCGATCCTTCACTC
 CATCTGTAGAACAATGCAAGGAAAGCATTGAACAAACGAAACAAGGAACTTGGCTGAATCCAGGCTTCCCTC
 CTCAAAAGTTGTGGATATGCAACTGTGACGGATGCTGAAGCAGCGATTGTCCAGGTGACTCCTCACCATGTGC
 TTGTTGATGAATACACAGGAGAATGGGTTGATTCACAGTTCATCAACGGAAAATGCAGCAATGACATATGCC
 CCACTGTCCATAACTCCACAACCTGGCATTCCGACTATAAGGTCAAAGGGCTATGTGATTTAACCTCATTT
 CCATGGACATCACCTTCTTCTCAGAGGACGGAGAGCTATCATCCCTAGGAAAGGAGGGCACAGGGTTCAGAA
 GTAACACTTFTTGCCTTATGAACTGGAGACAAGGCCTGCAAAATGCAGTACTGCAAGCGTTGGGGAGTCAAGC
 TCCCATCAGGTGTATGGTTCGAGATGGCTGATAAGGATCTCTTTGCTGCAGCCAGATTCCCTGAATGCCAG
 AAGGGTCAAGTATCTCTGCTCCATCTCAGACCTCAGTGGATGTAAGTCTCATTGAGGACGTTGAGAGGATCT
 TGGATTATTCCTCTGCCAAGAAACCTGGAGCAAAATCAGAGCGGGTCTTCCCATCTCTCCAGTGGATCTCA
 GCTATCTTGCTCCTAAAAACCCAGGAACCGGTCTGTCTTTACCATAATCAATGGTACCCTAAAATACTTTG
 AGACCAGATACATCAGAGTCGATATTGCTGCTCCAATCCTCTCAAGAATGGTCCGAATGATCAGTGGAACTA
 CCACAGAAAGGGAACGTGGGATGACTGGGCTCCATATGAAGACGTGGAAATTGGACCCAATGGAGTTCTGA
 GGACCAGTTCAGGATATAAGTTTCTTTTATATATGATTGGACATGGTATGTTGGACTCCGATCTTCACTTA
 GCTCAAAGGCTCAGGTGTTTGAACATCCTCACATTCAAGACGCTGCTGCGCAGCTTCTGATGATGAGACTT
 TATTTTTTGGTGATACTGGGCTATCCAAAAATCCAATCGAGTTTGTAGAAGGTTGGTTTTCAGTAGTTGGAAGA
 GCTCTATTGCCTCTTTTTTCTTTATCATAGGGTTAATCATTGGACTATTCTTGGTTCTCCGAGTTGGTATTT
 ATCTTTGCATTAATAATAAGCACACCAAGAAAAGACAGATTTATAAGACATAGAGATGAACCGACTTGGGA
 AGTAACTCAAATCCTGCACAACAGATTCTTCATGTTTGAACCAAATCAACTTGTGATATCATGCTCAAAGAG
 GCCTTAATTATATTTAATTTTAAATTTTATGAAAAAACTAACAGCAATCATGGAAGTCCACGATTTTGA
 GACCGACGAGTTCAATGATTTCAATGAAGATGACTATGCCACAAGAGAATTCTGAATCCCGATGAGCGCAT
 GACGTACTTGAATCATGCTGATTACAATTTGAATTCTCCTCTAATTAGTGATGATATTGACAATTTGATCAG
 GAAATCAATCTCTTCCGATTCCTCGATGTGGGATAGTAAGAACTGGGATGGAGTTCTTGAGATGTTAAC
 ATCATGTCAAGCCAATCCCATCTCAACATCTCAGATGCATAAATGGATGGGAAGTTGGTTAATGTCTGATAA
 TCATGATGCCAGTCAAGGGTATAGTTTTTACATGAAGTGGACAAAGAGGCAGAAATAACATTTGACGTGGT

FIGURA 14 continúa

GGAGACCTTCATCCGCGGCTGGGGCAACAAACCAATTGAATACATCAAAAAGGAAAGATGGACTGACTCATT
CAAAATTCCTCGCTTATTTGTGTCAAAAGTTTTTGGACTTACACAAGTTGACATTAATCTTAAATGCTGTCTC
TGAGGTGGAATTGCTCAACTTGGCGAGGACTTTCAAAGGCAAAGTCAGAAGAAGTTCTCATGGAACGAACAT
ATGCAGGCTTAGGGTTCCAGCTTGGGTCTACTTTTATTTTCAAGAAGGATGGGCTTACTTCAAGAACTTGA
TATTTCTAATGGACCGAAACTTTCTGTTAATGGTCAAAGATGTGATTATAGGGAGGATGCAAACGGTGTCTATC
CATGGTATGTAGAATAGACAACCTGTTCTCAGAGCAAAGACATCTTCTCCCTTCTAAATATCTACAGAATTGG
AGATAAAATTGTGGAGAGGCAGGGAAATTTTTCTTATGACTTGATTAAAATGGTGGAAACCGATATGCAACTT
GAAGCTGATGAAATTAGCAAGAGAATCAAGGCCTTTAGTCCCACAATTCCTCAITTTGAAAATCATATCAA
GACTTCTGTTGATGAAGGGGCAAAAATTGACCGAGGTATAAGATTCTCCATGATCAGATAATGAGTGTGAA
AACAGTGGATCTCACACTGGTGATTTATGGATCGTTCAGACATTTGGGTTCATCCTTTTATAGATTATTACGC
TGGACTAGAAAAATTACATTTCCCAAGTAACCATGAAGAAAGATATTGATGTGTCAATATGCAAAAAGCATTGC
AAGTGATTTAGCTCGGATTGTTCTATTTCAACAGTTCAATGATCATAAAAAGTGGTTTCGTGAATGGAGACTT
GCTCCCTCATGATCATCCCTTTAAAAGTCATGTTAAAAGAAAATACATGGCCACAGCTGCTCAAGTTCAAGA
TTTTGGAGATAAATGGCATGAACTTCCGCTGATTAAATGTTTTGAAATACCCGACTTACTAGACCCATCGAT
AATATACTCTGACAAAAGTCATTCAATGAATAGGTGAGAGGTGTTGAAACATGTCCGAATGAATCCGAACAC
TCCTATCCCTAGTAAAAGGTGTTGCAGACTATGTTGGACACAAAGGCTACCAATTGGAAAGAAATTTCTTAA
AGAGATTGATGAGAAGGGCTTAGATGATGATGATCTAATTATTGGTCTTAAAGGAAAGGAGAGGGAACTGAA
GTTGGCAGGTAGATTTTTCTCCCTAATGTCTTGGAAAATGCGGAGAATACTTTGTAATTACCGAATAATTTGAT
AAAGACTCATTTCGTCCCTATGTTTAAAAGGCCTGACAAATGGCGGACGATCTAACTGCAGTCATTAAAAGAT
GTTAGATTCCTCATCCGGCCAAGGATTGAAGTCATATGAGGCAATTTGCATAGCCAATCACATGATTACGA
AAAATGGAATAACCACCAAAGGAAGTTATCAAACGGCCAGTGTCCGAGTTATGGGCCAGTTCITTAGGTTA
TCCATCCTTAATCGAGAGAACTCATGAATTTTTTGGAGAAAAGTCTTATATACTACAATGGAAGACCAGACTT
GATGCGTGTTCACAACAACACACTGATCAATTCACCTCCCAACGAGTTTTGTTGGCAAGGACAAGAGGGTGG
ACTGGAAGGTCTACGGCAAAAAGGATGGAGTATCCTCAATCTACTGGTTAATCAAAGAGAGGCTAAAATCAG
AAACTGCTGTCAAAGTCTTGGCACAAGGTGATAATCAAGTTAATTTGCACACAGTATAAAACGAAGAAATC
GAGAAACGTTGTAGAATTACAGGGTGTCTCAATCAAATGGTTTCTAATAATGAGAAAATTATGACTGCAAT
CAAAATAGGGACAGGGAAGTTAGGACTTTTGATAAATGACGATGAGACTATGCAATCTGCAGATTACTTGAA
TTATGGAAAATAACCGATTTTTCCGTGGAGTGATTAGAGGTTAGAGACCAAGAGATGGTCCAGAGTGACTTG
TGTACCAATGACCAAATACCCACTTGTGCTAATATAATGAGCTCAGTTTTCCACAAATGCTCTCACCGTAGC
TCATTTTGCTGAGAACCCAATCAATGCCATGATACAGTACAATTATTTGGGACATTTGCTAGACTCTTGT
GATGATGCATGATCCTGCTCTTCGTCAATCATTGTATGAAGTTCAAGATAAGATACCGGGCTGCACAGTTC
TACTTTCAAATACGCCATGTTGTATTTGGACCTTCCATTTGGAGGAGTGTCCGGCATGTCTTTGTCCAGGTT
TTTGATTAGAGCCTTCCAGATCCCGTAACAGAAAGTCTCTCATTTCTGGAGATTCATCCATGTACATGCTCG
AAGTGAGCATCTGAAGGAGATGAGTGCAGTATTTGGAAACCCCGAGATAGCCAAGTTTCAATAACTCACAT
AGACAAGCTAGTAGAAGATCCAACCTCTCTGAACATCGCTATGGGAATGAGTCCAGCGAACCTGTTAAAGAC
TGAGGTTAAAATGCTTAATCGAATCAAGACAAACCATCAGGAACCAGGTGATTAAGGATGCAACCATATA

FIGURA 14 continúa

ES 2 319 424 T3

TTTGTATCATGAAGAGGATCGGCTCAGAAGTTTCTTATGGTCAATAAAATCCTCTGTTCCCTAGATTTTTAAG
TGAATTCAAATCAGGCACTTTTTTGGGAGTCGCAGACGGGCTCATCAGTCTATTTCAAATTCCTCGTACTAT
TCGGAACTCCTTTAAGAAAAAGTATCATAGGGAATTGGATGATTTGATTGTGAGGAGTGAGGTATCCTCTTT
GACACATTTAGGGAACTTCATTTGAGAAGGGGATCATGTAAAATGTGGACATGTTTACGCTACTCATGCTGA
CACATTAAGATACAAATCCTGGGGCCGTACAGTTATTTGGGACAACTGTACCCCATCCATTAGAAATGTTGGG
TCCACAACATCGAAAAGAGACTCCTTGTGCACCATGTAACACATCAGGGTTCAATTATGTTTCTGTGCATTG
TCCAGACGGGATCCATGACGTCTTTAGTTTACGGGGACCATTTGCCTGCTTATCTAGGGTCTAAAACATCTGA
ATCTACATCTATTTTGAGCCTTGGGAAAGGGAAAGCAAAGTCCCCTGATTAAAAGAGCTACACGTCTTAG
AGATGCTATCTCTTGGTTTGTGAAACCCGACTCTAACTAGCAATGACTATACTTTCTAACATCCACTCTTT
AACAGGCCGAAGAATGGaCCAAAAGGCAGCATGGGTTCAAAGAACAGGGTCTGCCCTTCATAGGTTTTTCGAC
ATCTCGGATGAGCCATGGTGGGTTTCGCATCTCAGAGCACTGCAGCATTTGACCAGGTTGATGGCaCTACAGA
CACCATGAGGGATCTGGGAGATCAGAATTTTCGACTTTTTTATTTCCAGGCAACGTTGCTCTATGCTCAGATTAC
CACCCTGTTGCAAGAGACGGATGGATCACCAGTTGTACAGATCATTATCATATTGCCTGTAAGTCTCTGTTT
GAGACCCATAGAAGAGATCACCTGGACTCAAGTATGGACTACACGCCCCCAGATGTATCCCATGTGCTGAA
GACATGGAGGAATGGGGAAGGTTCTGTTGGGACAAGAGATAAAACAGATCTATCCTTTAGAAGGGAATTGGAA
GAATTTAGCACCTGCTGAGCAATCCTATCAAGTCGGCAGATGTATAGGTTTTCTATATGGAGACTTGGCGTA
TAGAAAATCTACTCATGCCGAGGACAGTTCTCTATTTCTCTATCTATAACAAGGTCGTATTAGAGGTCGAGG
TTTTCTTAAAGGGTTGCTAGACGGATTAATGAGAGCAAGTTGCTGCCAAGTAATACACCGGAGAAGTCTGGC
TCATTTGAAGAGGCCGGCCAACGCAGTGTACGGAGGTTTGATTTACTTGATTGATAAATTGAGTGtATCACC
TCCATTCCTTTCTCTTACTAGATCAGGACCTATTAGAGACGAATTAGAAACGATTCCCCACAAGATCCCAAC
CTCCTATCCGACAAGCAACCGTGATATGGGGGTGATTGTCAGAAATTACTTCAAATACCAATGCCGTCTAAT
TGAAAAGGGAAAATACAGATCACATTATTACAATTATGGTTATTCTCAGATGTCTTATCCATAGACTTCAT
TGGACCATTCTCTATTTCCACCACCCTCTTGCAAATCCTATAACAAGCCATTTTTTATCTGGGAAAGATAAGAA
TGAGTTGAGAGAGCTGGCAAATCTTTCTTCATTGCTAAGATCAGGAGAGGGGTGGGAAGACATACATGTAAA
ATTCTTACCACAGGACATATTATTGTGTCCAGAGGAAATCAGACATGCTTGCAAGTTCCGGGATTGCTAAGGA
TAATAATAAAGACATGAGCTATCCCCCTTGGGGAAGGGAATCCAGAGGGACAATTACAACAATCCCTGTTTA
TTATACGACCACCCTTACCCAAAGATGCTAGAGATGCCCTCCAAGAATCCAAAATCCCCTGCTGTCCGGAAT
CAGGTTGGCCAGTTACCAACTGGCGCTCATTATAAAATTCGGAGTATAATTACATGGAATGGGAATCCaTTA
CAGGGACTTCTTGAGTTGTGGAGACGGCTCCGGAGGGATGACTGCTGCATTACTACGAGAAAATGTGCATAG
CAGAGGAATATTCAATAGTCTGTTAGAATTATCAGGGTCAGTCATGCGAGGCGCCTCTCCTGAGCCCCCAG
TGCCCTAGAAACTTTAGGAGGAGATAAATCGAGATGTGTAATGGTGAACATGTTGGGAATATCCATCTGA
CTTATGTGACCCAAGGACTTGGGACTATTTCTCCGACTCAAAGCAGGCTTGGGGCTTCAAATTGATTTAAT
TGTAATGGATATGGAAGTTCCGGATTTCTTCTACTAGCCTGAAAATTGAGACGAATGTTAGAAATTATGTGCA
CCGATTTTGGATGAGCAAGGAGTTTAAATCTACAAGACTTATGGAACATATATTTGTGAGAGCGAAAAGAA
TGCAGTAACAATCCTTGGTCCCATGTTCAAGACGGTCGACTTAGTTCAAACAGAATTTAGTAGTTCTCAAAC
GTCTGAAGTATATATGGTATGTAAAGGTTTGAAGAAATTAATCGATGAACCCAATCCCGATTGGTCTTCCAT

FIGURA 14 continúa

CAATGAATCCTGGAAAAACCTGTACGCATTCCAGTCATCAGAACAGGAATTTGCCAGAGCAAAGAAGGTTAG
TACATACTTTACCTTGACAGGTATTCCCTCCCAATTCATTCCCTGATCCTTTTGTGAACATTGAGACTATGCT
ACAAATATTGGGAGTACCCACGGGTGTGTCTCATGCGGCTGCCTTAAATCATCTGATAGACCTGCAGATTT
ATTGACCATTAGCCTTTTTTATATGGCGATTATATCGTATTATAACATCAATCATATCAGAGTAGGACCGAT
ACCTCCGAACCCCCCATCAGATGGAATTGCACAAAATGTGGGGATCGCTATAACTGGTATAAGCTTTTGGCT
GAGTTTGATGGAGAAAGACATTCCACTATATCAACAGTGTTTAGCAGTTATCCAGCAATCATTCCCGATTAG
GTGGGAGGCTGTTTCAGTAAAAGGAGGATACAAGCAGAAGTGGAGTACTAGAGGTGATGGGCTCCCAAAGA
TACCCGAATTTGAGACTCCTTGGCCCCAATCGGGAAGTGGATCAGATCTCTGGAATTGGTCCGAAACCAAGT
TCGTCTGAATCCATTCAATGAGATCTTGTTCAATCAGCTATGTCGTACAGTGGATAATCATTTGAAATGGTC
AAATTTGCGAAAAAACACAGGAATGATTGAATGGATCAATAGACGAATTTCAAAGAAGACCGGTCTATACT
GATGTTGAAGAGTGACCTACATGAGGAAAACCTCTTGAGAGATTTAAAAAATCATGAGGAGACTCCAACTTT
AAGTATGAAAAAACTTTGATCCTTAAGACCTCTTGTGGTTTTTATTTTTTATCTGGTTTTGTGGTCTTCG
T

FIGURA 14 continúa

Secuencia de ácidos nucleicos del gen de la proteína M para el mutante de VSV AV2

ATGAGTTCCTTAAAGAAGATTCTCGGTCTGAAGGGGAAAGGTAAGAAATCTAAGAAATTAGGGATCGCACCA
CCCCCTTATGAAGAGGACACTAACATGGAGTATGCTCCGAGCGCTCCAATTGACAAATCCTATTTTGGAGTT
GACGAGAGGGGACTCATGATCCGCATCAATTAAGATATGAGAAATCTTCTTTACAGTGAAAATGACGGTT
AGATCTAATCGTCCGTTCAGAACATACTCAGATGTGGCAGCCGCTGTATCCCATGGGATCACATGTACATC
GGAATGGCAGGGAAACGTCCCTTCTACAAGATCTTGGCTTTTTTGGGTTCTTCTAATCTAAAGGCCACTCCA
GCGGTATTGGCAGATCAAGGTCAACCAGAGTATCACGCTCACTGTGAAGGCAGGGCTTATTTGCCACACAGA
ATGGGGAAGACCCCTCCCATGCTCAATGTACCAGAGCACTTCAGAAGACCATTCAATATAGGTCTTTACAAG
GGAACGGTTGAGCTCACAATGACCATCTACGATGATGAGTCACTGGAAGCAGCTCCTATGATCTGGGATCAT
TTCAATTCTTCCAAATTTTCTGATTTTCAGAGAGAAGGCCTTAATGTTTGGCCTGATTTGTCGAGAAAAAGGCA
TCTGGAGCTTGGGTCCCTGGATTCGTGTCAGCCACTTCAAATGA

FIGURA 15

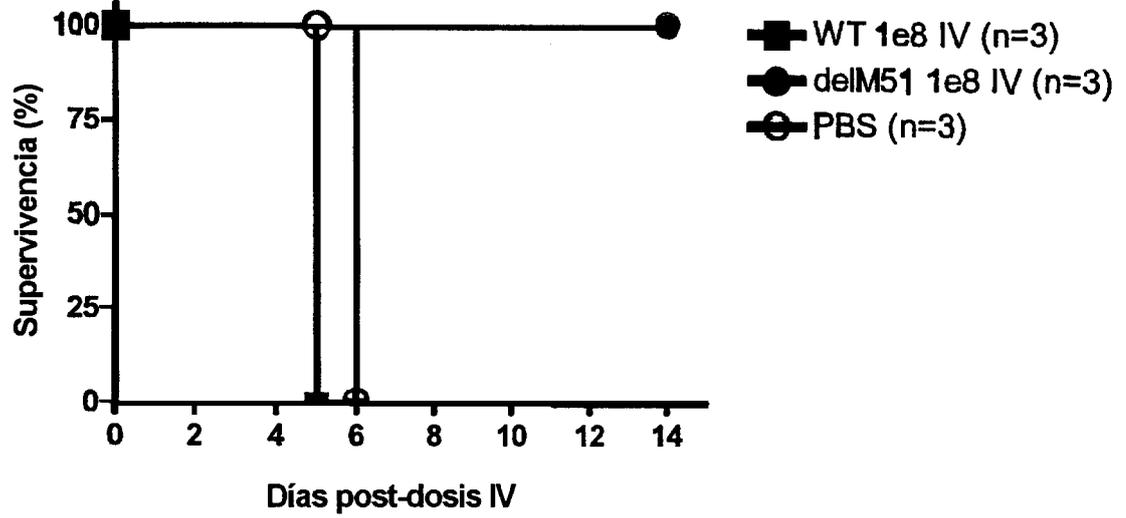
ES 2 319 424 T3

Secuencia de aminoácidos para la proteína M del mutante de VSV AV2

MSSLKKILGLKGGKSKKLGIAAPPYEEDTNMEYAPSAPIDKSYFGVDEMDTHDPHQLRYEKFFFTVKMTV
RSNRPFRITYSDVAAAVSHWDHMYIGMAGKRPFYKILAFLGSSNLKATPAVLADQGQPEYHAHCEGRAYLPHR
MGKTPPMLNVPEHFRPFNIGLYKGTVELTMTIYDDESLEAAPMIWDHFNSSKFSDFREKALMFGLIVEKKA
SGAWFLDSVRHFK

FIGURA 16

A



B

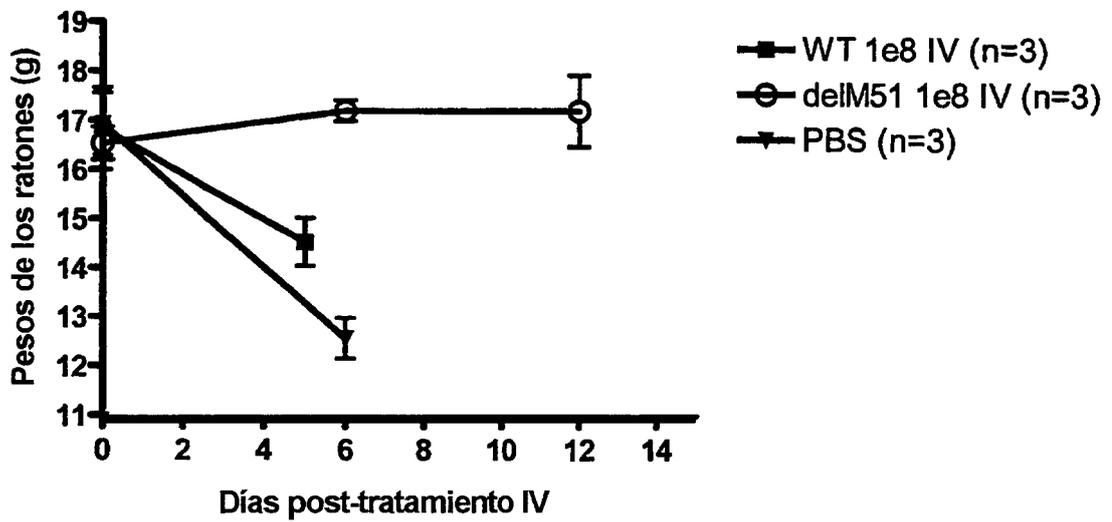


FIGURA 17A-B

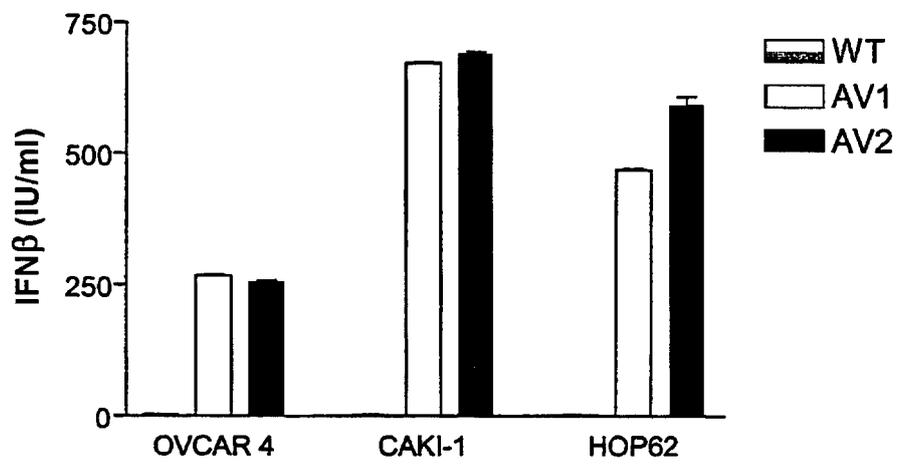
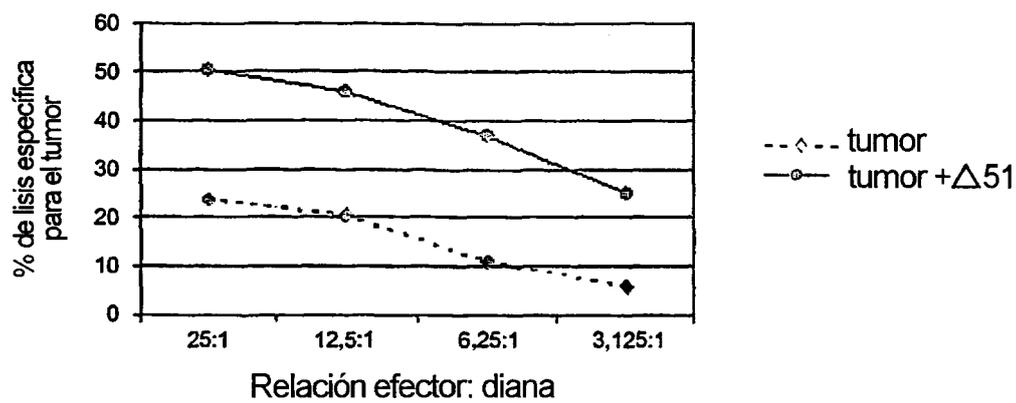


FIGURA 18

A



B

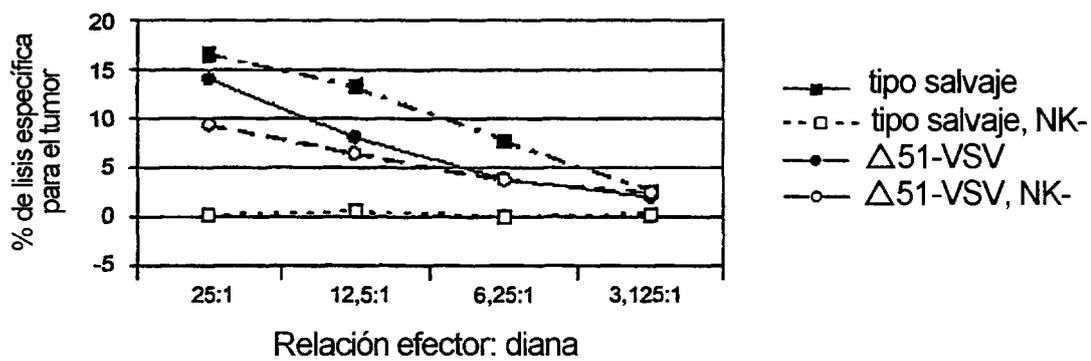


FIGURA 19

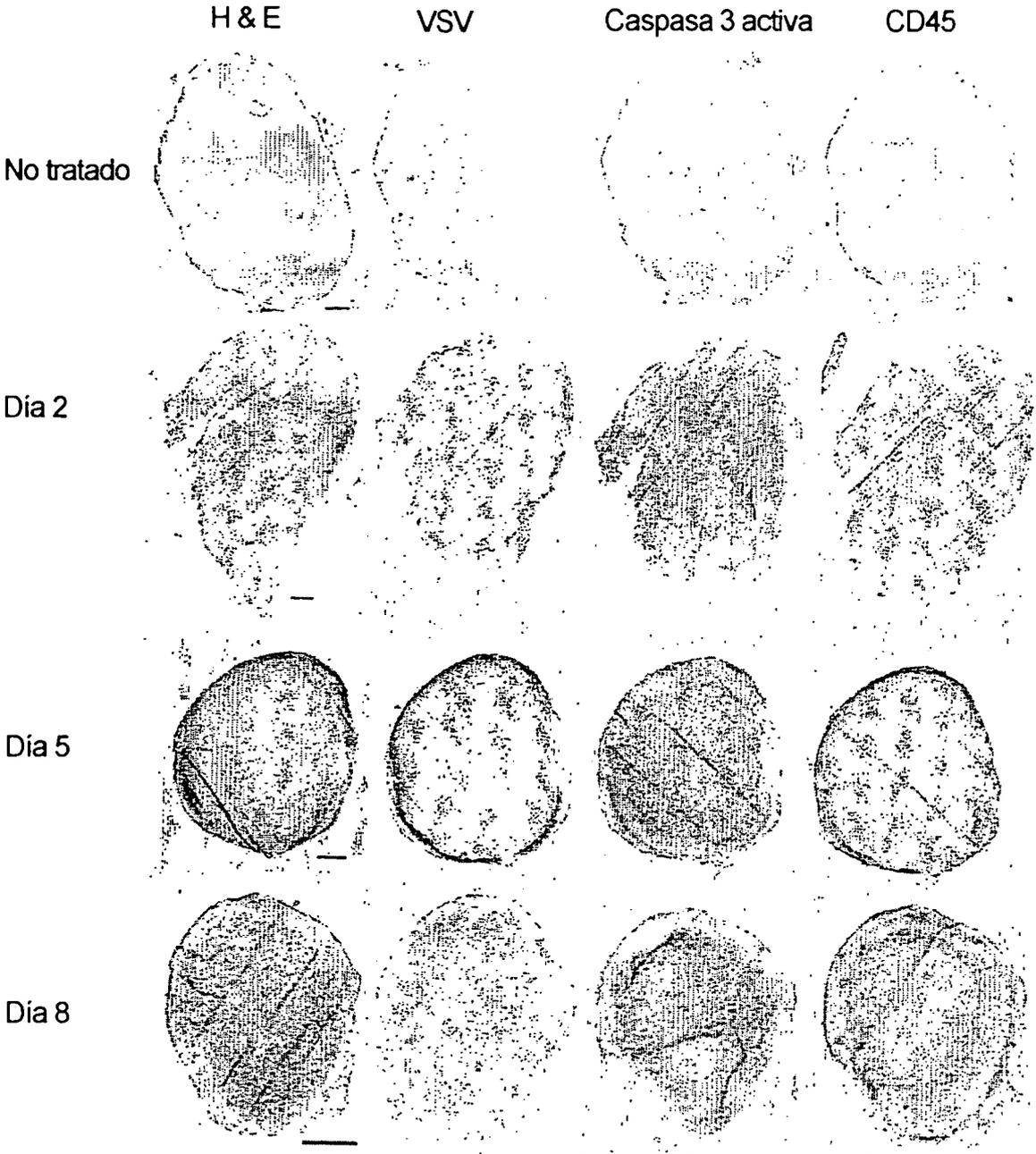


FIGURA 20

ES 2 319 424 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Ottawa Health Research Institute Wellstat Biologics Corporation

5 <120> Virus mutantes y sus usos

<130> 16666

10 <150> 60/457.591

<151> 27-03-2003

<160> 20

15

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

20 <211> 11161

<212> ADN

<213> Virus de la estomatitis vesicular

25 <400> 1

	acgaagacaa	acaaaccatt	attatcatta	aaaggctcag	gagaaacttt	aacagtaatc	60
30	aaaatgtctg	ttacagtcaa	gagaatcatt	gacaacacag	tcatagttcc	aaaacttccct	120
	gcaaatgagg	atccagtgga	ataccggca	gattacttca	gaaaatcaaa	ggagattcct	180
	ctttacatca	atactacaaa	aagtttgta	gatctaagag	gatatgtcta	ccaaggcctc	240
35	aaatccggaa	atgtatcaat	catacatgtc	aacagctact	tgtatggagc	attgaaggac	300
	atccggggta	agttggataa	agattggta	agtttcggaa	taaacatcgg	gaaggcaggg	360
40	gatacaatcg	gaatatttga	ccttgatcc	ttgaaagccc	tggacggtgt	acttccagat	420
	ggagtatcgg	atgcttccag	aaccagcgca	gatgacaaat	ggttgccttt	gtatctactt	480
	ggcttataca	gagtgggcag	aacacaaatg	cctgaataca	gaaaaaggct	catggatggg	540
45	ctgacaaatc	aatgcaaaat	gatcaatgaa	cagtttgaac	ctcttggtcc	agaaggctcg	600
	gacatttttg	atgtgtgggg	aatgacagt	aattacacaa	aaattgtcgc	tgcagtggac	660
	atgttcttcc	acatgttcaa	aaaacatgaa	tgtgcctcgt	tcagatacgg	aactattggt	720
50	tccagattca	aagattgtgc	tgcattggca	acatttggac	acctctgcaa	aataaccgga	780
	atgtctacag	aagatgtaac	gacctggatc	ttgaaccgag	aagttgcaga	tgagatggtc	840
55	caaatgatgc	ttccaggcca	agaaattgac	aaggccgatt	catacatgcc	ttatttgatc	900
	gactttggat	tgtcttctaa	gtctccatat	tcttccgtca	aaaaccctgc	cttccacttc	960
	tgggggcaat	tgacagctct	tctgctcaga	tctaccagag	caaggaatgc	ccgacagcct	1020
60	gatgacattg	agtatacatc	tcttactaca	gcaggtttgt	tgtacgctta	tgcagtagga	1080
	tcctctgctg	acttggcaca	acagttttgt	gttggagata	gcaaatacac	tccagatgat	1140
	agtaccggag	gattgacgac	taatgcaccg	ccacaaggca	gagatgtggt	cgaatggctc	1200
65	ggatggtttg	aagatcaaaa	cagaaaaccg	actcctgata	tgatgcagta	tgcgaaacga	1260

ES 2 319 424 T3

	gcagtcacgt cactgcaagg cctaagagag aagacaattg gcaagtatgc taagtcagaa	1320
	tttgacaaat gaccctataa ttctcagatc acctattata tattatgcta catatgaaaa	1380
5	aaactaacag atatcatgga taatctcaca aaagttcgtg agtatctcaa gtcctattct	1440
	cgtctagatc aggcggtagg agagatagat gagatcgaag cacaacgagc tgaaaagtcc	1500
10	aattatgagt tgttccaaga ggacggagtg gaagagcata ctaggccctc ttattttcag	1560
	gcagcagatg attctgacac agaactctgaa ccagaaattg aagacaatca aggcttgtat	1620
	gtaccagatc eggaagctga gcaagttgaa ggctttatac aggggccttt agatgactat	1680
15	gcggtatgagg acgtggatgt tgtattcact tcggactgga aacagcctga gcttgaatcc	1740
	gacgagcatg gaaagacctt acggttgaca ttgccagagg gtttaagtgg agagcagaaa	1800
20	tcccagtggc ttttgacgat taaagcagtc gttcaaagtg ccaaactctg gaatctggca	1860
	gagtgacat ttgaagcatc gggagaaggg gtcatacata aaaagcgcca gataactccg	1920
25	gatgtatata aggtcactcc agtgatgaac acacatccgt cccaatcaga agccgtatca	1980
	gatgtttggt ctctctcaaa gacatccatg actttccaac ccaagaaagc aagtcttcag	2040
	cctctcacca tacccttggg tgaattgttc tcactctagag gagaattcat ctctgtcggg	2100
30	ggtaacggac gaatgtctca taaagaggcc atcctgctcg gtctgaggta caaaaagttg	2160
	tacaatcagg cgagagtcaa atattctctg tagactatga aaaaaagtaa cagatatcac	2220
35	aatctaagtg ttatcccaat ccattcatca tgagttcctt aaagaagatt ctcggtctga	2280
	aggggaaagg taagaaatct aagaaattag ggatcgcacc acccccttat gaagaggaca	2340
	ctaacatgga gtatgctccg agcgcctcaa ttgacaaatc ctatttttga gttgacgaga	2400
40	gggacactca tgatccgcat caattaagat atgagaaatt cttctttaca gtgaaaatga	2460
	cggttagatc taatcgtccg ttcagaacat actcagatgt ggagccgct gtatcccatt	2520
45	gggatcacat gtacatcgga atggcagggg aacgtccctt ctacaagatc ttggcttttt	2580
	tgggttcttc taatctaaag gccactccag cggatttggc agatcaaggt caaccagagt	2640
	atcacgctca ctgtgaagge agggcttatt tgccacacag aatggggaag acccctccca	2700
50	tgctcaatgt accagagcac ttcagaagac cattcaatat aggtctttac aagggaacgg	2760
	ttgagctcac aatgaccatc tacgatgatg agtcactgga agcagctcct atgatctggg	2820
55	atcatttcaa ttcttccaaa ttttctgatt tcagagagaa ggccttaatg tttggcctga	2880
	ttgtcgagaa aaaggcatct ggagcttggg tcctggattc tgtcagccac ttcaaatgag	2940
	ctagtctagc ttccagcttc tgaacaatcc ccggtttact cagtctctcc taattccagc	3000
60	ctttcgaaaca actaatatcc tgtcttttct atccctatga aaaaaactaa cagagatcga	3060
	tctgtttcct tgacaccatg aagtgccttt tgtacttagc tttttattc atcgggggtga	3120
65	attgcaagtt caccatagtt tttccataca accgaaaagg aaactggaaa aatgttcctt	3180

ES 2 319 424 T3

	ccaattacca	ttattgcccg	tcaagctcag	atttaaattg	gcataatgac	ttaataggca	3240
	cagccttaca	agtcaaaatg	cccaagagtc	acaaggctat	tcaagcagac	ggttggatgt	3300
5	gtcatgcttc	caaatgggtc	actacttggtg	atttccgctg	gtacggaccg	aagtatataa	3360
	cacattccat	ccgatccttc	actccatctg	tagaacaatg	caaggaaagc	attgaacaaa	3420
10	cgaaacaagg	aacttggctg	aatccaggct	tccctcctca	aagttgtgga	tatgcaactg	3480
	tgacggatgc	tgaagcagcg	attgtccagg	tgactcctca	ccatgtgctt	gttgatgaat	3540
	acacaggaga	atgggttgat	tcacagttca	tcaacggaaa	atgcagcaat	gacatatgcc	3600
15	ccactgtcca	taactccaca	acctggcatt	ccgactataa	ggtcaaaggg	ctatgtgatt	3660
	ctaacctcat	ttccatggac	atcaccttct	tctcagagga	cggagagcta	tcatccctag	3720
20	gaaaggaggg	cacagggttc	agaagtaact	actttgctta	tgaaactgga	gacaaggcct	3780
	gcaaaatgca	gtactgcaag	cattggggag	tcagactccc	atcaggtgtc	tggttcgaga	3840
25	tggctgataa	ggatctcttt	gctgcagcca	gattccctga	atgccagaa	gggtcaagta	3900
	tctctgctcc	atctcagacc	tcagtggatg	taagtctcat	tcaggacgtt	gagaggatct	3960
	tggattattc	cctctgccaa	gaaacctgga	gcaaaatcag	agcgggtctt	cccctctctc	4020
30	cagtggatct	cagctatctt	gctcctaaaa	accaggaac	cggtcctgtc	ttaccataa	4080
	tcaatggtac	cctaaaatac	tttgagacca	gatacatcag	agtcgatatt	gctgctccaa	4140
35	tcctctcaag	aatggtcggg	atgatcagtg	gaactaccac	agaaagggaa	ctgtgggatg	4200
	actgggctcc	atatgaagac	gtggaaattg	gacccaatgg	agttctgagg	accagttcag	4260
	gatataagtt	tcctttatat	atgattggac	atggtatggt	ggactccgat	cttcatctta	4320
40	gctcaaaggc	tcagggtggtt	gaacatcctc	acattcaaga	cgctgcttcg	cagcttcctg	4380
	atgatgagac	tttatTTTTT	ggtgatactg	ggctatccaa	aaatccaatc	gagttttag	4440
45	aaggttggtt	cagtagttgg	aagagctcta	ttgcctcttt	tttctttatc	atagggttaa	4500
	tcattggact	attcttggtt	ctccgagttg	gtatttatct	ttgcattaaa	ttaaagcaca	4560
	ccaagaaaag	acagatttat	acagacatag	agatgaaccg	acttggaag	taactcaaat	4620
50	cctgcacaac	agattcttca	tgtttgaacc	aaatcaactt	gtgatatcat	gctcaaagag	4680
	gccttaatta	tattttaatt	tttaattttt	atgaaaaaaaa	ctaacagcaa	tcatggaagt	4740
55	ccacgatttt	gagaccgacg	agttcaatga	tttcaatgaa	gatgactatg	ccacaagaga	4800
	attcctgaat	cccgatgagc	gcgatgacgta	cttgaatcat	gctgattaca	atttgaattc	4860
	tcctctaatt	agtgatgata	ttgacaattt	gatcaggaaa	ttcaattctc	ttccgattcc	4920
60	ctcgatgtgg	gatagtaaga	actgggatgg	agttcttgag	atgttaacat	catgtcaagc	4980
	caatcccatc	tcaacatctc	agatgcataa	atggatggga	agttggttaa	tgtctgataa	5040
65	tcatgatgcc	agtcaagggg	atagtttttt	acatgaagtg	gacaaagagg	cagaaataac	5100

ES 2 319 424 T3

atttgacgtg gtggagacct tcatccgagg ctggggcaac aaaccaattg aatacatcaa 5160
 aaaggaaaga tggactgact cattcaaaat tctcgcttat ttgtgtcaaa agtttttggg 5220
 5 cttacacaag ttgacattaa tcttaaatgc tgtctctgag gtggaattgc tcaacttggc 5280
 gaggactttc aaaggcaaag tcagaagaag ttctcatgga acgaacatat gcaggcttag 5340
 10 ggttcccagc ttgggtccta cttttatttc agaaggatgg gcttacttca agaaacttga 5400
 tattctaata gaccgaaact ttctgttaat ggtcaaagat gtgattatag ggaggatgca 5460
 aacggtgcta tccatgggat gtagaataga caacctgttc tcagagcaag acatcttctc 5520
 15 ccttctaaat atctacagaa ttggagataa aattgtggag aggcagggaa atttttctta 5580
 tgacttgatt aaaatgggtg aaccgatatg caacttgagg ctgatgaaat tagcaagaga 5640
 20 atcaaggcct ttagtcccac aattccctca ttttgaaaat catatcaaga cttctgttga 5700
 tgaaggggca aaaattgacc gaggtataag attcctccat gatcagataa tgagtgtgaa 5760
 aacagtggat ctcaactgg tgatztatgg atcgttcaga cattgggggtc atccttttat 5820
 25 agattattac gctggactag aaaaattaca ttccaagta accatgaaga aagatattga 5880
 tgtgtcatat gcaaaaagcac ttgcaagtga ttagctcgg attgttctat ttcaadagtt 5940
 30 caatgatcat aaaaagtgg tctggaatgg agacttgctc cctcatgatc atccctttaa 6000
 aagtcatggt aaagaaaata catggcccac agctgctcaa gttcaagatt ttggagataa 6060
 atggcatgaa cttccgctga ttaaatgttt tgaataccc gacttactag acccatcgat 6120
 35 aatatactct gacaaaagtc attcaatgaa taggtcagag gtgttgaaac atgtccgaat 6180
 gaatccgaac actcctatcc ctagtaaaaa ggtgttgag actatgttgg acacaaaggc 6240
 40 taccaattgg aaagaatttc ttaaagagat tgatgagaag ggcttagatg atgatgatct 6300
 aattattggc cttaaaggaa aggagagggg actgaagttg gcaggtagat ttttctccct 6360
 aatgtcttgg aaattgagag aatactttgt aattaccgaa tatttgataa agactcattt 6420
 45 cgtccctatg tttaaaggcc tgacaatggc ggacgatcta actgcagtca ttaaaaagat 6480
 gttagattcc tcatccggcc aaggattgaa gtcatatgag gcaatttgca tagccaatca 6540
 50 cattgattac gaaaaatgga ataaccacca aaggaagtta tcaaacggcc cagtgttccg 6600
 agttatgggc cagttcttag gttatccatc cttaatcgag agaactcatg aattttttga 6660
 gaaaagtctt atatactaca atggaagacc agacttgatg cgtgttcaca acaacacact 6720
 55 gatcaattca acctcccac gagtttggg gcaaggacaa gaggggtggac tggaaaggtct 6780
 acggcaaaaa ggatggagta tctcaatct actggttatt caaagagagg ctaaaatcag 6840
 60 aaacactgct gtcaaagtct tggcacaagg tgataatcaa gttatttgca cacagtataa 6900
 aacgaagaaa tcgagaaacg ttgtagaatt acagggtgct ctcaatcaaa tggtttctaa 6960
 65 taatgagaaa attatgactg caatcaaaat agggacaggg aagttaggac ttttgataaa 7020

ES 2 319 424 T3

5 tgacgatgag actatgcaat ctgcagatta cttgaattat ggaaaaatac cgattttccg 7080
 tggagtgatt agagggttag agaccaagag atggtcacga gtgacttgtg tcaccaatga 7140
 ccaaataccc acttgtgcta atataatgag ctcagtttcc acaaatgctc tcaccgtagc 7200
 tcattttgct gagaacccaa tcaatgccat gatacagtac aattattttg ggacatttgc 7260
 10 tagactcttg ttgatgatgc atgatcctgc tcttcgtcaa tcattgtatg aagttcaaga 7320
 taagataccg ggcttgcaca gttctacttt caaatacgcc atgttgtatt tggacccttc 7380
 cattggagga gtgtcgggca tgtctttgtc caggtttttg attagagcct tcccagatcc 7440
 15 cgtaacagaa agtctctcat tctggagatt catccatgta catgctcgaa gtgagcatct 7500
 gaaggagatg agtgcagtat ttggaaacct cgagatagcc aagtttcgaa taactcacat 7560
 20 agacaagcta gtagaagatc caacctctct gaacatcgct atgggaatga gtccagcgaa 7620
 cttgtaaag actgaggtta aaaaatgctt aatcgaatca agacaaacca tcaggaacca 7680
 ggtgattaag gatgcaacca tatatttgta tcatgaagag gatcggctca gaagtttctt 7740
 25 atggtcaata aatcctctgt tccctagatt ttaagtga ttcaaatacag gcactttttt 7800
 gggagtcgca gacgggctca tcagtctatt tcaaaattct cgtactattc ggaactcctt 7860
 30 taagaaaaag tatcataggg aattggatga tttgattgtg aggagtgagg tatcctcttt 7920
 gacacattta gggaaacttc atttgagaag gggatcatgt aaaatgtgga catgttcagc 7980
 tactcatgct gacacattaa gatacaaatc ctggggccgt acagttattg ggacaactgt 8040
 35 accccatcca ttagaaatgt tgggtccaca acatcgaaaa gagactcctt gtgcaccatg 8100
 taacacatca gggttcaatt atgtttctgt gcattgtcca gacgggatcc atgacgtctt 8160
 40 tagttcacgg ggaccattgc ctgcttatct agggctctaaa acatctgaat ctacatctat 8220
 tttgagcct tgggaaaggg aaagcaaagt cccactgatt aaaagagcta cacgtcttag 8280
 agatgctatc tcttggtttg ttgaaccgca ctctaaacta gcaatgacta tactttctaa 8340
 45 catccactct ttaacaggcg aagaatggac caaaaggcag catgggttca aaagaacagg 8400
 gtctgccctt cataggtttt cgacatctcg gatgagccat ggtgggttcg catctcagag 8460
 50 cactgcagca ttgaccaggt tgatggcaac tacagacacc atgagggatc tgggagatca 8520
 gaatttcgac tttttattcc aggcaacggt gctctatgct cagattacca ccaactgttgc 8580
 aagagacgga tggatcacca gttgtacaga tcattatcat attgcctgta agtcoctggtt 8640
 55 gagaccata gaagagatca ccctggactc aagtatggac tacacgcccc cagatgtatc 8700
 ccatgtgctg aagacatgga ggaatgggga aggttcgtgg ggacaagaga taaaacagat 8760
 60 ctatccttta gaaggaatt ggaagaattt agcacctgct gagcaatcct atcaagtcgg 8820
 cagatgtata ggttttctat atggagactt ggcgtataga aaatctactc atgccgagga 8880
 65 cagttctcta tttctctat ctatacaagg tcgtattaga ggtcgaggtt tottaaaagg 8940

ES 2 319 424 T3

gttgctagac ggattaatga gagcaagttg ctgccaagta atacaccgga gaagtctggc 9000
 tcatttgaag aggccggcca acgcagtgta cggaggtttg atttacttga ttgataaatt 9060
 5 gagtgtatca cctccattcc tttctcttac tagatcagga cctattagag acgaattaga 9120
 aacgattccc cacaagatcc caacctccta tccgacaagc aaccgtgata tgggggtgat 9180
 10 tgtcagaaat tacttcaaat accaatgccc tctaattgaa aagggaaaat acagatcaca 9240
 ttattcaciaa ttatggttat tctcagatgt cttatccata gacttcattg gaccattctc 9300
 tatttccacc accctcttgc aaatcctata caagccattt ttatctggga aagataagaa 9360
 15 tgagttgaga gagctggcaa atctttcttc attgctaaga tcaggagagg ggtgggaaga 9420
 catacatgta aaattcttca ccaaggacat attattgtgt ccagaggaaa tcagacatgc 9480
 20 ttgcaagttc gggattgcta aggataataa taaagacatg agctatcccc cttggggaag 9540
 ggaatccaga gggacaatta caacaatccc tgtttattat acgaccacc cttacccaaa 9600
 gatgctagag atgcctcaa gaatccaaaa tcccctgctg tccggaatca ggttgggcca 9660
 25 gttaccaact ggcgctcatt ataaaattcg gagtatatta catggaatgg gaatccatta 9720
 cagggacttc ttgagttgtg gagacggctc cggagggatg actgctgcat tactacgaga 9780
 30 aaatgtgcat agcagaggaa tattcaatag tctgttagaa ttatcagggt cagtcatgcg 9840
 aggcgcctct cctgagcccc ccagtgcctt agaaacttta ggaggagata aatcgagatg 9900
 tgtaaattgg gaaacatgtt gggaaatccc atctgactta tgtgacccaa ggacttggga 9960
 35 ctatttcctc cgactcaaag caggcttggg gcttcaaatt gatttaattg taatggatat 10020
 ggaagttcgg gattcttcta ctagcctgaa aattgagacg aatgttagaa attatgtgca 10080
 40 ccggatthttg gatgagcaag gagttttaat ctacaagact tatggaacat atatttgtga 10140
 gagcgaaaag aatgcagtaa caatccttgg tcccatgttc aagacggctc acttagttca 10200
 45 aacagaattt agtagttctc aaacgtctga agtatatatg gtatgtaaag gtttgaagaa 10260
 attaatcgat gaaccaatc ccgattggtc ttccatcaat gaatcctgga aaaacctgta 10320
 cgcattccag tcatcagaac aggaatttgc cagagcaaag aaggttagta catactttac 10380
 50 cttgacaggt attccctccc aattcattcc tgatcctttt gtaaacattg agactatgct 10440
 acaaatattc ggagtacca cgggtgtgtc tcatgcggtc gccttaaaat catctgatag 10500
 55 acctgcagat ttattgacca ttagcctttt ttatatggcg attatatcgt attataacat 10560
 caatcatatc agagtaggac cgatacctcc gaacccccca tcagatggaa ttgcacaaaa 10620
 tgtggggatc gctataactg gtataagctt ttggctgagt ttgatggaga aagacattcc 10680
 60 actatatcaa cagtgtttag cagttatcca gcaatcattc ccgattaggt gggaggctgt 10740
 ttcagtaaaa ggaggataca agcagaagtg gagtactaga ggtgatgggc tcccaaaaaga 10800
 65 taccgaatt tcagactcct tggcccaat cgggaactgg atcagatctc tgggaattggt 10860

ES 2 319 424 T3

```

ccgaaaccaa gttcgtctga atccattcaa tgagatcttg ttcaatcagc tatgtegtac 10920
agtggataat catttgaat ggtcaaattt gcgaaaaaac acaggaatga ttgaatggat 10980
5 caatagacga atttcaaaag aagaccggtc tatactgatg ttgaagagtg acctacatga 11040
ggaaaactct tggagagatt aaaaaatcat gaggagactc caaactttaa gtatgaaaaa 11100
10 aactttgatc cttaagacco tcttgtgggt tttatTTTTT atctggTTTT gtggctctcg 11160
t 11161

```

```

15 <210> 2
    <211> 690
    <212> ADN
    <213> Virus de la estomatitis vesicular
20
    <400> 2

```

```

atgagttcct taaagaagat tctcggctctg aaggggaaag gtaagaaatc taagaaatta 60
25 gggatcgcac caccocctta tgaagaggac actaacatgg agtatgctcc gagcgcctcca 120
attgacaaat cctatTTTTg agttgacgag atggacactc atgatccgca tcaattaaga 180
30 tatgagaaat tcttctttac agtgaaaatg acggttagat ctaatcgtcc gttcagaaca 240
tactcagatg tggcagccgc tgtatcccat tgggatcaca tgtacatcgg aatggcaggg 300
35 aaacgtccct tctacaagat cttggctttt ttgggttctt ctaatctaaa ggccactcca 360
gcggtattgg cagatcaagg tcaaccagag tatcacgctc actgtgaagg cagggcttat 420
ttgccacaca gaatggggaa gaccocctcc atgctcaatg taccagagca cttcagaaga 480
40 ccattcaata taggtcttta caagggaacg gttgagctca caatgacat ctacgatgat 540
gagtcactgg aagcagctcc tatgatctgg gatcatttca attcttcaa attttctgat 600
45 ttcagagaga aggccttaat gtttggcctg attgtcgaga aaaaggcatc tggagcttgg 660
ttcctggatt ctgtcagaca cttcaaatga 690

```

```

50 <210> 3
    <211> 229
    <212> PRT
    <213> Virus de la estomatitis vesicular

```

55

60

65

ES 2 319 424 T3

<400> 3

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

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

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

20 Asp Glu Arg Asp Thr His Asp Pro His Gln Leu Arg Tyr Glu Lys Phe
50 55 60

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Val Ser His Phe Lys
225

ES 2 319 424 T3

<210> 4

<211> 11161

<212> ADN

5 <213> Virus de la estomatitis vesicular

<400> 4

```
10      acgaagacaa acaaaccatt attatcatta aaaggctcag gagaaacttt aacagtaatc      60
      aaaatgtctg ttacagtcaa gagaatcatt gacaacacag tcatagttcc aaaacttcct      120
15      gcaaatgagg atccagtgga ataccggca gattacttca gaaaatcaaa ggagattcct      180
      ctttacatca atactacaaa aagtttgtca gatctaagag gatatgtcta ccaaggcctc      240
      aaatccggaa atgtatcaat catacatgtc aacagctact tgtatggagc attgaaggac      300
20      atccggggta agttggataa agattggcga agtttcggaa taaacatcgg gaaggcaggg      360
```

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 319 424 T3

	gatacaatcg gaatatttga ccttgtatcc ttgaaagccc tggacggtgt acttccagat	420
	ggagtatcgg atgcttccag aaccagcgca gatgacaaat ggttgccttt gtatctactt	480
5	ggcttataca gagtgggcag aacacaaatg cctgaataca gaaaaaggct catggatggg	540
	ctgacaaatc aatgcaaaat gatcaatgaa cagtttgaac ctcttgtgcc agaaggctgt	600
10	gacatttttg atgtgtgggg aaatgacagt aattacacaa aaattgtcgc tgcagtggac	660
	atgttcttcc acatgttcaa aaaacatgaa tgtgcctcgt tcagatacgg aactattggt	720
15	tccagattca aagattgtgc tgcattggca acatttggac acctctgcaa aataaccgga	780
	atgtctacag aagatgtaac gacctggatc ttgaaccgag aagttgcaga tgagatggtc	840
	caaatgatgc ttccaggcca agaaattgac aaggccgatt catacatgcc ttatttgate	900
20	gactttggat tgtcttctaa gtctccatat tcttccgtca aaaaccctgc cttccacttc	960
	tgggggcaat tgacagctct tctgctcaga tccaccagag caaggaatgc ccgacagcct	1020
25	gatgacattg agtatacatc tcttactaca gcaggtttgt tgtacgctta tgcagtagga	1080
	tcctctgctg acttggcaca acagttttgt gttggagata gcaaatacac tccagatgat	1140
	agtaccggag gattgacgac taatgcaccg ccacaaggca gagatgtggt cgaatggctc	1200
30	ggatggtttg aagatcaaaa cagaaaaccg actcctgata tgatgcagta tgcgaaacga	1260
	gcagtcattg cactgcaagg cctaagagag aagacaattg gcaagtatgc taagtcaaaa	1320
35	tttgacaaat gaccctataa ttctcagatc acctattata tattatgcta catatgaaaa	1380
	aaactaacag atatcatgga taatctcaca aaagtctgtg agtatctcaa gtcctattct	1440
	cgtctagatc aggcggtagg agagatagat gagatcgaag cacaacgagc tgaaaagtcc	1500
40	aattatgagt tgttccaaga ggacggagtg gaagagcata ctaggccttc ttattttcag	1560
	gcagcagatg attctgacac agaactctgaa ccagaaattg aagacaatca aggcttgtat	1620
45	gtaccagatc cggaagctga gcaagttgaa ggctttatac aggggccttt agatgactat	1680
	gcggatgagg acgtggatgt tgtattcact tcggactgga aacagcctga gcttgaatcc	1740
	gacgagcatg gaaagacctt acggttgaca ttgccagagg gtttaagtgg agagcagaaa	1800
50	tcccagtggc ttttgacgat taaagcagtc gttcaaagtg ccaaactctg gaatctggca	1860
	gagtgcacat ttgaagcatc gggagaaggg gtcatacataa aaaagcgcca gataactccg	1920
55	gatgtatata aggtcactcc agtgatgaac acacatccgt cccaatcgga agccgtatca	1980
	gatgtttggt ctctctcaaa gacatccatg actttccaac ccaagaaagc aagtcttcag	2040
	cctctcacca tatccttggg tgaattgttc tcactctagag gagaattcat ctctgtcggg	2100
60	ggtaacggac gaatgtctca taaagaggcc atcctgctcg gtctgaggta caaaaagttg	2160
	tacaatcagg cgagagtcaa atattctctg tagactatga aaaaaagtaa cagatatcac	2220
65	aatctaagtg ttatcccaat ccattcatca tgagttcctt aaagaagatt ctcggtctga	2280

ES 2 319 424 T3

	aggggaaagg taagaaatct aagaaattag ggatcgcacc acccccttat gaagaggaca	2340
	ctaacatgga gtatgctccg agcgcctcaa ttgacaaatc ctattttgga gttgacgaga	2400
5	tggacactca tgatccgcat caattaagat atgagaaatt cttctttaca gtgaaaatga	2460
	cggttagatc taatcgctccg ttcagaacat actcagatgt ggcagccgct gtatcccatt	2520
10	gggatcacat gtacatcgga atggcagggg aacgtccctt ctacaagatc ttggcttttt	2580
	tgggttcttc taatctaaag gccactccag cggatttggc agatcaaggt caaccagagt	2640
	atcacgctca ctgtgaaggc agggcttatt tgccacacag aatggggaag acccctccca	2700
15	tgctcaatgt accagagcac ttcagaagac cattcaatat aggtctttac aagggaacgg	2760
	ttgagctcac aatgaccatc tacgatgatg agtcactgga agcagctcct atgatctggg	2820
20	atcatttcaa ttcttccaaa ttttctgatt tcagagagaa ggccttaatg tttggcctga	2880
	ttgtcgagaa aaaggcatct ggagcttggg tcctggattc tgtcagacac ttcaaagag	2940
	ctagtctagc ttccagcttc tgaacaatcc cgggtttact cagtctctcc taattccagc	3000
25	ctttcgaaca actaatatcc tgtcttttct atccctatga aaaaaactaa cagagatcga	3060
	tctgtttcct tgacaccatg aagtgccttt tgtacttagc ttttttattc atcgggggtga	3120
30	attgcaagtt caccatagtt tttccataca accaaaaagg aaactggaaa aatgttcctt	3180
	ccaattacca ttattgcccc tcaagctcag atttaaattg gcataatgac ttaataggca	3240
	cagccttaca agtcaaaaatg cccaagagtc acaaggctat tcaagcagac ggttggatgt	3300
35	gtcatgcttc caaatgggtc actacttgtg atttccgctg gtacggaccg aagtatataa	3360
	cacattccat ccgatccttc actccatctg tagaacaatg caaggaaagc attgaacaaa	3420
40	cgaaacaagg aacttggctg aatccaggct tccctcctca aagttgtgga tatgcaactg	3480
	tgacggatgc tgaagcagcg attgtccagg tgactcctca ccatgtgctt gttgatgaat	3540
	acacaggaga atgggttgat tcacagttca tcaacggaaa atgcagcaat gacatatgcc	3600
45	ccactgtcca taactccaca acctggcatt ccgactataa ggtcaaaggg ctatgtgatt	3660
	ctaacctcat ttccatggac atcaccttct tctcagagga cggagagcta tcatccctag	3720
50	gaaaggaggg cacaggggtc agaagtaact actttgctta tgaaactgga gacaaggcct	3780
	gcaaaaatgca gtactgcaag cgttgggggag tcagactccc atcaggtgta tggttcgaga	3840
	tggctgataa ggatctcttt gctgcagcca gattccctga atgccagaa ggggtcaagta	3900
55	tctctgctcc atctcagacc tcagtggatg taagtctcat tcaggacggt gagaggatct	3960
	tggattattc cctctgcaa gaaacctgga gcaaaatcag agcgggtctt cccatctctc	4020
60	cagtggatct cagctatctt gctcctaaaa acccaggaac cggctctgtc tttaccataa	4080
	tcaatggtag cctaaaatac tttgagacca gatacatcag agtcgatatt gctgctccaa	4140
65	tcctctcaag aatggctcgga atgatcagtg gaactaccac agaaagggaa ctgtgggatg	4200

ES 2 319 424 T3

actgggctcc atatgaagac gtggaaattg gacccaatgg agttctgagg accagttcag 4260
 gatataagtt tcctttatat atgattggac atgggatggt ggactccgat cttcatctta 4320
 5 gctcaaagge tcaggtgttt gaacatcctc acattcaaga cgctgctgcg cagcttcctg 4380
 atgatgagac tttatttttt ggtgatactg ggctatccaa aaatccaatc gagtttgtag 4440
 10 aagggtgggt cagtagttgg aagagctcta ttgcctcttt tttctttatc atagggttaa 4500
 tcattggact attcctgggt ctccgagttg gtatttatct ttgcattaaa ttaaagcaca 4560
 ccaagaaaag acagatttat acagacatag agatgaaccg acttgggaag taactcaaat 4620
 15 cctgcacaac agattcttca tgtttgaacc aaatcaactt gtgatatcat gctcaaagag 4680
 gccttaatta tattttaatt tttatTTTT atgaaaaaaaa ctaacagcaa tcatggaagt 4740
 20 ccacgatttt gagaccgacg agttcaatga tttcaatgaa gatgactatg ccacaagaga 4800
 attcctgaat cccgatgagc gcatgacgta cttgaatcat gctgattaca atttgaattc 4860
 tcctctaatt agtgatgata ttgacaattt gatcaggaaa ttcaattctc ttccgattcc 4920
 25 ctcgatgtgg gatagtaaga actgggatgg agttcttgag atgttaacat catgtcaagc 4980
 caatcccatc tcaacatctc agatgcataa atggatggga agttgggttaa tgtctgataa 5040
 30 tcatgatgcc agtcaagggt atagtttttt acatgaagtg gacaaagagg cagaaataac 5100
 atttgacgtg gtggagacct tcatccgagg ctggggcaac aaaccaattg aatacatcaa 5160
 aaaggaaaga tggactgact cattcaaaat tctcgttat ttgtgtcaaa agtttttggga 5220
 35 cttacacaag ttgacattaa tcttaaatgc tgtctctgag gtggaattgc tcaacttggc 5280
 gaggactttc aaaggcaaag tcagaagaag ttctcatgga acgaacatat gcaggcttag 5340
 40 ggttcccagc ttgggtccta cttttatttc agaaggatgg gcttacttca agaaacttga 5400
 tattctaatt gaccgaaact ttctgttaat ggtcaaagat gtgattatag ggaggatgca 5460
 aacggtgcta tccatggtat gtagaataga caacctgttc tcagagcaag acatcttctc 5520
 45 ccttctaatt atctacagaa ttggagataa aattgtggag aggcagggaa atttttctta 5580
 tgacttgatt aaaatggtgg aaccgatatg caacttgaag ctgatgaaat tagcaagaga 5640
 50 atcaaggcct ttagtcccac aattccctca ttttgaaaat catatcaaga cttctgttga 5700
 tgaaggggca aaaattgacc gaggtataag attcctccat gatcagataa tgagtgtgaa 5760
 aacagtggat ctcaactggt tgatttatgg atcgttcaga cattggggtc atccttttat 5820
 55 agattattac gctggactag aaaaattaca ttcccaagta accatgaaga aagatattga 5880
 tgtgtcatat gcaaaagcac ttgcaagtga tttagctcgg attgttctat ttcaacagtt 5940
 60 caatgatcat aaaaagtggc tcgtgaatgg agacttgctc cctcatgatc atccctttaa 6000
 aagtcattgtt aaagaaaata catggcccac agctgctcaa gttcaagatt ttggagataa 6060
 atggcatgaa cttccgctga ttaaattgtt tgaaataccg gacttactag acccatcgat 6120
 65

ES 2 319 424 T3

aatatactct gacaaaagtc attcaatgaa taggtcagag gtggtgaaac atgtccgaat 6180
 gaatccgaac actcctatcc ctagtaaaaa ggtggtgcag actatggttg acacaaaaggc 6240
 5 taccaattgg aaagaatttc ttaaagagat tgatgagaag ggcttagatg atgatgatct 6300
 aattattggt cttaaaggaa aggagagggga actgaagttg gcaggtagat ttttctccct 6360
 10 aatgtcttgg aaattgcgag aatactttgt aattaccgaa tatttgataa agactcattt 6420
 cgtccctatg tttaaaggcc tgacaatggc ggacgatcta actgcagtca ttaaaaagat 6480
 gttagattcc tcatccggcc aaggattgaa gtcatatgag gcaatttgca tagccaatca 6540
 15 cattgattac gaaaaatgga ataaccacca aaggaagtta tcaaacggcc cagtgttccg 6600
 agttatgggc cagttcttag gttatccate cttaatcgag agaactcatg aattttttga 6660
 20 gaaaagtctt atatactaca atggaagacc agacttgatg cgtgttcaca acaacacact 6720
 gatcaattca acctcccaac gagtttggtg gcaaggacaa gagggtggac tggaaggctc 6780
 acggcaaaaa ggatggagta tcctcaatct actggttatt caaagagagg ctaaaatcag 6840
 25 aaacactgct gtcaaagtct tggcacaagg tgataatcaa gttatttgca cacagtataa 6900
 aacgaagaaa tcgagaaacg ttgtagaatt acaggggtgct ctcaatcaaa tggtttctaa 6960
 30 taatgagaaa attatgactg caatcaaaat agggacaggg aagttaggac ttttgataaa 7020
 tgacgatgag actatgcaat ctgcagatta cttgaattat ggaaaaatac cgattttccg 7080
 tggagtgatt agagggttag agaccaagag atggtcacga gtgacttggtg tcaccaatga 7140
 35 ccaaatacc acttgtgcta atataatgag ctcaagttcc acaaatgctc tcaccgtagc 7200
 tcattttgct gagaacccaa tcaatgccat gatacagtac aattattttg ggacatttgc 7260
 40 tagactcttg ttgatgatgc atgatcctgc tcttcgtcaa tcattgtatg aagttcaaga 7320
 taagataccg ggcttgcaca gttctacttt caaatacgcc atggtgtatt tggacccttc 7380
 cattggagga gtgtcgggca tgtctttgtc cagggttttg attagagcct tcccagatcc 7440
 45 cgtaacagaa agtctctcat tctggagatt catccatgta catgctcgaa gtgagcatct 7500
 gaaggagatg agtgcagtat ttggaaaccc cgagatagcc aagtttcgaa taactcacat 7560
 50 agacaagcta gtagaagatc caacctctct gaacatcgct atgggaatga gtccagcgaa 7620
 cttgttaaag actgaggtta aaaaatgctt aatcgaatca agacaaacca tcaggaacca 7680
 55 ggtgattaag gatgcaacca tatatttgta tcatgaagag gatcggctca gaagtttctt 7740
 atggtcaata aatcctctgt tccttagatt tttaaagtga ttcaaactag gcactttttt 7800
 gggagtcgca gacgggctca tcagtctatt tcaaaattct cgtactattc ggaactcctt 7860
 60 taagaaaaag tatcataggg aattggatga tttgattgtg aggagtgagg taccctcttt 7920
 gacacattta gggaaacttc atttgagaag gggatcatgt aaaatgtgga catgttcagc 7980
 65 tactcatgct gacacattaa gatacaaatc ctggggccgt acagttattg ggacaactgt 8040

ES 2 319 424 T3

accccatcca ttagaaatgt tgggtccaca acatcgaaaa gagactcctt gtgcaccatg 8100
 taacacatca gggttcaatt atgtttctgt gcattgtcca gacgggatcc atgacgtctt 8160
 5 tagttcacgg ggaccattgc ctgcttatct agggctctaaa acatctgaat ctacatctat 8220
 tttgcagcct tgggaaaggg aaagcaaagt cccactgatt aaaagagcta cacgtcttag 8280
 10 agatgctatc tcttggtttg ttgaaccoga ctctaaacta gcaatgacta tactttctaa 8340
 catccactct ttaacaggcg aagaatggac caaaaggcag catgggttca aaagaacagg 8400
 gtctgccctt cataggtttt cgacatctcg gatgagccat ggtgggttcg catctcagag 8460
 15 cactgcagca ttgaccaggt tgatggcaac tacagacacc atgagggatc tgggagatca 8520
 gaatttcgac tttttattcc aggcaacggt gctctatgct cagattacca ccaactgttg 8580
 20 aagagacgga tggatcacca gttgtacaga tcattatcat attgcctgta agtcctgttt 8640
 gagaccata gaagagatca ccctggactc aagtatggac tacacgcccc cagatgtatc 8700
 ccatgtgctg aagacatgga ggaatgggga aggttcgtgg ggacaagaga taaaacagat 8760
 25 ctatccttta gaaggggaatt ggaagaattt agcacctgct gagcaatcct atcaagtcgg 8820
 cagatgtata ggttttctat atggagactt ggcgtataga aaatctactc atgccgagga 8880
 30 cagttctcta tttcctctat ctatacaagg tcgtattaga ggtcgagggt tcttaaaagg 8940
 gttgctagac ggattaatga gagcaagttg ctgccaaagta atacaccgga gaagtctggc 9000
 tcatttgaag aggccggcca acgcagtgta cggaggtttg atttacttga ttgataaatt 9060
 35 gagtztatca cctccattcc tttctcttac tagatcagga cctattagag acgaattaga 9120
 aacgattccc cacaagatcc caacctccta tccgacaagc aaccgtgata tgggggtgat 9180
 40 tgtcagaaat tacttcaaat accaatgccg tctaattgaa aagggaaaat acagatcaca 9240
 ttattcaciaa ttatggttat tctcagatgt cttatccata gacttcattg gaccattctc 9300
 tatttcacc accctcttgc aaatcctata caagccattt ttatctggga aagataagaa 9360
 45 tgagttgaga gagctggcaa atctttcttc attgctaaga tcaggagagg ggtgggaaga 9420
 catacatgta aaattcttca ccaaggacat attattgtgt ccagaggaaa tcagacatgc 9480
 50 ttgcaagttc gggattgcta aggataataa taaagacatg agctatcccc cttggggaag 9540
 ggaatccaga gggacaatta caacaatccc tgtttattat acgaccaccc cttacccaaa 9600
 gatgctagag atgcctcaa gaatccaaaa tcccctgctg tccggaatca ggttgggcca 9660
 55 gttaccaact ggcgctcatt ataaaattcg gagtatatta catggaatgg gaatccatta 9720
 cagggacttc ttgagttgtg gagacggctc cggagggatg actgctgcat tactacgaga 9780
 60 aaatgtgcat agcagaggaa tattcaatag tctgttagaa ttatcagggt cagtcatgcg 9840
 aggcgcctct cctgagcccc ccagtgcctt agaaacttta ggaggagata aatcgagatg 9900
 65 tgtaaatggg gaaacatggt gggaaatccc atctgactta tgtgacccaa ggacttggga 9960

ES 2 319 424 T3

ctatttcctc cgactcaaag caggcttggg gcttcaaatt gatttaattg taatggatat 10020
 ggaagttcgg gattcttcta ctagcctgaa aattgagacg aatgtagaa attatgtgca 10080
 5 ccgatttttg gatgagcaag gagttttaat ctacaagact tatggaacat atatttgtga 10140
 gagcgaaaag aatgcagtaa caatccttgg tcccatgttc aagacggtcg acttagttca 10200
 10 aacagaattt agtagttctc aaacgtctga agtatatatg gtatgtaaag gtttgaagaa 10260
 attaatcgat gaaccaatc cegattggtc ttccatcaat gaatcctgga aaaacctgta 10320
 cgcattccag tcatcagaac aggaatttgc cagagcaaag aaggtagta catactttac 10380
 15 cttgacaggt attccctccc aattcattcc tgatcctttt gtgaacattg agactatgct 10440
 acaaatattc ggagtacca cgggtgtgtc tcatgaggct gccttaaaat catctgatag 10500
 20 acctgcagat ttattgacca ttagcctttt ttatatggcg attatatcgt attataacat 10560
 caatcatatc agagtaggac cgatacctcc gaacccccca tcagatggaa ttgcacaaaa 10620
 tgtggggatc gctataactg gtataagctt ttggctgagt ttgatggaga aagacattcc 10680
 25 actatatcaa cagtgtttag cagttatcca gcaatcattc ccgattaggt gggaggctgt 10740
 ttcagtaaaa ggaggataca agcagaagtg gactactaga ggtgatgggc tcccaaaaga 10800
 30 taccogaatt tcagactcct tggccccaat cgggaactgg atcagatctc tgggaattggt 10860
 cggaaacca gttcgtctga atccattcaa tgagatcttg ttcaatcagc tatgtcgtac 10920
 agtgataat catttgaaat ggtcaaattt gcgaaaaaac acaggaatga ttgaatggat 10980
 35 caatagacga atttcaaaag aagaccggtc tatactgatg ttgaagagtg acctacatga 11040
 ggaaaactct tggagagatt aaaaaatcat gaggagactc caaactttaa gtatgaaaaa 11100
 40 aactttgatc cttaagacc ccttgtgggt tttatttttt atctggtttt gtggtcttcg 11160
 t 11161

<210> 5

45 <211> 690

<212> ADN

<213> Virus de la estomatitis vesicular

50 <400> 5

atgagttcct taaagaagat tctcggctctg aaggggaaaag gtaagaaatc taagaaatta 60
 gggatcgcac caccctta tgaagaggac actaacatgg agtatgctcc gagcgtcca 120
 55 attgacaaat cctatttttg agttgacgag agggacactc atgatccgca tcaattaaga 180
 tatgagaaat tcttctttac agtgaaaatg acggtagat ctaatcgtcc gttcagaaca 240
 60 tactcagatg tggcagccgc tgtatcccat tgggatcaca tgtacatcgg aatggcaggg 300
 aaacgtccct tctacaagat cttggctttt ttgggttctt ctaatctaaa ggccactcca 360
 65 gcggatttgg cagatcaagg tcaaccagag tatcacgctc actgtgaagg cagggttat 420

ES 2 319 424 T3

ttgccacaca gaatggggaa gacctctccc atgctcaatg taccagagca cttcagaaga 480
 ccattcaata taggtcttta caagggaaacg gttgagctca caatgacat ctacgatgat 540
 5 gagtcaactgg aagcagctcc tatgatctgg gatcatttca attcttccaa attttctgat 600
 ttcagagaga aggccttaat gtttggcctg attgtcgaga aaaaggcatc tggagcttgg 660
 gtccctggatt ctgtcagcca cttcaaatga 690

10 <210> 6

<211> 229

<212> PRT

15 <213> Virus de la estomatitis vesicular

<400> 6

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

ES 2 319 424 T3

<210> 7
<211> 41
<212> ADN
5 <213> Artificial

<400> 7
 atcgctcgag aacagatgac tacaaagacg atgacgacaa g 41

10 <210> 8
<211> 45
<212> ADN
15 <213> Artificial

<220>
<223> Cebador de PCR

20 <400> 8
 atcggctagc agttttttc agggatccag ctctaggtgg gctgc 45

25 <210> 9
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

30 <220>
<223> Cebador de PCR

35 <400> 9
 ttgtgcttct ccactacagc 20

<210> 10
40 <211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

45 <220>
<223> Cebador de PCR

<400> 10
50 **ctgtaagtct gtaatgaag** 20

<210> 11
<211> 21
55 <212> ADN
<213> Artificial

<220>
60 <223> Cebador de PCR

<400> 11
 tgacactggc aaaacaatgc a 21

65 <210> 12
<211> 21

ES 2 319 424 T3

<212> ADN
<213> Artificial

5 <220>
<223> Cebador de PCR

<400> 12
10 **ggtccttttc accagcaagc t** 21

<210> 13
<211> 21

15 <212> ADN
<213> Artificial

<220>
20 <223> Cebador de PCR

<400> 13
25 **atggttggtt ccgaagtgga c** 21

<210> 14
<211> 21
<212> ADN

30 <213> Artificial

<220>
<223> Cebador de PCR

35 <400> 14
tttcttcagt ttcagcacca g 21

<210> 15
40 <211> 24
<212> ADN
<213> Artificial

45 <220>
<223> Cebador de PCR

50 <400> 15
atgtctgta cagtcaagag aatc 24

<210> 16
55 <211> 27
<212> ADN
<213> Artificial

60 <220>
<223> Cebador de PCR

<400> 16
65 **tcatttgta aattctgact tagcata** 27

<210> 17

ES 2 319 424 T3

<211> 28
<212> ADN
<213> Artificial
5
<220>
<223> Cebador de PCR
10 <400> 17
 tacaccagtg gcaagtgctc caaccag **28**

<210> 18
15 <211> 28
<212> ADN
<213> Artificial

20 <220>
<223> Cebador de PCR

<400> 18
25 **gtctcgaact cctgacctca agtgatcc** **28**

<210> 19
<211> 20
30 <212> ADN
<213> Artificial

<220>
35 <223> Cebador de PCR

<400> 19
 acaatgagct gctgggtgct **20**
40
<210> 20
<211> 20
<212> ADN
45 <213> Artificial

<220>
<223> Cebador de PCR
50
<400> 20
 gatgggcaca gtgtgggtga **20**

55

60

65