

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 987 444**

51 Int. Cl.:

C12N 7/00 (2006.01)

A61K 35/768 (2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.07.2017 PCT/KR2017/007896**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.01.2018 WO18016917**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.07.2017 E 17831389 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.03.2024 EP 3489354**

54 Título: **Virus vaccinia recombinante y uso del mismo**

30 Prioridad:

21.07.2016 KR 20160092684

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

14.11.2024

73 Titular/es:

**KOLON LIFE SCIENCE, INC. (100.0%)
110, Magokdong-ro, Gangseo-gu
Seoul 07793, KR**

72 Inventor/es:

**KIM, SUJEONG;
KIM, MINJUNG;
CHOI, HEONSIK;
SHIN, JAEIL;
KIM, MINJU;
LEE, HYESUN;
LEE, SOONDONG;
CHOI, HWANJUN;
KIM, JOONSUNG;
HONG, JIEUN y
LEE, EUNJIN**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

Observaciones:

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

ES 2 987 444 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 vaccinia recombinante y uso del mismo

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a un virus vaccinia recombinante en el cual se suprime la expresión de algunos genes, y usos del mismo.

Antecedentes

10 Recientemente, se han llevado a cabo activamente estudios sobre virus oncolíticos modificados mediante manipulación genética de diversos virus con el propósito de desarrollar agentes terapéuticos contra el cáncer. Sin embargo, las limitaciones de los virus oncolíticos aún no se han resuelto por completo. Por ejemplo, para poder convertirle en un agente anticancerígeno, se produjo mediante manipulación genética un virus que tenía capacidad de replicación selectiva a tumores. Sin embargo, existen limitaciones de que el virus se replique no solo en células cancerígenas sino también en células normales, matando así a las células normales, o que tenga efectos anticancerígenos insuficientes. Por consiguiente, existe una demanda continua para el desarrollo de una técnica que permita a los virus oncolíticos tener una mayor selectividad y eficacia contra las células cancerígenas mientras se minimiza la influencia sobre las células normales.

15 Por otro lado, el virus vaccinia es un virus de ADN envuelto con ADN genómico lineal de doble-hebra de alrededor de 200 kpb el cual codifica para alrededor de 200 genes independientes. El virus vaccinia fue utilizado por primera vez por Edward Jenner en el siglo dieciocho como vacuna profiláctica para la viruela. Desde entonces, el virus vaccinia se ha desarrollado en diversas vacunas profilácticas. En las primeras vacunas de virus vaccinia, se utilizó un virus de tipo-silvestre y se observaron efectos secundarios graves, tal como infección sistémica o infección progresiva, en pacientes vacunados. Por lo tanto, con la finalidad de reducir los efectos secundarios, se desarrollaron virus vaccinia modificados con toxicidad atenuada, tal como virus vaccinia Ankara modificado (MVA), LC16m8 (derivado de la cepa Lister) y vaccinia New York (NYVAC, derivado de la cepa vaccinia Copenhagen). Se han desarrollado vacunas dirigidas a diversas enfermedades basadas en estos virus vaccinia. También se están desarrollando como virus oncolíticos cepas de virus vaccinia tal como Western Reserve(WR), NYVAC, Wyeth y Lister.

20 Alharbi N et al., PLOS ONE, vol. 10, 2015, divulga mutantes del virus vaccinia Ankara modificado (MVA). WO 92/15672A1 divulga virus NYVAC modificados, un virus basado en la cepa Copenhagen que ya comprende una delección del gen TK. WO 00/73479A1 divulga un virus vaccinia oncolítico que comprende una delección de los genes VGF y TK para el tratamiento contra el cáncer. WO 2013/163724A1 divulga un no-reovirus modificado que comprende una proteína de reovirus sigma 1, en el que la proteína de reovirus sigma 1 reemplaza la proteína de unión nativa del no-reovirus. WO 2017/037523A1 divulga virus oncolíticos para uso en métodos de viroembolización arterial transcatóter.

Problema técnico

35 Un objetivo de la presente invención es proporcionar un virus vaccinia recombinante en el cual se suprime la expresión de algunos genes y una composición anticancerígena que contiene el virus vaccinia recombinante como un ingrediente activo.

Solución al problema

40 Para poder lograr el objetivo anterior, la presente invención proporciona un virus vaccinia recombinante en el cual se suprime la expresión únicamente de los genes K3L, timidina cinasa (TK) y factor de crecimiento de vaccinia (VGF).

Además, la presente invención proporciona una composición farmacéutica para uso en un método de prevención o tratamiento contra el cáncer el cual contiene el virus vaccinia recombinante como un ingrediente activo.

La descripción describe un método de prevención o tratamiento contra el cáncer, comprendiendo el paso de administrar el virus vaccinia recombinante a un individuo.

Efectos ventajosos de la invención

45 El virus vaccinia recombinante de la presente invención mata selectivamente las células cancerígenas y exhibe una excelente capacidad de replicación en las células cancerígenas. Además, debido a que tiene una excelente capacidad de destrucción selectiva de células cancerígenas, el virus vaccinia recombinante tiene la ventaja de ser más seguro para uso en el cuerpo humano. Por lo tanto, el virus vaccinia recombinante de la presente invención puede usarse útilmente como una composición para tratar el cáncer.

50 Breve descripción de las figuras

La Fig. 1 es un diagrama esquemático que muestra una parte de una construcción de un plásmido lanzadera la cual suprime la expresión del gen VGF de la presente invención.

La Fig. 2 es un diagrama esquemático que muestra una parte de una construcción de un plásmido lanzadera la cual suprime la expresión del gen TK de la presente invención.

La Fig. 3 es un diagrama esquemático que muestra una parte de una construcción de un plásmido lanzadera la cual suprime la expresión del gen K3L de la presente invención.

- 5 La Fig. 4A muestra resultados que identifican que diversas líneas celulares cancerígenas, como se muestra en la Tabla 1-1, son eliminadas por un virus recombinante en el cual se suprime la expresión de los genes VGF, TK y K3L.

[Tabla 1-1]

Carcinoma	Línea celular
Cáncer de pulmón	A549
Cáncer de cerebro	U-87MG
Cáncer de mama	T-47D
Cáncer de ovario	A2780
Cáncer de páncreas	MIA PaCa-2
Cáncer colorrectal	SW620

- 10 La Fig. 4B muestra resultados que identifican que varias líneas celulares cancerígenas, como se muestra en la Tabla 1-2, son eliminadas por el virus recombinante en el cual se suprime la expresión de los genes VGF, TK y K3L.

[Tabla 1-2]

Carcinoma	Línea celular
Cáncer de hígado	Hep3B
Cáncer de próstata	DU145
Cáncer de cabeza y cuello	FaDu
Fibrosarcoma	HT-1080

- 15 La Fig. 5 muestra resultados que identifican que un virus vaccinia IHD-W recombinante en el cual los genes VGF, TK y K3L están eliminados o inactivados y la expresión de los genes está suprimida induce la muerte de una línea celular de cáncer colorrectal. Los significados de las abreviaciones de los genes eliminados son como se muestran en la Tabla 2:

[Tabla 2]

Abreviatura	Significado
VTK	Todos los genes VGF, TK y K3L están eliminados.
ViTK	La expresión del gen VGF está inactivada y están eliminados los genes TK y K3L.
VTiK	La expresión del gen TK está inactivada y están eliminados los genes VGF y K3L.
VTKi	La expresión del gen K3L está inactivada y están eliminados los genes VGF y TK.

- 20 La Fig. 6 es una gráfica que identifica la capacidad de destrucción de un virus vaccinia recombinante, en el cual se suprime la expresión de los genes K, VT o VTK, contra células cancerígenas en relación con células normales:

(a) es una gráfica obtenida al hacer una comparación de la capacidad de destrucción de un virus vaccinia IHD-W-K, IHD-W-VT o IHD-W-VTK recombinante contra células cancerígenas en relación con células normales, basándose en un valor IHD-W-VTK; y (b) es una gráfica obtenida haciendo una comparación de la capacidad de destrucción de un

virus vaccinia WR-ViTi o WR-ViTiKi recombinante contra células cancerígenas en relación con células normales, basándose en un valor de WR-ViTiKi.

5 La Fig. 7 es una gráfica obtenida mediante la observación de cambios en el tamaño del tumor después de la administración de un virus vaccinia recombinante, en el cual se suprime la expresión de ambos genes VT o VTK, a un modelo de ratón con cáncer colorrectal:

(a) es una gráfica obtenida mediante la observación de cambios en el tamaño del tumor después de la administración de un virus vaccinia IHD-W-VT o IHD-W-VTK recombinante a un modelo de ratón con cáncer colorrectal; y (b) es una gráfica obtenida mediante la observación de cambios en el tamaño del tumor después de la administración de un virus vaccinia WR-ViTi o WR-ViTiKi recombinante a un modelo de ratón con cáncer colorrectal.

10 La Fig. 8 es una gráfica que identifica cambios en el peso corporal de ratones de forma individual después de la administración de un virus vaccinia recombinante, en el cual se suprime la expresión de ambos genes VT o VTK, a un modelo de ratón con cáncer colorrectal:

15 (a) es una gráfica que identifica cambios en el peso corporal de ratones de forma individual después de la administración de un virus vaccinia IHD-W-VT o IHD-W-VTK recombinante a un modelo de ratón con cáncer colorrectal; y (b) es una gráfica que identifica cambios en el peso corporal de ratones de forma individual después de la administración de un virus vaccinia WR-ViTi o WR-ViTiKi recombinante a un modelo de ratón con cáncer colorrectal.

La Fig. 9 es una gráfica que identifica una tasa de mortalidad de ratones después de la administración de un virus vaccinia recombinante, en el cual se suprime la expresión de los genes VT o VTK, a un modelo de ratón con cáncer colorrectal:

20 (a) es una gráfica que identifica una tasa de mortalidad de ratones después de la administración de un virus vaccinia IHD-W-VT o IHD-W-VTK recombinante a un modelo de ratón con cáncer colorrectal; y (b) es una gráfica que identifica una tasa de mortalidad de ratones después de la administración de un virus vaccinia WR-ViTi o WR-ViTiKi recombinante a un modelo de ratón con cáncer colorrectal.

25 La Fig. 10 muestra resultados que identifican la reacción de inflamación en colas de ratones después de la administración de un virus vaccinia IHD-W recombinante, en el cual se suprime la expresión de ambos genes VT o VTK, a un modelo de ratón con cáncer colorrectal:

(a) muestra resultados que identifican la respuesta inflamatoria en colas de ratones a los cuales se les administró un virus vaccinia IHD-W-VT recombinante y (b) muestra resultados que confirman la reacción inflamatoria en colas de ratones a los cuales se les administró un virus vaccinia IHD-W-VTK recombinante.

30 Descripción detallada de la invención

En lo sucesivo, la presente invención se describirá en detalle. La invención está definida por las reivindicaciones 1, 8 y 12. Otras realizaciones de la invención están definidas por las reivindicaciones dependientes. En un aspecto de la presente invención, se proporciona un virus vaccinia recombinante en el cual se suprime la expresión únicamente de los genes VGF, TK y K3L.

35 El término "VGF", tal como se utiliza en la presente, significa factor de crecimiento de vaccinia. El factor de crecimiento de vaccinia es una enzima que exhibe una actividad similar al factor de crecimiento epitelial. El factor de crecimiento de vaccinia codificado por el gen VGF exhibe una actividad de factor de crecimiento en el caso de estar infectado con el virus y se puede sintetizar en una etapa inicial de la infección causada por el virus. El VGF puede ser una secuencia de GenBank: AAO89288.1, ABD52455.1, o AIX98927.1, pero no se limita a las mismas. Específicamente, el VGF puede ser una secuencia de bases que codifica para una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 67, y el gen VGF puede ser una secuencia de bases representada por SEQ ID NO: 66. El VGF o un gen del mismo puede tener una homología de alrededor de 70% o el 75% o más, y preferiblemente alrededor de 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, o 89% o más, a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 67 o la secuencia de bases de SEQ ID NO: 66. Además, el VGF o un gen del mismo puede tener una homología de alrededor de 90%, 91%, 92%, 93% o 94% o más, preferiblemente alrededor de 95%, 96%, 97%, 98% o 99% o más, y más preferiblemente alrededor de 99% o más, a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 67 o la secuencia de bases de SEQ ID NO: 66.

50 El término "TK", tal como se utiliza en la presente, significa timidina cinasa. La timidina cinasa es una enzima implicada en la biosíntesis de nucleótidos. La timidina cinasa codificada por el gen TK ocasiona que un ácido fosfórico en una posición y del ATP se una a la timidina de modo que se puedan producir nucleótidos que constituyen un ADN viral. La TK puede ser una secuencia de GenBank: AAO89373.1, ABD52560.1 o AIX99011.1, pero no se limita a las mismas. Específicamente, la TK puede ser una secuencia de bases que codifica para una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 69, y el gen TK puede ser una secuencia de bases representada por SEQ ID NO: 68. La TK o un gen de la misma puede tener una homología de alrededor de 70% o 75% o más, y preferiblemente alrededor de 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, u 89% o más, a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 69 o la secuencia de bases de SEQ ID NO: 68. Además, la TK o un gen de la misma puede tener una homología de

alrededor de 90%, 91%, 92%, 93% o 94% o más, preferiblemente alrededor de 95%, 96%, 97%, 98% o 99% o más, y más preferiblemente alrededor de 99% o más, a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 69 o la secuencia de bases de SEQ ID NO: 68.

5 El término "K3L", tal como se utiliza en la presente, significa proteína K3L. La proteína K3L codificada por el gen K3L es una proteína que tiene homología con el factor de iniciación de la traducción-2 α (eIF-2 α) y puede suprimir la acción de la proteína cinasa R (PKR), que es un activador del interferón. La K3L puede ser una secuencia de GenBank: AAO89313.1, ABD52483.1 o AGB75754.1, pero no se limita las mismas. Específicamente, la K3L puede tener una secuencia de bases que codifica para una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 71, y el gen K3L puede ser una secuencia de bases representada por SEQ ID NO: 70. La K3L o un gen de la misma puede tener una homología de alrededor de 70% o 75% o más, y preferiblemente alrededor de 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 10 87%, 88%, u 89% o más, a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 71 o la secuencia de bases de SEQ ID NO: 70. Además, la K3L o un gen de la misma puede tener una homología de alrededor de 90%, 91%, 92%, 93% o 94% o más, preferiblemente alrededor de 95%, 96%, 97%, 98% o 99% o más, y más preferiblemente alrededor de 99% o más, a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 71 o la secuencia de bases de SEQ ID NO: 70.

15 La expresión suprimida de un gen de acuerdo con la presente invención significa que el gen no se expresa o sólo una parte del gen se expresa mediante la eliminación parcial o total del gen o la inserción de un gen extraño en el gen de modo que la actividad de una proteína codificada por el gen no se exhibe. Se puede realizar un método para eliminar el gen o insertar un gen extraño mediante un método bien conocido en la técnica. Por ejemplo, esto se puede realizar mediante métodos para insertar un gen extraño que se divulgan en Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, by J. Sambrook, E. F. Fritsch and T. Maniatis (2003), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Virology Methods Manual, edited by Brian W J Mahy and Hillar O Kangro (1996) Academic Press and Expression of genes by Vaccinia virus vectors, y Current Protocols in Molecular Biology, published by John Wiley and Son (1998), Chapter 16. Específicamente, en una realización de la presente invención, se insertó un gen extraño utilizando el sistema vectorial pGEM-T Easy (Promega, No. de Cat. A1360) o pGEM-T (Promega, No. de Cat. A3600).

25 El virus vaccinia puede seleccionarse del grupo que consiste en Western Reserve (WR), Virus Vaccinia New York (NYVAC), Wyeth (The New York City Board of Health; NYCBOH), LC16m8, Lister, Copenhagen, Tian Tan, USSR, TashKent, Evans, International Health Division-J (IHD-J), International Health Division-White (IHD- W).

30 Específicamente, el virus vaccinia puede ser el virus vaccinia WR, Lister o IHD-W, y puede tener una secuencia de GenBank: AY243312.1, DQ121394.1 o AIX98951.1. En una realización de la presente invención, el virus vaccinia puede ser IHD-W.

El término "V" o "virus V", tal como se utiliza en la presente, significa un virus vaccinia recombinante en el cual VGF, que es un gen del factor de crecimiento de vaccinia, está eliminado, y el virus no expresa el gen VGF debido a la delección del gen VGF.

35 Además, el término "Vi" o "virus Vi" tal como se utiliza en la presente significa un virus vaccinia recombinante en el cual la expresión del factor de crecimiento vaccinia está inactivada y el virus no expresa el gen VGF. La expresión del factor de crecimiento de vaccinia se puede suprimir mediante la inserción un gen extraño en el gen VGF.

Además, el término "T" o "virus T" tal como se utiliza en la presente significa un virus vaccinia recombinante en el cual el gen de la timidina cinasa (TK) está eliminado y el virus no expresa el gen TK debido a la delección del gen TK.

40 Además, el término "Ti" o "virus Ti" tal como se utiliza en la presente significa un virus vaccinia recombinante en el cual la expresión de timidina cinasa está inactivada y el virus no expresa el gen TK. La expresión de la timidina cinasa se puede suprimir mediante la inserción un gen extraño en el gen TK.

Además, el término "K" o "virus K", tal como se utiliza en la presente, significa un virus vaccinia recombinante en el cual el gen K3L está eliminado y el virus no expresa el gen K3L debido a la delección del gen K3L.

45 Además, el término "Ki" o "virus Ki" tal como se utiliza en la presente significa un virus vaccinia recombinante en el cual la expresión del gen K3L está inactivada y el virus no expresa K3L. La expresión de la proteína K3L se puede suprimir mediante la inserción un gen extraño en el gen K3L.

50 Además, el término "VT" o "virus VT", tal como se utiliza en la presente, significa un virus vaccinia recombinante en el cual se eliminan los genes VGF y TK. Además, el término "ViTi" o "virus ViTi" como se utiliza en la presente significa un virus vaccinia recombinante en el cual la expresión del factor de crecimiento de vaccinia y la timidina cinasa están inactivadas. Los métodos para inactivar la expresión del factor de crecimiento de vaccinia y la timidina cinasa son como se describen anteriormente.

55 Además, el término "VTK" o "virus VTK", tal como se utiliza en la presente, significa un virus vaccinia recombinante en el cual se eliminan los genes VGF, TK y K3L. Además, el término "ViTiKi" o "virus ViTiKi" tal como se utiliza en la presente significa un virus vaccinia recombinante en el cual la expresión del factor de crecimiento de vaccinia, la timidina cinasa y la proteína K3L están inactivadas. Los métodos para inactivar la expresión del factor de crecimiento de vaccinia, timidina cinasa y proteína K3L son como se describen anteriormente.

Además, el término "ViTK" o "virus ViTK" tal como se utiliza en la presente significa un virus vaccinia recombinante en el cual la expresión del factor de crecimiento de vaccinia está inactivada y los genes TK y K3L están eliminados. Además, el término "VTiK" o "virus VTiK" tal como se utiliza en la presente significa un virus vaccinia recombinante en el cual la expresión de timidina cinasa está inactivada y los genes VGF y K3L están eliminados. Además, el término "VTKi" o "virus VTKi" tal como se utiliza en la presente significa un virus vaccinia recombinante en el cual la expresión de la proteína K3L está inactivada y los genes VGF y TK están eliminados.

Además, un aspecto de la presente invención proporciona una composición farmacéutica para uso en un método para prevenir o tratar el cáncer, que comprende el virus vaccinia recombinante en el cual se suprime la expresión de los genes K3L, TK y VGF, como ingrediente activo, y además que comprende un aditivo farmacéuticamente aceptable. Los genes VGF, TK y K3L son como se describen anteriormente.

Como ejemplo del virus vaccinia recombinante, se puede mencionar lo siguiente. Las variantes del virus vaccinia WR pueden ser WR-VTK, WR-ViTiKi, WR-ViTK, WR-VTiK, o WR-VTKi. Además, las variantes del virus vaccinia NYVAC pueden ser NYVAC-VTK, NYVAC-ViTiKi, NYVAC-ViTK, NYVAC-VTiK, o NYVAC-VTKi. Además, las variantes del virus Wyeth vaccinia pueden ser Wyeth-VTK, Wyeth-ViTiKi, Wyeth-ViTK, Wyeth-VTiK, o Wyeth-VTKi. Además, las variantes del virus vaccinia LC16m8 pueden ser LC16m8-VTK, LC16m8-ViTiKi, LC16m8-ViTK, LC16m8-VTiK, o LC16m8-VTKi. Además, las variantes del virus vaccinia Lister pueden ser Lister-VTK, Lister-ViTiKi, Lister-ViTK, Lister-VTiK, o Lister-VTKi. Además, las variantes del virus vaccinia Copenhagen pueden ser Copenhagen-VTK, Copenhagen-ViTiKi, Copenhagen-ViTK, Copenhagen-VTiK, o Copenhagen-VTKi. Además, las variantes del virus vaccinia TianTan pueden ser TianTan-VTK, TianTan-ViTiKi, TianTan-ViTK, TianTan-VTiK, o TianTan-VTKi. Además, las variantes del virus vaccinia USSR pueden ser USSR-VTK, USSR-ViTiKi, USSR-ViTK, USSR-VTiK, o USSR-VTKi. Además, las variantes del virus vaccinia TashKent pueden ser TashKent-VTK, TashKent-ViTiKi, TashKent-ViTK, TashKent-VTiK, o TashKent-VTKi. Además, las variantes del virus vaccinia Evans pueden ser Evans-VTK, Evans-ViTiKi, Evans-ViTK, Evans-VTiK, o Evans-VTKi. Además, las variantes del virus vaccinia IHD-J pueden ser IHD-J-VTK, IHD-J-ViTiKi, IHD-J-ViTK, IHD-J-VTiK, or IHD-J-VTKi. Además, las variantes del virus vaccinia IHD-W pueden ser IHD-W-VTK, IHD-W-ViTiKi, IHD-W-ViTK, IHD-W-VTiK, o THD-W-VTKi.

De acuerdo con una realización, se identificó que el virus vaccinia recombinante en el cual se eliminan los genes VGF, TK y K3L tiene la capacidad de destrucción contra diversas células cancerígenas (Figs. 4A y 4B). Además, se realizó una comparación de la capacidad de destrucción de células cancerígenas mediante el tratamiento de una línea celular de cáncer colorrectal con virus vaccinia IHD-W-VTK, IHD-W-ViTK, IHD-W-VTiK, y IHD-W-VTKi recombinantes. Como resultado, se identificó que todos los virus vaccinia exhibían una excelente capacidad de destrucción. Por lo tanto, se identificó que, independientemente de si un gen está eliminado o inactivado, todos los virus vaccinia en los cuales se suprime la expresión del gen VTK tienen actividad anticancerígena (Fig. 5). Además, en un caso en el cual se tratan células normales y células cancerígenas con virus vaccinia IHD-W-K, IHD-W-VT, IHD-W-VTK, WR-K, WR-ViTi, y WR-ViTiKi recombinantes, se identificó que el virus vaccinia IHD-W-VTK o WR-ViTiKi recombinante en el cual se suprime simultáneamente la expresión de los genes VGF, TK y K3L exhibe una capacidad de destrucción relativamente superior contra células cancerígenas en relación con las células normales en comparación con el virus IHD-W-K o WR-K recombinante en el cual se suprime la expresión única del gen K3L o el virus vaccinia IHD-W-VT o WR-ViTi recombinante en el cual se suprime simultáneamente la expresión de los genes VGF y TK (Fig. 6).

Además, se administraron los virus vaccinia recombinantes IHD-W-VT e IHD-W-VTK y los virus vaccinia recombinantes WR-ViTi y WR-ViTiKi a un modelo de ratón con tumor. Como resultado, se identificó que todos los virus suprimieron el crecimiento del cáncer (Fig. 7).

Además, se identificó que un modelo de ratón con tumor al cual se administró el virus vaccinia IHD-W-VTK o WR-ViTiKi recombinante exhibió una menor pérdida de peso y tasa de mortalidad que un modelo de ratón con tumor al cual se le administró el virus vaccinia IHD-W-VT o WR-ViTi recombinante (Figs. 8 y 9). Además, se identificó que los ratones a los cuales se les administró el virus vaccinia IHD-W-VTK recombinante exhibieron una respuesta menos inflamatoria en una región de la cola que los ratones a los cuales se les administró el virus vaccinia IHD-W-VT recombinante.

Por consiguiente, una composición farmacéutica de la presente invención para uso en un método para prevenir o tratar el cáncer el cual contiene, como ingrediente activo, un virus vaccinia recombinante en el cual se suprime la expresión de los genes K3L, TK y VGF puede usarse útilmente para prevenir o tratar el cáncer.

El término "cáncer", tal como se utiliza en la presente, puede ser cáncer sólido o cáncer de sangre. Aquí, el tumor sólido puede seleccionarse del grupo que consiste en cáncer de pulmón, cáncer colorrectal, cáncer de próstata, cáncer de tiroides, cáncer de mama, cáncer de cerebro, cáncer de cabeza y cuello, fibrosarcoma, cáncer de esófago, cáncer de piel, cáncer de timo, cáncer gástrico, cáncer de colon, cáncer de hígado, cáncer de ovario, cáncer de útero, cáncer de vejiga, cáncer de recto, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vías biliares, cáncer de páncreas y combinaciones de los mismos. De acuerdo con una realización de la presente invención, el cáncer puede ser cáncer de pulmón, cáncer de hígado, cáncer de próstata, cáncer de cabeza y cuello, fibrosarcoma, cáncer de cerebro, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de páncreas o cáncer colorrectal. Además, el cáncer de sangre puede seleccionarse del grupo que consiste en linfoma, leucemia aguda, mieloma múltiple y combinaciones de los mismos. La composición farmacéutica para uso de acuerdo con la presente invención puede contener además uno o más aditivos farmacéuticamente

5 aceptables seleccionados del grupo que consiste en excipientes, lubricantes, agentes humectantes, edulcorantes, fragancias y conservantes. La composición para uso de acuerdo con la presente invención se puede formular de acuerdo con un método convencional. La composición para uso de acuerdo con la presente invención se puede formular empleando un método conocido en la técnica para proporcionar la liberación rápida, sostenida o retardada de un ingrediente activo, en particular después de ser administrado a un mamífero. De acuerdo con la formulación, la composición se puede administrar apropiadamente a un individuo. Dicha administración puede ser administración parenteral, y ejemplos de la misma pueden incluir tejido intra-cáncer, vía intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, intraarterial, subcutánea, intranasal, epidural y oral. Una forma de preparación para administración parenteral puede ser una preparación inyectable.

10 La descripción describe un método para prevenir o tratar el cáncer, que comprende el paso de administrar el virus vaccinia recombinante a un individuo.

El individuo puede ser un mamífero, en particular un humano. La composición se puede administrar apropiadamente por un experto en la técnica dependiendo de la edad, sexo, peso del paciente, la gravedad de los síntomas de la enfermedad y la vía de administración. La administración puede ser una vez al día o varias veces al día.

15 Una dosis preferible del virus vaccinia recombinante de la presente invención varía dependiendo de la condición y el peso corporal de un individuo, la gravedad de la enfermedad, la forma del fármaco, la vía de administración y el período, y puede ser seleccionada apropiadamente por un experto en la técnica. Específicamente, la dosificación puede ser tal que un paciente reciba partículas de virus, unidades de virus que tienen infectividad (TCID₅₀), o unidades formadoras de placa (pfu) de 1×10⁵ a 1×10¹⁸, y preferiblemente 1×10⁵, 2×10⁵, 5×10⁵, 1×10⁶, 2×10⁶, 5×10⁶, 1×10⁷, 2×10⁷, 5×10⁷, 1×10⁸, 2×10⁸, 5×10⁸, 1×10⁹, 2×10⁹, 5×10⁹, 1×10¹⁰, 5×10¹⁰, 1×10¹¹, 5×10¹¹, 1×10¹², 1×10¹³, 1×10¹⁴, 1×10¹⁵, 1×10¹⁶, 1×10¹⁷ o más, en cual se pueden incluir varios valores e intervalos entre ellos. Además, una dosis del virus puede ser de 0.1 ml, 1 ml, 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml, 6 ml, 7 ml, 8 ml, 9 ml, 10 ml o más, y todos los valores e intervalos entre ellos se pueden incluir.

25 En lo sucesivo, la presente invención se va a describir en detalle con referencia a los siguientes ejemplos. Sin embargo, los siguientes ejemplos pretenden ilustrar la presente invención, y la presente invención no se limita a los mismos.

I. Producción del virus vaccinia recombinante

30 Los presentes inventores construyeron vectores de virus vaccinia recombinantes en los cuales los genes de timidina cinasa (TK), factor de crecimiento de vaccinia (VGF) y K3L están eliminados o la expresión de los mismos está inactivada. Utilizando estos vectores, se produjeron virus vaccinia recombinantes en los cuales se suprime la expresión de los genes anteriores y se compararon sus propiedades como sustancias anticancerígenas.

Ejemplo 1. Producción del virus vaccinia WR recombinante.

Ejemplo 1.1. Construcción del vector recombinante del virus vaccinia WR en el cual se eliminan los genes VGF, TK y K3L

35 Ejemplo 1.1.1. Construcción del vector recombinante del virus vaccinia WR en el cual se inactiva la expresión del gen VGF

Los genes que flanquean al gen VGF en ambos lados en el ADN genómico del virus vaccinia WR (ATCC, No. de Cat. VR-1354) se amplificaron mediante PCR y se insertaron en pGEM-T Easy, respectivamente, para construir pGEM-T Easy-VGF-L(WR) y pGEM-T Easy-VGF-R (WR). En la Tabla 3 se muestra información sobre los cebadores utilizados para la amplificación de secuencias de bases homólogas que flanquean al gen VGF en ambos lados.

40 [Tabla 3]

Nombre	Secuencia (5'→3')	SEQ ID NO
VGF-L delantero (WR)	CGCAGCTGTGTTTTTCGATTGATAGTGGTGTCCT	SEQ ID NO: 1
VGF-L reverso (WR)	CTGCAGGCCTAGCCACCGCATAATCTGATAGCTGGAATA	SEQ ID NO: 2
VGF-R delantero (WR)	CGGGATCCGTTAATTAATACTCGACGAACTAACTACCTATAC	SEQ ID NO: 3
VGF-R reverso (WR)	CGATATCGGAAAATGTCTGTTAGTAAATAACCATC	SEQ ID NO: 4
Promotor delantero p11	CGGCTAGCTCTAGAAGCGATGCTACGCTAG	SEQ ID NO: 5
Promotor reverso p11	CAAGCTTCGGTTGCCTCGAGGAATTCATTTATAGCATAGAA	SEQ ID NO: 6
LacZ delantero	CGCTCGAGGGATCCCGTCTTACAAACGTC	SEQ ID NO: 7

ES 2 987 444 T3

LacZ reverso	AAGCTTCTTAATTAAGGATCCCCCTGCCCGGTTATTATTATTTTGACACCAGAC CAACT	SEQ ID NO: 8
--------------	---	--------------

5 LacZ, cuya expresión está regulada por el promotor p11, se utilizó como marcador para el cribado de un virus en el cual se había producido recombinación en una posición del gen VGF. Se amplificó un sitio promotor p11 en el ADN_g de WR mediante PCR y el gen LacZ en pAAV-LacZ (Stratagene, No. de Cat. 240071-52) se amplificó mediante PCR. Luego, los resultantes se insertaron en pGEM-T Easy y pGEM-T, respectivamente, para construir pGEM-T Easy-p11 y pGEM-T-LacZ, respectivamente. La información sobre los cebadores utilizados para la amplificación del promotor p11 y LacZ se muestra en la Tabla 3.

10 Para poder construir un plásmido lanzadera en el cual se elimina parcialmente una función del gen VGF, se trató el pGEM-T Easy-VGF-L(WR) con PvuII y PstI, y se ligó con un vector obtenido tratando pSP72 (Promega, No. de Cat. P2191) con PvuII y PstI, para construir pSP72-VGF-L(WR). Además, el pGEM-T Easy-VGF-L-VGF-R(WR) se trató con EcoRV y BamHI, y se ligó con un vector obtenido tratando el pSP72-VGF-L(WR) como se construyó anteriormente con EcoRV y BamHI, para asegurar pSP72-VGF-L-VGF-R(WR). Para introducir un casete de expresión de LacZ, se trató el pGEM-T Easy-p11 con Sail y NheI, y se ligó con un vector obtenido tratando el pSP72-VGF-L-VGF-R(WR) con Sail y NheI, para construir pSP72-VGF-L-p11-VGF-R(WR). El pSP72-VGF-L-p11-VGF-R(WR) construido se trató con
15 EcoRI y PacI, y luego el pGEM-T-LacZ como se construyó anteriormente se cortó con EcoRI y PacI. Los resultantes se ligaron para completar pSP72-VGF-L-p11-LacZ-VGF-R(WR) (en lo sucesivo denominado como "plásmido lanzadera WR VGF(i)") que es un plásmido lanzadera VGF.

Ejemplo 1.1.2. Construcción del vector recombinante del virus vaccinia WR en el cual se inactiva la expresión del gen TK

20 Para poder asegurar los genes que flanquean al gen TK en ambos lados del ADN genómico del virus vaccinia WR, se amplificó el ADN_g de WR mediante PCR, y luego los segmentos de secuencia de base que flanquean al gen TK en los lados izquierdo y derecho, y son homólogos entre sí, se insertaron en pGEM-T Easy, para construir pGEM-T Easy-TK-L(WR) y pGEM-T Easy-TK-R(WR). En la Tabla 4 se muestra información sobre los cebadores utilizados para la amplificación de las secuencias de bases que son homólogas a ambos lados del gen TK.

25 [Tabla 4]

Nombre	Secuencia (5'→3')	SEQ ID NO:
TK-L delantero (WR)	AGGTCGACTTGCGATCAATAAATGGATCACAAC	SEQ ID NO: 9
TK-L reverso (WR)	TTAGCTGCAGTATGCGGCCGCAACAATGTCTGGAAAGAACTGTCC	SEQ ID NO: 10
TK-R delantero (WR)	CGGAATTCTGTGAGCGTATGGCAA	SEQ ID NO: 11
TK-R reverso (WR)	TCGGGATCCTCAGTCTCATGTTCTCACCGG	SEQ ID NO: 12
Promotor delantero p7.5	AGGAAGCTTTCCAAACCCACCCGCTTTTTAT	SEQ ID NO: 13
Promotor reverso p7.5	GAATTCGCACTAGTTCGGATCGCCGTGCAATAAATTAGAATATACCC	SEQ ID NO: 14
EGFP delantero	CGCTCGAGATGGTGAGCAAGGGCGAGG	SEQ ID NO: 15
EGFP reverso	TGAGATCTTTACTTGTACAGCTCGTCCATG	SEQ ID NO: 16
Gpt delantero	CGACTAGTACACAAGACAGGCTTGCGAG	SEQ ID NO: 17
Gpt reverso	CGGAATTCGGCCCACTCATAAATCCAGTT	SEQ ID NO: 18

ES 2 987 444 T3

Promotor pSE/L delantero	CGAGCTGCAGATAAAAATTAATTAATTACCCGGGTACCAGGCCTAGATCTGT CGACTCGAGCTTATTTATATTTCCAAAAAATAAAAATTTCAATTTTTA AGCTTCGGGATCCGCAA	SEQ ID NO: 19
Promotor pSE/L reverso	TTGCGGATCCCGAAGCTTAAAAATTGAAATTTTATTTTTTTTTTTGGAAAT AAATAAGCTCGAGTCGACAGATCTAGGCCTGGTACCCGGGTAATTAATTA TTTTATCTGCAGCTCG	SEQ ID NO: 20
TF delantero	ATCGGCGGCCGCTTTTTATCTGCGCGGTTAACCGCCTTTTTATCCATCAGGT GATCTGTTTTTATTGTGGAGCTGCAGCGAT	SEQ ID NO: 21
TF reverso	ATCGCTGCAGCTCCACAATAAAAAACAGATCACCTGATGGATAAAAAGGCGG TTAACCGCGCAGATAAAAAGCGGCCGCGAT	SEQ ID NO: 22

5 EGFP, cuya expresión está regulada por el promotor pSE/L, y Gpt, cuya expresión está regulada por el promotor p7.5, fueron utilizados como marcadores para cribar para un virus en el cual se había producido recombinación en una posición del gen TK. Se amplificó un sitio promotor p7.5 mediante PCR utilizando el ADNg de WR como templado, y también se amplificaron el gen EGFP en pEGFP-N3 (Clontech, No. de Cat. 6080-1) y el gen Gpt en DH5α (Takara, No. de Cat. 9057) mediante PCR. Luego, los resultantes se insertaron en pGEM-T Easy, respectivamente, para construir pGEM-T Easy-p7.5, pGEM-T Easy-EGFP y pGEM-T Easy-Gpt, respectivamente. Además, se construyeron el promotor pSE/L y TF mediante hibridación de cebadores. Las secuencias de los cebadores utilizados en los experimentos se muestran en la Tabla 4.

10 El pGEM-T Easy-p7.5 y el promotor pSE/L hibridado se trataron con BamHI y PstI, respectivamente, y se ligaron para construir pGEM-T Easy-pSE/L-p7.5. Los pGEM-T Easy-pSE/L-p7.5 y pGEM-T Easy-EGFP construidos se trataron respectivamente con BglII y XhoI, y luego se ligaron para construir pGEM-T Easy-pSE/L-p7.5.

15 Para poder construir un plásmido lanzadera en el cual se elimina parcialmente una función del gen TK, el pSP72 se trató con EcoRI y BamHI, y el pGEM-T Easy-TK-R(WR) se trató con EcoRI y BamHI. Luego, los resultantes se ligaron para construir pSP72-TK-R(WR). El pSP72-TK-R(WR) construido se trató con XhoI y PstI, y se ligó con el pSEM-T Easy-TK-L obtenido al tratarlo con Sall y PstI, para construir pSP72-TK-L-TK-R(WR). Para poder introducir un casete de expresión de EGFP, los pSP72-TK-L-TK-R(WR) y pGEM-T Easy-EGFP-pSE/L-p7.5 construidos se trataron respectivamente con EcoRI y PstI, y se ligaron para construir pSP72-TK-L-EGFP-pSE/L-p7.5-TK-R(WR).

20 Además, el pSP72-TK-L-EGFP-pSE/L-p7.5-TK-R(WR) construido y el oligómero TF hibridado se trataron respectivamente con PstI y NotI, y se ligaron para construir pSP72-TK-L-TF-EGFP-pSE/L-p7.5-TK-R(WR). Para poder introducir un casete de expresión de Gpt, el pSP72-TK-L-TF-EGFP-pSE/L-p7.5-TK-R(WR) y el pGEM-T Easy-Gpt construidos se trataron respectivamente con EcoRI y SpeI, y se ligaron para construir finalmente pSP72-TK-L-TF-EGFP-pSE/L-p7.5-Gpt-TK-R(WR) (en lo sucesivo denominado como "plásmido lanzadera WR TK(i)") el cual es un plásmido lanzadera TK.

25 Ejemplo 1.1.3. Construcción del vector recombinante del virus vaccinia WR en el cual se elimina el gen K3L

Los genes que flanquean al gen K3L en ambos lados del ADN genómico del virus vaccinia WR se amplificaron mediante PCR. Aquí, en la Tabla 5 se muestra información sobre los cebadores utilizados para la amplificación de las secuencias de bases homólogas que flanquean el gen K3L en ambos lados. Los genes amplificados se insertaron respectivamente en pGEM-T, para construir pGEM-T-K3L-L(WR) y pGEM-T-K3L-R(WR).

30 [Tabla 5]

Nombre	Secuencia (5'→3')	SEQ ID NO:
K3L-L delantero (WR)	TCGGTCGACCATATGTTTTAACGACGCATTATCTG	SEQ ID NO: 23
K3L-L reverso (WR)	TCGAAGCTTTTTTATACCGAACATAAAAAATAAGGTTAATTAT	SEQ ID NO: 24
K3L-R delantero (WR)	TCGGATATCCTTGTTAACGGGCTCGTAAATTGGG	SEQ ID NO: 25
K3L-R reverso (WR)	TCGGGATCCTGATAATACACATATTTATTTAGGAAGCG	SEQ ID NO: 26
TF delantero	ATCGGCGGCCGCTTTTTATCTGCGCGGTTAACCGCCTTTTTAT CCATCAGGTGATCTGTTTTTATTGTGGAGCTGCAGCGAT	SEQ ID NO: 27
TF reverso		SEQ ID NO: 28

ES 2 987 444 T3

	ATCGCTGCAGCTCCACAATAAAAAACAGATCAOCTGATGGATAA AAAGGCCGGTTAACCGCGCAGATAAAAAAGCGGCCGCCGAT	
Promotor delantero p7.5	AGGAAGCTTTCCAAACCCACCCGCTTTTTAT	SEQ ID NO: 29
Promotor reverso p7.5	CGTGGATCCCCGTGCAATAAATTAGAATATA	SEQ ID NO: 30

Para poder construir un plásmido lanzadera en el cual se eliminó el gen K3L, se hibridó el cebador TF mostrado en la Tabla 5, se trató con EcoRI y EcoRV y se ligó con un vector obtenido tratando el pSP72 con EcoRI y EcoRV, para construir pSP72-TF. Además, se trató pDsRed2 (Clontech, No. de Cat. 632404) con EcoRI y BamHI, y se ligó con un vector obtenido tratando el pSP72-TF con EcoRI y BamHI, para construir pSP72-DsRed-TF. El pGEM-T-K3L-R(WR) como se construyó anteriormente se trató con EcoRV y BamHI, y se ligó con un vector obtenido tratando el pSP72-DsRed-TF con EcoRV y BamHI, para construir pSP72-DsRed-TF-K3L-R(WR). A continuación, el pGEM-T-K3L-L(WR) como se construyó anteriormente se trató con XhoI y HindIII, y se ligó con un vector obtenido tratando el pSP72-DsRed-TF-K3L-R(WR) con XhoI y HindIII, para construir pSP72-K3L-L-DsRed-TF-K3L-R(WR). Finalmente, el promotor p7.5 se amplificó mediante PCR utilizando el ADN_g de WR como templado y luego se insertó en pGEM-T Easy, para construir pGEM-T Easy-p7.5. La información sobre los cebadores utilizados en la amplificación por PCR se muestra en la Tabla 5. El pGEM-T Easy-p7.5 se trató con HindIII y BamHI, y se ligó con un vector obtenido tratando el pSP72-K3L-L-DsRed-TF-K3L-R(WR) con HindIII y BamHI, para construir pSP72-K3L-L-p7.5-DsRed-TF-K3L-R(WR) (en lo sucesivo denominado como "plásmido lanzadera WR K3L").

Ejemplo 1.1.4. Construcción del vector recombinante del virus vaccinia WR en el cual se inactiva la expresión del gen K3L

Se amplificaron mediante PCR un gen que flanquea al gen K3L en el lado izquierdo y una parte del gen K3L en el ADN genómico del virus vaccinia WR. Aquí, la amplificación se llevó a cabo colocando el codón de inicio del gen K3L inmediatamente después de la secuencia K3L-L, y los cebadores utilizados para la amplificación de la secuencia homóloga en el lado izquierdo del gen K3L se muestran en la Tabla 6. Aquí, se obtuvo un fragmento K3L-L-K3Li(WR) el cual se amplificó e incluye una parte que excluye y sigue al codón de inicio del gen K3L y luego se ligó con un vector pGEM-T Easy, para construir pGEM-T Easy-K3L-L-K3Li(WR).

[Tabla 6]

Nombre	Secuencia (5'→3')	SEQ ID NO
K3L-Li delantero	TGTACGTATATTTAGATGTTTTTCAGCT	SEQ ID NO: 31
K3L-Li reverso	ATAAGCTTCTTGCATTTTGTATTTCGT	SEQ ID NO: 32
K3L-Ri delantero	CGCAGATAAAAAACATATCCTTGTTAAC	SEQ ID NO: 33
K3L-Ri reverso	GTTAACAAGGATATGTTTTTATCTGCG	SEQ ID NO: 34

El plásmido lanzadera WR K3L y pGEM-T Easy-K3L-L-K3Li(WR) como se construyeron en el Ejemplo 1.1.3 se trataron con SnaBI y HindIII y se ligaron para construir pSP72-K3L-L-K3Li-p7.5-DsRed-TF-K3L-R(WR). Para poder introducir el codón de inicio de K3L en el pSP72-K3L-L-K3Li-p7.5-DsRed-TF-K3L-R(WR) construido, se realizó una mutación puntual utilizando cebadores como se muestra en la Tabla 6, de modo que pSP72-K3L-L-K3Li-p7.5-DsRed-TF-K3L_{ATG}-K3L-R(WR) (en lo sucesivo denominado como "plásmido lanzadera WR K3L(i)"), finalmente se construyó.

Ejemplo 1.2. Producción del virus vaccinia WR recombinante en el cual se eliminan los genes VGF, TK y K3L

Ejemplo 1.2.1. Producción del virus vaccinia WR en el cual se elimina el gen K3L

Para poder asegurar un virus recombinante, se prepararon células HeLa (ATCC, No. de Cat. CCL-2) en una placa de 6-pocillos en una condición de 3×10^5 células/pocillo y en un estado de medio MEM que contiene suero bovino fetal al 2%. Luego, las células HeLa se transfectaron con 2 µg del plásmido lanzadera WR K3L como se construyó en el Ejemplo 1.1.3 utilizando jetPRIME (Polyplus, No. de Cat. 114-07) y se trataron simultáneamente con 0.05 de MOI de virus vaccinia WR de tipo-silvestre. Después de 2 horas de incubación, el medio se reemplazó con medio MEM que contiene suero bovino fetal al 5% y luego las células se incubaron adicionalmente durante 48 horas. Finalmente, las células infectadas se recolectaron con 500 µl del medio y luego se lisaron repitiendo la congelación y el descongelamiento tres veces. El lisado celular se denominó un virus crudo. El virus crudo producido se utilizó y se sometió a aislamiento en placa 6 veces de modo que se aseguró el virus vaccinia K WR recombinante puramente aislado.

Ejemplo 1.2.2. Producción del virus vaccinia WR recombinante en el cual se inactiva la expresión de los genes VGF y TK

5 En primer lugar, se obtuvo el virus vaccinia Vi WR recombinante en el cual la expresión del gen VGF está inactivada en las mismas condiciones y métodos que en el Ejemplo 1.2.1, excepto que se utilizó el plásmido lanzadera WR VGF(i). A continuación, se obtuvo el virus vaccinia ViTi WR recombinante en el cual se inactiva la expresión de los genes VGF y TK con los mismos métodos que anteriormente, excepto que se utilizaron el plásmido lanzadera WR TK(i) y el virus vaccinia Vi WR recombinante.

Ejemplo 1.2.3. Producción del virus vaccinia WR recombinante en el cual se inactiva la expresión de los genes VGF, TK y K3L

10 En primer lugar, se obtuvo el virus vacuna ViTiKi WR recombinante en el cual se inactiva la expresión de los genes VGF, TK y K3L en las mismas condiciones y métodos que en el Ejemplo 1.2.1, excepto que se utilizaron el plásmido lanzadera WR K3L(i) y el virus vaccinia ViTi WR recombinante

Ejemplo 2. Producción del virus vaccinia IHD-W recombinante.

15 Ejemplo 2.1. Construcción del vector recombinante del virus vaccinia IHD-W en el cual se eliminan los genes VGF, TK y K3L

Ejemplo 2.1.1. Construcción del vector recombinante del virus vaccinia IHD-W en el cual se elimina el gen VGF

20 Los genes que flanquean al gen VGF en ambos lados del ADN genómico del virus vaccinia IHD-W (ATCC, No. de Cat. VR-1441) se amplificaron mediante PCR. Aquí, en la Tabla 7 se muestra información sobre los cebadores utilizados para la amplificación de secuencias de bases homólogas que flanquean al gen VGF en ambos lados. De esta manera, se obtuvieron fragmentos VGF-L(IHD-W) y VGF-R(IHD-W) y luego se ligaron con un vector pGEM-T Easy para construir pGEM-T Easy-VGF-L(IHD-W) o pGEM-T Easy-VGF-R(IHD-W).

[Tabla 7]

Nombre	Secuencia (5'→3')	SEQ ID NO
VGF-L delantero (IHD-W)	CGAAAGCTTGTAAGATGTTTAGAAAATGGATATTTTC	SEQ ID NO: 35
VGF-L reverso (IHD-W)	CTGGGATCCTAGGCTAGCGTGAAATAATATAAAAAATAACAATACAATATTG	SEQ ID NO: 36
VGF-R delantero (IHD-W)	CTGGAATTCGATTTAATTAATTTTTATAAATTTTTTTATGAGTATTTTTACAA AAAA	SEQ ID NO: 37
VGF-R reverso (IHD-W)	TAGGGATCCCATCGATAGTACAATAACTTTTATGAAAT	SEQ ID NO: 38

25 El pGEM-T Easy-VGF-R(IHD-W) anterior se trató con EcoRI y BamHI, y Psp72 se trató con EcoRI y BglII. Luego, los resultantes se ligaron para construir pSP72-VGF-R(IHD-W). El pSP72-VGF-R(IHD-W) y pGEM-T Easy-VGF-L(IHD-W) contruidos se trataron respectivamente con HindIII y BamHI, y se ligaron para construir pSP72-VGF-L-VGF-R(IHD-W).

30 A continuación, para poder introducir el promotor p11 y el gen LacZ en el pSP72-VGF-L-VGF-R(IHD-W), el casete de expresión de p11-LacZ en el plásmido lanzadera WR VGF del Ejemplo 1.1.1 y el pSP72-VGF-L-VGF-R(IHD-W) se trataron con NheI y PacI, y se ligaron para construir pSP72-VGF-L-p11-LacZ-VGF-R(IHD-W) (en lo sucesivo denominado como "plásmido lanzadera "IHD-W VGF").

Ejemplo 2.1.2. Construcción del vector recombinante del virus vaccinia IHD-W en el cual se elimina el gen TK

35 Para poder asegurar los genes que flanquean al gen TK en ambos lados del ADN genómico del virus vaccinia IHD-W, se realizó una PCR y, como resultado, se obtuvieron los fragmentos TK-L(IHD-W) y TK-R(IHD-W). Aquí, los cebadores utilizados se muestran en la Tabla 8. El fragmento TK-R(IHD-W) asegurado y el vector pSP72 se trataron respectivamente con EcoRI y BglII y se ligaron para construir pSP72-TK-R(IHD-W). Además, el pSP72-TK-R(IHD-W) y el fragmento TK-L(IHD-W) se trataron respectivamente con PstI y BamHI, y se ligaron para construir pSP72-TK-L-TK-R(IHD-W).

ES 2 987 444 T3

El vector pSP72-TK-L-TK-R(IHD-W) construido y el plásmido lanzadera WR TK construido en el Ejemplo 1.1.2 se trataron respectivamente con EcoRI y NotI, y se ligaron para construir finalmente pSP72-TK-L-TF-EGFP-pSE/L-p7.5-Gpt-TK-R(IHD-W) (en lo sucesivo denominado como "plásmido lanzadera IHD-W TK").

[Tabla 8]

Nombre	Secuencia (5'→3')	SEQ ID NO
TK-L delantero (IHD-W)	GATCTGCAGCCCTCTTCAAGAACCCATTAG	SEQ ID NO: 39
TK-L reverso (IHD-W)	TAGGGATCCTAGGCGGCCGCATGACAATAAAGAATTAATTATTGTTCACTT	SEQ ID NO: 40
TK-R delantero (IHD-W)	CATGAATTCTATTATATTTTTTATCTAAAAAACTAAAAATAACAT	SEQ ID NO: 41
TK-R reverso (IHD-W)	AGATCTATCGCTTTAGTAGTAGGAAATGTTTTATTG	SEQ ID NO: 42

5

Ejemplo 2.1.3. Construcción del vector recombinante del virus vaccinia IHD-W en el cual se elimina el gen K3L

Los genes que flanquean al gen K3L en ambos lados en el ADN genómico del virus vaccinia IHD-W se amplificaron mediante PCR y se insertaron respectivamente en pGEM-T Easy, para construir pGEM-T Easy-K3L-L(IHD-W) y pGEM-T Easy-K3L-R(IHD-W). Aquí, los cebadores utilizados se muestran en la Tabla 9.

10 Para poder construir un casete de expresión génica dentro del plásmido lanzadera K3L, se amplificó el casete del gen p7.5-DsRed mediante PCR utilizando el plásmido lanzadera WR K3L construido en el Ejemplo 1.1.3 como templado, y luego se insertó en pGEM-T Easy para construir pGEM-T Easy-p7.5-DsRed. Las secuencias de los cebadores utilizados para la amplificación del promotor p7.5 y el gen DsRed se muestran en la Tabla 9.

[Tabla 9]

Nombre	Secuencia (5'→3')	SEQ ID NO
K3L-L delantero (IHD-W)	TCGGTGCACCATATGTTTAAACGACGCATTATCTG	SEQ ID NO: 43
K3L-L reverso (IHD-W)	TCGAAGCTTTTTTATACCGAACATAAAAATTAGGTTTATTAT	SEQ ID NO: 44
K3L-R delantero (IHD-W)	CGCAGATAAAAATCACTTGTTAACGGGCTCGTAA	SEQ ID NO: 45
K3L-R reverso (IHD-W)	AAGCGCTAACATGGATTAGGAAGCGCTAACATGG	SEQ ID NO: 46
p7.5-DsRed delantero	AGGAAGCTTCCAAACCCACCCGCTTTTTAT	SEQ ID NO: 47
p7.5-DsRed reverso	CGGATATCTTTTTATCTGCGCGGTTAAC	SEQ ID NO: 48

15

Los vectores pGEM-T Easy-p7.5-DsRed y pSP72 construidos se trataron respectivamente con HindIII y EcoRV y luego se ligaron para completar pSP72-p7.5-DsRed. Además, el pSP72-p7.5-DsRed construido se trató con EcoRV y BglII, y el pGEM-T Easy-K3L-R(IHD-W) como se construyó anteriormente se trató con EcoRV y BamHI. Luego, los resultantes se ligaron para construir pSP72-p7.5-DsRed-K3L-R(IHD-W). El pSP72-p7.5-DsRed-K3L-R(IHD-W) construido se trató con XhoI y HindIII, y el pGEM-T Easy-K3L-L(IHD-W) se trató con Sall y HindIII. Luego, los resultantes se ligaron para construir finalmente pSP72-K3L-L-p7.5-DsRed-K3L-R(IHD-W) (en lo sucesivo denominado como "plásmido lanzadera IHD-W K3L").

20

Ejemplo 2.1.4. Construcción del vector recombinante del virus vaccinia IHD-W en el cual se inactivó la expresión del gen VGF

25 Los genes que flanquean al gen VGF en ambos lados y el gen VGF en el ADN genómico del virus vaccinia IHD-W se amplificaron mediante PCR. Aquí, la amplificación se llevó a cabo situando el codón de inicio del gen VGF inmediatamente después de la secuencia VGF-L, y situando las otras secuencias del gen VGF antes de la secuencia VGF-R. La información sobre los cebadores utilizados para la amplificación de las secuencias homólogas que flanquean el gen VGF en ambos lados se muestra en la Tabla 10. De tal manera, se obtuvieron los fragmentos VGF-L-VGF_{ATG}(IHD-W) y VGF_i-VGF-R (IHD-W) y luego se realizó la clonación mediante InFusion de los mismos en el plásmido lanzadera IHD-W VGF.

30

[Tabla 10]

Nombre	Secuencia (5'→3')	SEQ ID NO
VGF-L-VGF _{ATG} delantero (IHD-W)	CGAGCAGCTGAAGCTTGTAAGATGTTTAGAAAATGGATATTTCC	SEQ ID NO: 49
VGF-L-VGF _{ATG} reverso (IHD-W)	CGCTTCTAGAGCTAGCCATTTTTGATGGATTTTGTGTTTATGCT	SEQ ID NO: 50
VGF-Ri delantero (IHD-W)	CAGGGGGGATCCTTAATTAATCGATGAAATATCTGATGTTGTTGTT	SEQ ID NO: 51
VGF-Ri reverso (IHD-W)	TATAGTCAATAGATCTGGAAAATGTCTGTTAGTAAATAACCA	SEQ ID NO: 52
VGF _{ATGTAA} delantero (IHD-W)	CATCGCTTCTAGAGCTAGCTTACATTTTTGATGGATTTTGTGTTTA	SEQ ID NO: 53

5 El plásmido lanzadera IHD-W VGF se trató con NheI y HindIII, y el fragmento VGF-L-VGF_{ATG}(IHD-W) amplificado se clonó mediante InFusion en el mismo para construir pSP72-VGF-L-VGF_{ATG}-p11-LacZ-VGF-R (IHD-W). El pSP72-VGF-L-VGF_{ATG}-p11-LacZ-VGF-R(IHD-W) construido se trató con PacI y BglII, y el fragmento VGF_i-VGF-R(IHD-W) amplificado se clonó mediante InFusion en el mismo para construir pSP72-VGF-L-VGF_{ATG}-p11-LacZ-VGF_i-VGF-R(IHD-W).

10 A continuación, para poder introducir un codón de paro después del codón de inicio de VGF en el pSP72-VGF-L-VGF_{ATG}-p11-LacZ-VGF-R(i)(IHD-W), se realizó una mutación puntual utilizando cebadores como se muestra en la Tabla 10, para construir pSP72-VGF-L-VGF_{ATGTAA}-p11-LacZ-VGF_i-VGF-R(IHD-W) (en lo sucesivo denominado como "plásmido lanzadera IHD-W VGF(i)").

Ejemplo 2.1.5. Construcción del vector recombinante del virus vaccinia IHD-W en el cual se inactiva la expresión del gen TK

15 Para poder adquirir genes que flanquean al gen TK en ambos lados y el gen TK del ADN genómico del virus vaccinia IHD-W y el plásmido lanzadera IHD-W TK, se realizó una PCR y los cebadores utilizados se muestran en la Tabla 11. Aquí, la amplificación se llevó a cabo colocando el codón de inicio del gen TK inmediatamente después de la secuencia TK-L, y colocando las otras secuencias del gen TK antes de la secuencia TK-R. De tal manera, el fragmento TK-L-TK_{ATG}-TF-EGFP-pSE/L-p7.5-Gpt(IHD-W) se obtuvo del plásmido lanzadera IHD-W TK y el fragmento TK-TK-R(IHD-W) se obtuvo del ADN genómico de vaccinia IHD-W. Luego, se realizó la clonación mediante InFusion de los
20 resultantes en el plásmido lanzadera IHD-W TK.

[Tabla 11]

Nombre	Secuencia (5'→3')	SEQ ID NO
TK-Li delantero (IHD-W)	TATTGTCATGCGGCCGCATGGTCGACAACGGCGGACATATTCAGTTGAT	SEQ ID NO: 54
TK-Li reverso (IHD-W)	ATCATGATGGCGGCCGTCAATTAGCATCCATTTGATGATC	SEQ ID NO: 55
TK-Ri delantero (IHD-W)	ATTCTTTATTGTCATCATGGCGGCCGCTTTTTATCTGCGCGGTTAACC	SEQ ID NO: 56
TK-Ri reverso (IHD-W)	GTCCGCCGTTGTGCGACGGCCCACTCATAAATCCAGTT	SEQ ID NO: 57

25 El plásmido lanzadera IHD-W TK se trató con EagI y el fragmento TK_i-TK-R(IHD-W) amplificado se clonó mediante InFusion el mismo para construir pSP72-TK-L-TK_i-TK-R(IHD-W). El pSP72-TK-L-TK_i-TK-R(IHD-W) construido se trató con NotI y Sall, y el fragmento TK-L-TK_{ATG}-TF-EGFP-pSE/L-p7.5-Gpt(IHD-W) amplificado se clonó mediante InFusion el mismo para construir pSP72-TK-L-TK_{ATG}-TF-EGFP-pSE/L-p7.5-Gpt-TK_i-TK-R(IHD-W) (en lo sucesivo denominado como "plásmido lanzadera IHD-W TK(i)").

Ejemplo 2.1.6. Construcción del vector recombinante del virus vaccinia IHD-W en el cual se inactiva la expresión del gen K3L

Un gen que flanquea al gen K3L en el lado izquierdo y una parte del gen K3L en el ADN genómico del virus vaccinia IHD-W se adquirieron mediante PCR. Los cebadores utilizados se muestran en la Tabla 12. Aquí, se obtuvo un fragmento K3L-L-K3Li(IHD-W) el cual se amplificó e incluye una parte que excluye y sigue al codón de inicio del gen K3L y luego se realizó la clonación mediante InFusion del mismo en el plásmido lanzadera IHD-W K3L.

5

[Tabla 12]

Nombre	Secuencia (5'→3')	SEQ ID NO
K3L-L1 delantero (IHD-W)	GTTAGATCAGTGTACGTATATTTAGAT	SEQ ID NO: 58
K3L-Li reverso (IHD-W)	TGGGTTTGGAAAGCTTCTTGCATTTTGTATTTCGT	SEQ ID NO: 59
K3L-Ri delantero (IHD-W)	CGCAGATAAAAACATATCCTTGTTAAC	SEQ ID NO: 60
K3L-Ri reverso (IHD-W)	GTTAACAAGGATATGTTTTTATCTGCG	SEQ ID NO: 61

10

El plásmido lanzadera IHD-W K3L se trató con SnaBI y HindIII, y el fragmento K3Li-L-K3L(IHD-W) amplificado se clonó mediante InFusion en el mismo, para construir pSP72-K3L-L-K3Li(IHD-W). Para poder introducir el codón de inicio de K3L en el pSP72-K3L-L-K3Li-p7.5-DsRed-TF-K3L-R(IHD-W) construido, se realizó una mutación puntual utilizando cebadores como se muestran en la Tabla 12, de modo que finalmente se construyó pSP72-K3L-L-K3Li-p7.5-DsRed-TF-K3L_{ATG}-K3L-R(IHD-W) (en lo sucesivo denominado como "plásmido lanzadera IHD-W K3L(i)").

Ejemplo 2.2. Construcción del virus vaccinia IHD-W recombinante en el cual se eliminan los genes VGF, TK y K3L

Ejemplo 2.2.1. Producción del virus vaccinia IHD-W recombinante en el cual se elimina el gen K3L

15

Utilizando el plásmido lanzadera IHD-W K3L construido en el Ejemplo 2.1.3., se produjo un virus vaccinia en el cual el gen K3L está eliminado mediante el siguiente método.

20

Para poder asegurar un virus recombinante, se prepararon células HeLa en una placa de 6-pocillos en una condición de 3×10^5 células/pocillo y en un estado de medio MEM que contiene suero bovino fetal al 2%. Luego, las células HeLa se transfectoron con 2 µg del plásmido lanzadera IHD-W K3L utilizando jetPRIME y se trataron simultáneamente con 0.05 de MOI del virus vaccinia de tipo-silvestre IHD-W. Después de 2 horas de incubación, el medio se reemplazó con medio MEM que contiene suero bovino fetal al 5% y luego las células se incubaron adicionalmente durante 48 horas. Finalmente, las células infectadas se recolectaron con 500 µl del medio y luego las células se lisaron repitiendo la congelación y el descongelamiento tres veces. El lisado celular se sometió repetidamente a congelación y descongelamiento tres veces para obtener el virus crudo. El virus crudo se utilizó y se sometió repetidamente a aislamiento en placa mediante un método convencional de modo que se obtuvo el virus vaccinia K IHD-W recombinante puramente aislado.

25

Ejemplo 2.2.2. Producción del virus vaccinia IHD-W recombinante en el cual se eliminan los genes VGF y TK

Los plásmidos lanzadera VGF y TK como se construyeron en los Ejemplos 2.1.1. y 2.1.2, respectivamente, se utilizaron para producir un virus vaccinia en el cual los genes VGF y TK están eliminados.

30

En primer lugar, se obtuvo el virus vaccinia V IHD-W recombinante en el cual se elimina el gen VGF en las mismas condiciones y métodos que en el Ejemplo 2.2.1, excepto que se utilizó el plásmido lanzadera VGF IHD-W. A partir de entonces, se obtuvo el virus vaccinia VT IHD-W recombinante en el cual se eliminan los genes VGF y TK con los mismos métodos que anteriormente, excepto que se utilizaron el plásmido lanzadera TK IHD-W y el virus vaccinia V IHD-W recombinante.

Ejemplo 2.2.3. Producción del virus vaccinia IHD-W recombinante en el cual se eliminan los genes VGF, TK y K3L

35

El plásmido lanzadera K3L como se construyó en el Ejemplo 2.1.3. se utilizó para producir un virus vaccinia IHD-W recombinante en el cual se eliminan los genes VGF, TK y K3L.

El virus vaccinia VTK IHD-W recombinante en el cual se eliminan los genes VGF, TK y K3L se obtuvo en las mismas condiciones y métodos que en el Ejemplo 2.2.1., excepto que se utilizaron el plásmido lanzadera IHD-W K3L y el virus vaccinia VT VTK IHD-W recombinante.

40

Ejemplo 2.2.4. Producción del virus vaccinia IHD-W recombinante en el cual se inactiva la expresión del gen VGF y se eliminan los genes TK y K3L

Los plásmidos lanzadera VGF(i), TK y K3L como se construyeron en los Ejemplos 2.1.4., 2.1.2., y 2.1.3, respectivamente, se utilizaron para producir un virus vaccinia IHD-W recombinante en el cual la expresión del gen VGF se inactiva y los genes TK y K3L se eliminan.

5 En primer lugar, se obtuvo el virus vaccinia T IHD-W recombinante en el cual se elimina el gen TK en las mismas condiciones y métodos que en el Ejemplo 2.2.1, excepto que se utilizó el plásmido lanzadera TK IHD-W. Luego, se obtuvo el virus vaccinia TK IHD-W recombinante en el cual se eliminan los genes TK y K3L con los mismos métodos que anteriormente, excepto que se utilizaron el plásmido lanzadera K3L IHD-W y el virus vaccinia TK IHD-W recombinante.

Además, el virus vaccinia ViTK IHD-W recombinante en el cual se inactiva la expresión del gen VGF y se eliminan los genes TK y K3L se obtuvo con los mismos métodos que anteriormente, excepto que se utilizaron el plásmido lanzadera VGF(i) IHD-W y el virus vaccinia TK recombinante TK IHD-W.

10 Ejemplo 2.2.5. Producción del virus vaccinia IHD-W recombinante en el cual se inactiva la expresión del gen TK y se eliminan los genes VGF y K3L

Los plásmidos lanzadera TK(i), VGF y K3L como se construyeron en los Ejemplos 2.1.5., 2.1.1., y 2.1.3, respectivamente, se utilizaron para producir un virus vaccinia IHD-W recombinante en el cual la expresión del gen TK está inactivada y los genes VGF y K3L están eliminados.

15 En primer lugar, se obtuvo el virus vaccinia V IHD-W recombinante en el cual se elimina el gen VGF en las mismas condiciones y métodos que en el Ejemplo 2.2.1., excepto que se utilizó el plásmido lanzadera VGF IHD-W. A partir de entonces, se obtuvo el virus vaccinia VK IHD-W recombinante en el cual se eliminan los genes VGF y K3L con los mismos métodos que anteriormente, excepto que se utilizaron el plásmido lanzadera K3L IHD-W y el virus vaccinia V IHD-W recombinante.

20 Además, el virus vaccinia VTiK IHD-W recombinante en el cual se inactiva la expresión del gen TK y se eliminan los genes VGF y K3L se obtuvo con los mismos métodos que anteriormente, excepto que se utilizaron el plásmido lanzadera TK(i) IHD-W y el virus vaccinia VK IHD-W recombinante.

Ejemplo 2.2.6. Producción del virus vaccinia IHD-W recombinante en el cual se inactiva la expresión del gen K3L y se eliminan los genes VGF y TK

25 Los plásmidos lanzadera K3L(i), VGF y TK como se construyeron en los Ejemplos 2.1.6., 2.1.1. y el Ejemplo 2.1.2., respectivamente, se utilizaron para producir un virus vaccinia IHD-W recombinante en el cual la expresión del gen K3L está inactivada y los genes VGF y TK están eliminados.

30 En primer lugar, se obtuvo el virus vaccinia V IHD-W recombinante en el cual se elimina el gen VGF en las mismas condiciones y métodos que en el Ejemplo 2.2.1., excepto que se utilizó el plásmido lanzadera VGF IHD-W. Posteriormente se obtuvo el virus vaccinia VT IHD-W recombinante en el cual se eliminan los genes VGF y TK con los mismos métodos que anteriormente, excepto que se utilizaron el plásmido lanzadera TK IHD-W y el virus vaccinia V IHD-W recombinante.

Además, el virus vaccinia VTKi IHD-W recombinante en el cual la expresión del gen K3L está inactivada y los genes VGF y TK están eliminados se obtuvo con los mismos métodos que anteriormente, excepto que se utilizaron el plásmido lanzadera K3L(i) IHD-W y el virus vaccinia VT IHD-W recombinante.

35 Ejemplo 3. Producción del virus vaccinia Lister recombinante

Ejemplo 3.1. Construcción del vector recombinante del virus vaccinia Lister en el cual se eliminan los genes VGF, TK y K3L

Ejemplo 3.1.1 Construcción del vector recombinante del virus vaccinia Lister en el cual se elimina el gen K3L

40 Los genes que flanquean al gen K3L en ambos lados del ADN genómico del virus vaccinia Lister (ATCC, VR-1549) se amplificaron mediante PCR. Aquí, en la Tabla 13 se muestra información sobre los cebadores utilizados para la amplificación de secuencias de bases homólogas que flanquean el gen K3L en ambos lados. De tal manera, se obtuvieron los fragmentos K3L-L(Lister) y K3L-R(Lister) y luego se realizó la clonación mediante InFusion de los mismos utilizando el pSP72-p7.5-DsRed generado en el proceso de construcción del plásmido lanzadera K3L IHD-W.

[Tabla 13]

Nombre	Secuencia (5'→3')	SEQ ID NO
VGF-R delantero (Lister)	CGCAGATAAAAAAGATATCCTTGTTAACGGGCTCGTAAATTG	SEQ ID NO: 62
VGF-R reverso (Lister)	GGAGACCGGCAGATCTTGATAATACACATATTTATTTAGGAAGCG	SEQ ID NO: 63
VGF-L delantero (Lister)	CACTATAGAACTCGAGCATATGTTTAAACGACGCATTATCTG	SEQ ID NO: 64

VGF-L reverso (Lister)	TGGGTTTGGAAAGCTTTTTTATACCGAACATAAAAAATAAGG	SEQ ID NO: 65
------------------------	--	---------------

5 El pSP72-p7.5-DsRed se trató con EcoRV y BglII, y el fragmento K3L-R(Lister) amplificado se clonó mediante InFusion en el mismo para construir pSP72-p7.5-DsRed-K3L-R(Lister). El pSP72-p7.5-DsRed-K3L-R(Lister) construido se trató con XhoI y HindIII, y el fragmento K3L-L(Lister) amplificado se clonó mediante InFusion en el mismo, para construir pSP72-K3L-L-p7.5-DsRed-K3L-R (Lister) (en lo sucesivo denominado como plásmido lanzadera Lister K3L) que es un plásmido lanzadera K3L.

Ejemplo 3.2. Producción del virus vaccinia Lister recombinante en el cual se eliminan los genes VGF, TK y K3L

Ejemplo 3.2.1. Producción del virus vaccinia Lister recombinante en el cual se eliminan los genes VGF y TK

10 Para poder asegurar un virus recombinante, se prepararon células HeLa en una placa de 6-pocillos en una condición de 3×10^5 células/pocillo y en un estado de medio MEM que contiene suero bovino fetal al 2%. Luego, las células HeLa se transfectaron con 2 µg del plásmido lanzadera VGF IDH como se construyó en el Ejemplo 2.1.1. utilizando jetPRIME y tratando simultáneamente con 0.05 de MOI del virus vaccinia Lister de tipo-silvestre. Después de 2 horas de incubación, el medio se reemplazó con medio MEM que contenía suero bovino fetal al 5% y luego las células se incubaron adicionalmente durante 48 horas. Finalmente, las células infectadas se recolectaron con 500 µl del medio y luego se lisaron repitiendo la congelación y el descongelamiento tres veces. El lisado celular se denominó virus crudo. El virus crudo producido se utilizó y se sometió a aislamiento en placa 6 veces, de modo que se aseguró el virus vaccinia Lister V recombinante puramente aislado.

15 El virus vaccinia Lister VT recombinante en el cual se eliminan los genes VGF y TK se aseguró en las mismas condiciones y métodos como se describió anteriormente, excepto que se utilizaron el virus vaccinia Lister V recombinante y el plásmido lanzadera TK IHD-W como se construyeron en el Ejemplo 2.1.2.

Ejemplo 3.2.2. Producción del virus vaccinia Lister recombinante en el cual se eliminan los genes VGF, TK y K3L

Para poder asegurar un virus recombinante, se obtuvo el virus vaccinia Lister TK recombinante en el cual se eliminan los genes VGF, TK y K3L en las mismas condiciones y métodos que en el Ejemplo 3.2.1, excepto que se utilizaron el plásmido lanzadera Lister K3L y el virus vaccinia Lister VT recombinante.

25 II. Identificación de la capacidad de destrucción de tumores del virus vaccinia recombinante *in vitro*

Ejemplo experimental 1. Identificación de la capacidad de destrucción de células cancerígenas del virus vaccinia recombinante en el cual se eliminan los genes VGF, TK y K3L

Se realizó un análisis CCK-8 para identificar si el virus vaccinia VTK recombinante como se produjo en el Ejemplo I tiene capacidad de destrucción contra diversos tipos de células cancerígenas.

30 Para poder identificar la capacidad de destrucción celular del virus recombinante en diversas líneas celulares humanas cancerígenas, se prepararon líneas celulares cancerígenas como se muestra en la Tabla 14, se incubaron en una incubadora bajo una condición de 37°C y CO₂ al 5% y luego se dividieron en alícuotas en placas de 96-pocillos.

[Tabla 14]

Carcinoma	Línea celular	Medio utilizado
Cáncer de cerebro	U-87MG (ATCC, HTB-14)	Medio MEM que contiene suero bovino fetal al 10%
Cáncer de hígado	Hep3B (KCLB. No. de Cat. 88064)	
Cáncer de próstata	DU145 (ATCC, HTB-81)	
Cáncer de cabeza y cuello	FaDu (ATCC, HTB-43)	
Fibrosarcoma	HT-1080 (ATCC, CCL-121)	
Cáncer de mama	T-47D (ATCC, HTB-133)	Medio RPMI que contiene suero bovino fetal al 10% e insulina recombinante
Cáncer de páncreas	MIA PaCa-2 (KCLB, 21420)	Medio DMEM que contiene suero bovino fetal al 10%
Cáncer colorrectal	SW620 (KCLB, 60068)	

Cáncer de ovario	A2780 (Sigma-Aldrich, 93112519)	Medio RPMI que contiene suero bovino fetal al 10%
Cáncer de pulmón	A549 (ATCC, No. de Cat. CCL-185)	

Aquí, se realizaron alícuotas de modo que el número de células por pocillo fue 5×10^4 para SW620, 2×10^4 para A2780, A549, DU145, T-47D y FaDu, 1×10^4 para Hep3B y HT-1080, y 5×10^3 para MIA PaCa-2 y U-87 MG. Después de 24 horas de incubación, las líneas celulares se infectaron con el virus vaccinia VTK IHD-W recombinante, el virus vaccinia ViTiKi WR recombinante o el virus vaccinia Lister VTK recombinante de manera que se logró 0.5 de MOI para cada virus. Aquí, se utilizaron como grupo control células que no habían sido tratadas con ningún virus. Después de 3 a 5 días, las células se tiñeron con solución CCK-8 (Dojindo, No. de Cat. CK04) para identificar las tasas de supervivencia de las líneas celulares cancerígenas. Los resultados se muestran en las gráficas 4A y 4B.

5
10 Como se muestra en la Fig. 4, se identificó que en un caso en el que los genes VGF, TK y K3L están eliminados o la expresión de los mismos está inactivada, se exhibe una capacidad de destrucción contra varios tipos de células cancerígenas independientemente de la cepa de vaccinia.

Ejemplo experimental 2. Identificación de la capacidad de destrucción de células cancerígenas del virus vaccinia recombinante en el cual se eliminan los genes VGF, TK y K3L o se inactiva la expresión de los mismos

15 Para poder identificar si los genes de la presente invención cuya expresión se suprime en un virus vaccinia recombinante exhiben una capacidad de destrucción contra células cancerígenas diferente dependiendo de los métodos para suprimir la expresión de los mismos, se identifica un grado de muerte de la línea celular de cáncer colorrectal SW620 causada por los virus vaccinia VTK, ViTK, VTiK y VTki IHD-W recombinantes como se producen en los Ejemplos 1.2.9. al 1.2.12.

20 En primer lugar, se incubó la línea celular de cáncer colorrectal humano SW620 en una incubadora bajo condiciones de 37°C y CO_2 al 5% utilizando medio RPMI que contiene suero bovino fetal al 10% y se dividieron en alícuotas en una placa de 96-pocillos. Aquí, las células SW620 se dividieron en alícuotas de 5×10^4 por pocillo. Después de 24 horas de incubación, la línea celular se infectó respectivamente con virus vaccinia VTK, ViTK, VTiK y VTki IHD-W recombinantes de modo que se logró MOI de 0.001, 0.01, 0.1, o 1. Después de 3 días, las células se tiñeron con la solución CCK-8 para identificar la ED_{50} . Los resultados se muestran en la Fig. 5.

25 Como puede observarse de los resultados, tanto el virus en el cual los genes VTK están suprimidos y la expresión de los mismos está completamente suprimida como el virus en el cual la expresión de los genes VTK está inactivada mediante destrucción estructural de los genes exhibieron una excelente capacidad de destrucción de células cancerígenas sin una diferencia estadísticamente significativa.

30 Ejemplo experimental 3. Identificación de la capacidad de destrucción selectiva de las células cancerígenas del virus vaccinia recombinante en el cual se eliminan los genes VGF, TK y K3L

35 Se identificó si un virus vaccinia recombinante en el cual se suprime simultáneamente la expresión de los tres genes de VGF, TK y K3L necesarios para la proliferación de un virus vaccinia en las células tiene una capacidad de destrucción selectivamente aumentada contra células cancerígenas en relación con células normales como en comparación con un caso de un virus vaccinia recombinante en el cual se suprime simultáneamente la expresión de los dos genes de VGF y TK o un virus vaccinia recombinante en el cual se suprime la expresión de un gen de K3L.

40 En primer lugar, se incubaron NHBE (Lonza, CC-2540), la cual es una línea celular humana normal, y SW620, la cual es una línea celular de cáncer colorrectal humano, en una incubadora bajo una condición de 37°C y CO_2 al 5% utilizando medio Basal BEBM (Lonza, 3171) que contiene BEGM SingleQuot Kit Suppl. y factores de Crecimiento (Lonza, CC-4175) para medio NHBE y RPMI que contiene suero bovino fetal al 10% para SW620, y se distribuyeron en alícuotas en placas de 96-pocillos. Aquí, las células NHBE y SW620 se dividieron en alícuotas respectivamente para que sean 5×10^3 y 5×10^4 por pocillo. Después de 24 horas de la incubación, las líneas celulares se infectaron respectivamente con el virus vaccinia IHD-W K, VT, VTK o WR K, ViTi, ViTiKi recombinante de modo que se logró MOI de 0.001, 0.01, 0.1, o 1. Después de 3 días, las células se tiñeron con una solución de CCK-8 para obtener valores de ED_{50} . La ED_{50} contra las células cancerígenas fue dividida por la ED_{50} de las células normales, y luego se hizo una comparación de la capacidad de destrucción selectiva contra las células cancerígenas en relación con las células normales basándose en un valor correspondiente a VTK(IHD-W) o ViTiKi(WR) en cada grupo de virus. Los resultados se muestran en la Fig. 6.

45
50 Como se muestra en la Fig. 6, en un caso del virus vaccinia IHD-W recombinante, se puede identificar que el virus IHD-W VT o VTK exhibe una capacidad de destrucción superior contra células cancerígenas en relación con las células normales en comparación con el virus IHD-W K, en el cual se suprime la expresión de un gen K3L. Además, se puede identificar que el virus IHD-W VTK exhibe una capacidad superior de destrucción selectiva de células cancerígenas en relación con el virus IHD-W VT. En un caso del virus vaccinia WR recombinante, se puede identificar que la

capacidad de destrucción de WR ViTiKi en el cual se suprime la expresión de los tres genes es superior en comparación con la de WR ViTi. Aquí, la ED₅₀ no se pudo obtener para WR K en el cual la expresión de un gen de K3L está suprimida debido a la muy baja capacidad de destrucción de la misma contra células normales y células cancerígenas.

- 5 En conclusión, se puede identificar que el virus vaccinia recombinante en el cual se suprime la expresión de los tres genes de VGF, TK y K3L exhibe una capacidad de destrucción selectiva de células cancerígenas superior en comparación con el virus vaccinia recombinante en el cual se suprime la expresión del gen K3L o los genes VGF y TK.

III. Identificación de los efectos anticancerígenos del virus vaccinia recombinante *in vivo*

- 10 Ejemplo experimental 4. Identificación de los efectos anticancerígenos del virus vaccinia recombinante en el cual se suprime la expresión de los genes VGF, TK y K3L en un modelo animal con tumor

Se identificaron en un modelo de ratón los efectos antitumorales de los virus vaccinia VT y VTK IHD-W recombinantes, o de los virus vaccinia ViTi y ViTiKi WR recombinantes tal como se produjeron en el Ejemplo I.

- 15 En primer lugar, se preparó la línea celular SW620, que es una línea celular de cáncer colorrectal, incubándola en medio RPMI que contiene suero bovino fetal al 10%. En un caso en el cual las células que se estaban incubando en una incubadora bajo condiciones de 37°C y CO₂ al 5%, ocupan 70% a 80% de una placa, las células se prepararon para la inoculación de células cancerígenas. Las células cancerígenas respectivas preparadas se centrifugaron a 1,500 rpm durante 5 minutos a 4°C para eliminar todo el sobrenadante, y las células se prepararon añadiendo un excipiente (medio RPMI) a las mismas. 5×10⁶ células preparadas de esta manera se inyectaron por vía subcutánea en el flanco derecho de un ratón desnudo (ratón nu/nu BALB/c; Charles River Japan (Yokohama)) para preparar un modelo de ratón con cáncer colorrectal. Después de una semana, en un caso en el cual un tumor creció hasta un tamaño de aproximadamente 70 a 100 mm³, los modelos de ratón preparados se dividieron en grupos para ser tratados con PBS, IHD-W VT, IHD-W VTK, WR ViTi y WR ViTiKi con 6 ratones por grupo, y luego se administraron virus una vez en el tumor a 5×10⁶ TCID₅₀. Los resultados de la identificación del tamaño de las células cancerígenas después de la administración de los virus se muestran en la Fig. 7.

- 25 Como se muestra en la Fig. 7, el crecimiento de células cancerígenas se suprimió en el grupo tratado con virus vaccinia IHD-W o WR recombinante en comparación con el grupo tratado con PBS (Welgene, No. de Cat. LB001-02), que es un grupo control. Sin embargo, se identificó que no había diferencias significativas en los efectos anticancerígenos entre el virus vaccinia IHD-W recombinante y el virus vaccinia WR.

- 30 Ejemplo experimental 5. Identificación de la seguridad del virus vaccinia recombinante en el cual se suprime la expresión de los genes VGF, TK y K3L

Para poder evaluar la seguridad de los virus vaccinia VT (ViTi) y VTK (ViTiKi) recombinantes de las cepas IHD-W y WR como se produjeron en el Ejemplo I, se identificaron el cambio de peso, la tasa de mortalidad y la respuesta inflamatoria de los ratones que recibieron los virus y se muestran en las Figs. 8 a 10.

- 35 Como se muestra en la Fig. 8, en los días 49 después de la administración de los virus vaccinia IHD-W recombinantes, el grupo al que se le administró VT mostró una tasa de pérdida de peso de 25%, mientras que el grupo al que se le administró VTK mostró una tasa de pérdida de peso de alrededor de 5%. Además, en los días 44 después de la administración de los virus vaccinia WR recombinantes, algunos individuos mostraron una tasa de pérdida de peso de 45% en el grupo tratado con ViTi, mientras que ningún individuo mostró una tasa de pérdida de peso en el grupo tratado con ViTiKi. Además, como se muestra en la Fig. 9, después de los días 49 después de la administración de los virus vaccinia recombinantes, tanto para las cepas IHD-W como para las WR, los grupos a los que se les administró VT (ViTi) mostraron una tasa de mortalidad del 34%, mientras que todos los individuos sobrevivieron en los grupos a los que se les administró VTK (ViTiKi).

- 45 Además, como se muestra en la Fig. 10, se pudo identificar que los ratones que sobrevivieron después de la administración de VT de la cepa IHD-W mostraron una mayor cantidad de respuesta inflamatoria en una región de la cola que los ratones que recibieron VTK de la cepa IHD-W.

A partir de los resultados anteriores, se puede observar que un caso en el cual se suprime la expresión de los tres genes de VGF, TK y K3L en el virus vaccinia recombinante es notablemente superior en términos de seguridad *in vivo* en comparación con un caso en el cual la expresión de los dos genes de VGF y TK está suprimida en el virus vaccinia recombinante.

- 50

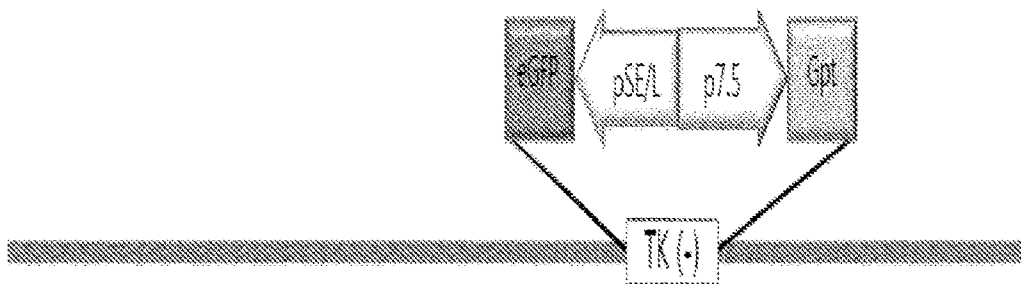
REIVINDICACIONES

1. Un virus vaccinia recombinante en el cual se suprime la expresión de únicamente los genes K3L, TK, y VGF.
2. El virus vaccinia recombinante de la reivindicación 1, en el que la expresión de los genes se suprime mediante la delección parcial o total de los genes, o la inserción de un gen extraño en los genes.
- 5 3. El virus vaccinia recombinante de la reivindicación 1, en el que el gen VGF es un polinucleótido que consiste en la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 66.
4. El virus vaccinia recombinante de la reivindicación 1, en el que el gen TK es un polinucleótido que consiste en la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 68.
- 10 5. El virus vaccinia recombinante de la reivindicación 1, en el que el gen K3L es un polinucleótido que consiste en la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 70.
6. El virus vaccinia recombinante de la reivindicación 1, en el que el virus vaccinia es uno cualquiera seleccionado del grupo que consiste en Western Reserve (WR), Virus Vaccinia New York (NYVAC), Wyeth (The New York City Board of Health), LC16m8, Lister, Copenhagen, Tian Tan, USSR, TashKent, Evans, International Health Division-J (IHD-J) e International Health Division-White (IHD-W).
- 15 7. El virus vaccinia recombinante de la reivindicación 1, en el que el virus vaccinia es IHD-W.
8. Una composición farmacéutica para uso en un método para prevenir o tratar cáncer, que comprende el virus vaccinia recombinante en el cual se suprime la expresión de los genes K3L, TK, y VGF, como un ingrediente activo, y que comprende además un aditivo farmacéuticamente aceptable.
- 20 9. La composición farmacéutica para uso de acuerdo con la reivindicación 8, en la que el cáncer es cáncer sólido o cáncer de sangre.
10. La composición farmacéutica para uso de acuerdo con la reivindicación 9, en la que el cáncer sólido es uno cualquiera seleccionado del grupo que consiste en cáncer de pulmón, cáncer colorrectal, cáncer de próstata, cáncer de tiroides, cáncer de mama, cáncer de cerebro, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de esófago, cáncer de piel, cáncer de timo, cáncer gástrico, cáncer de colon, cáncer de hígado, cáncer de ovario, cáncer de útero, cáncer de vejiga, 25 cáncer de recto, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vías biliares, cáncer de páncreas y combinaciones de los mismos.
11. La composición farmacéutica para uso de acuerdo con la reivindicación 9, en la que el cáncer de sangre es uno cualquiera seleccionado del grupo que consiste en linfoma, leucemia aguda, mieloma múltiple, y combinaciones de los mismos.
- 30 12. Un virus vaccinia recombinante en el que se suprime la expresión de los genes K3L, TK, y VGF para uso en la prevención o el tratamiento contra el cáncer en un individuo.
13. El virus vaccinia recombinante para uso de acuerdo con la reivindicación 12, en la que el cáncer es uno cualquiera seleccionado del grupo que consiste en cáncer de pulmón, cáncer colorrectal, cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de cerebro, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de esófago, cáncer de piel, cáncer de hígado, cáncer de ovario, cáncer de páncreas y combinaciones de los mismos.

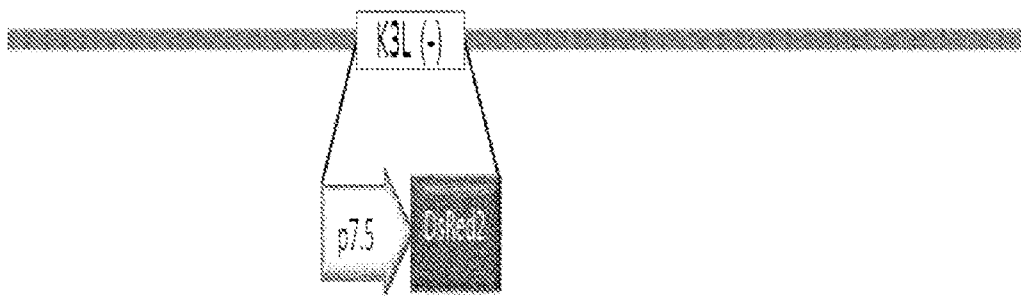
[Fig.1]



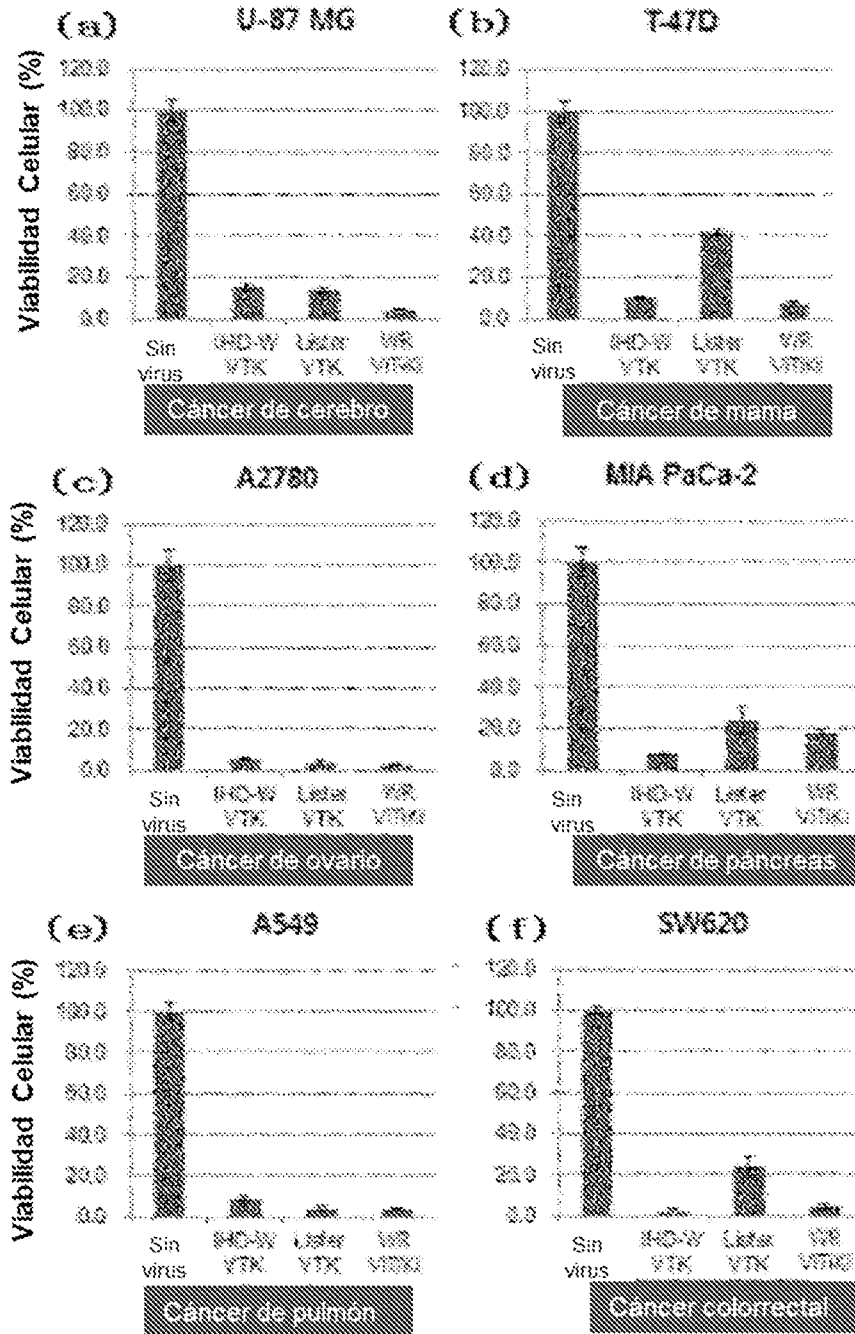
[Fig.2]



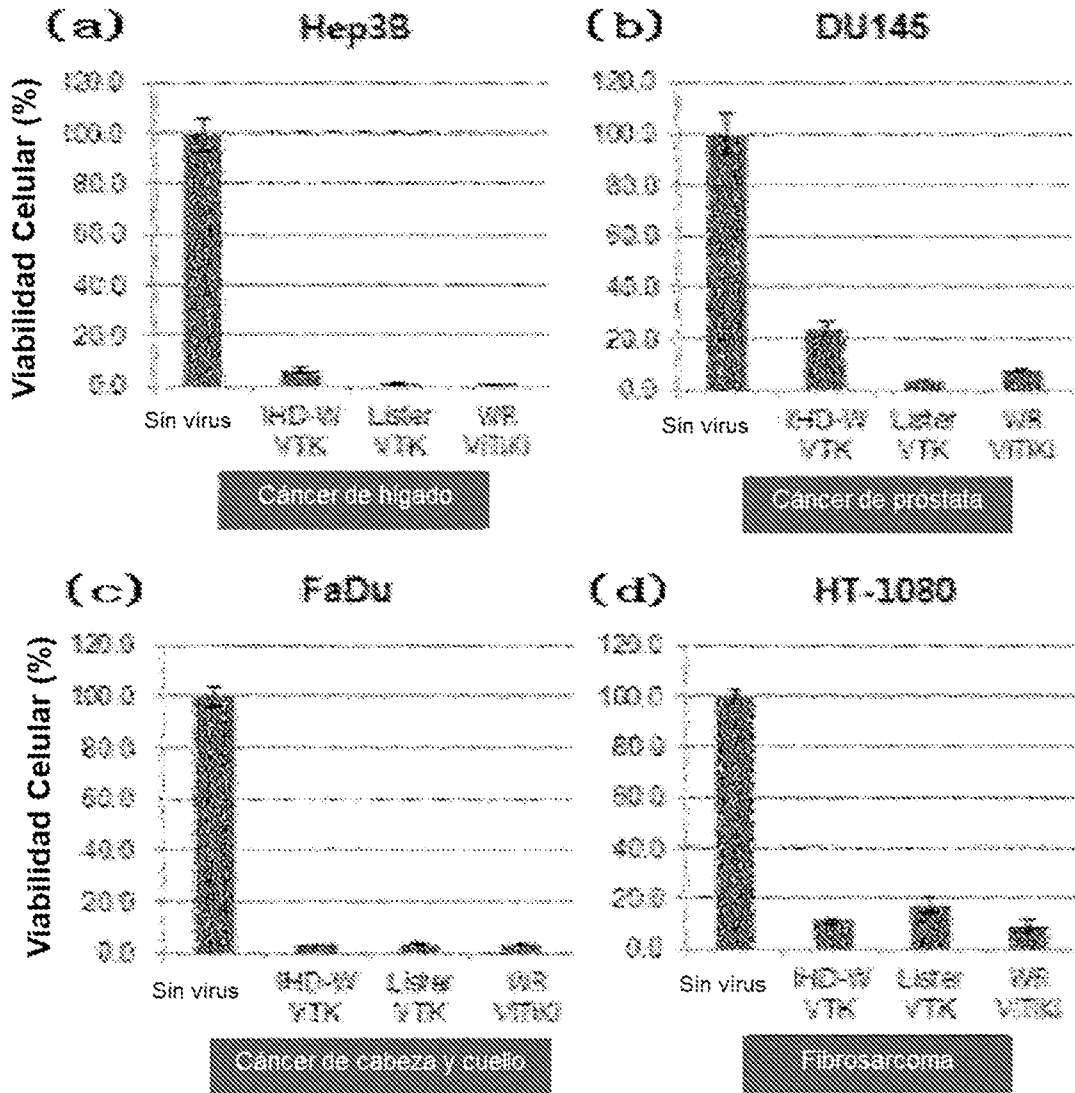
[Fig.3]



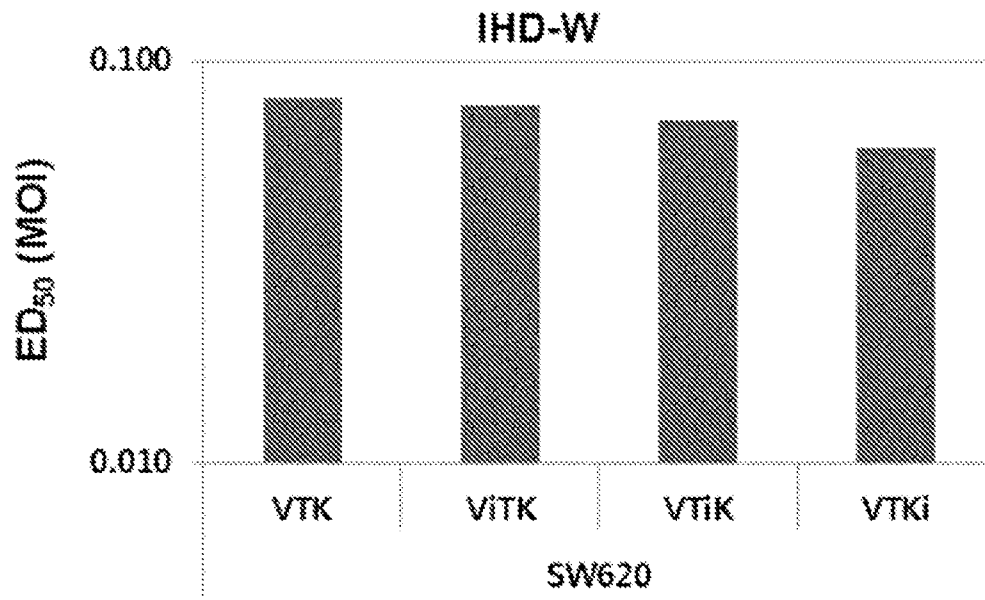
[Fig. 4A]



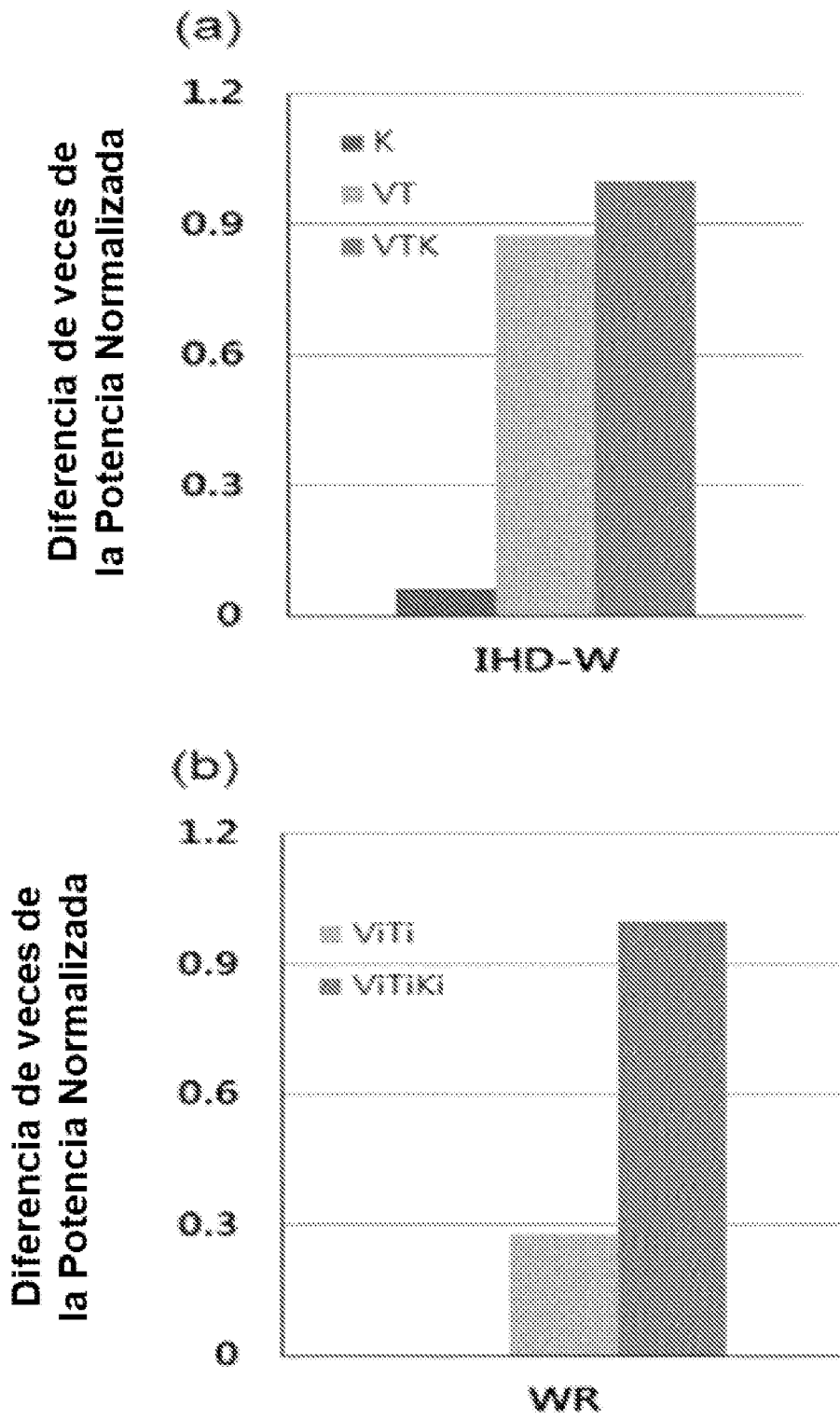
[Fig. 4B]



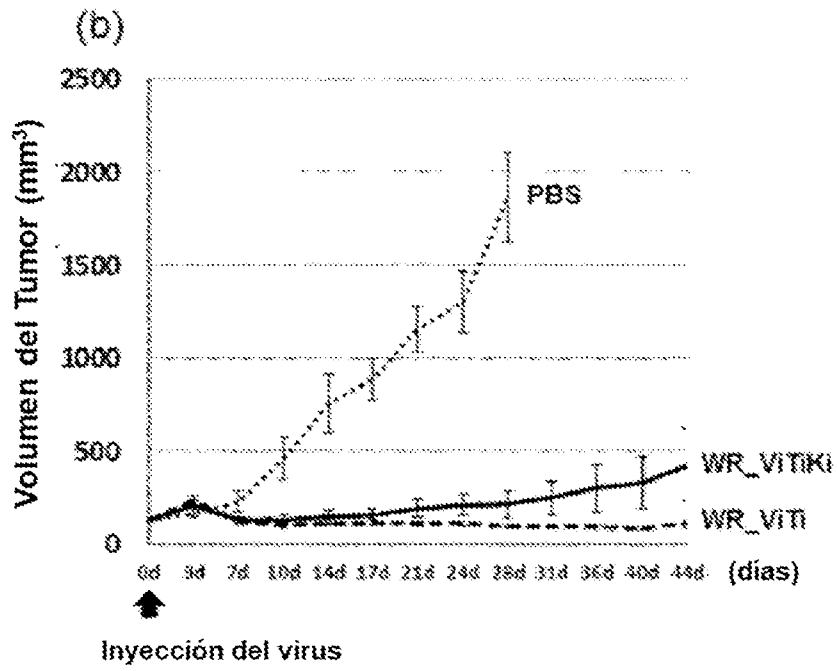
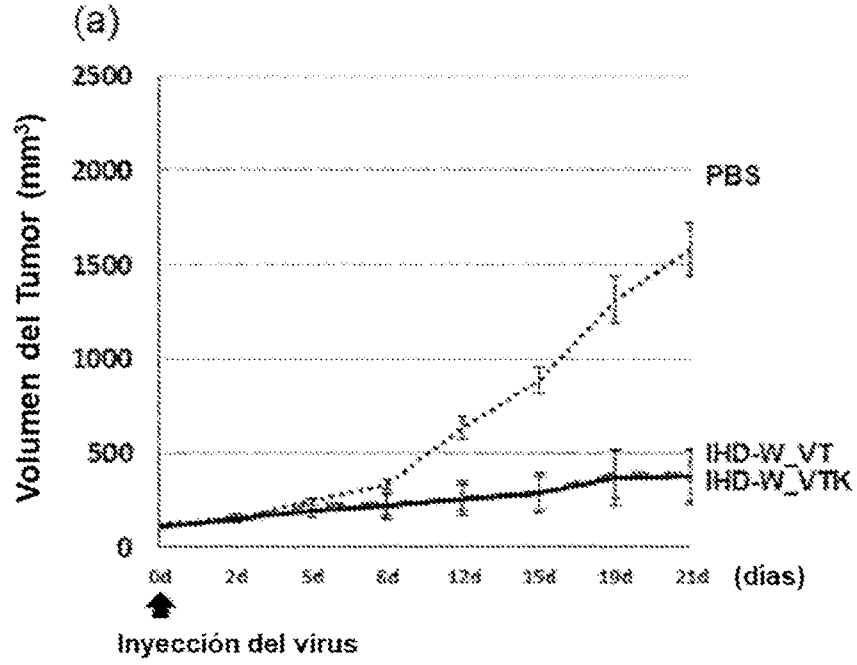
[Fig. 5]



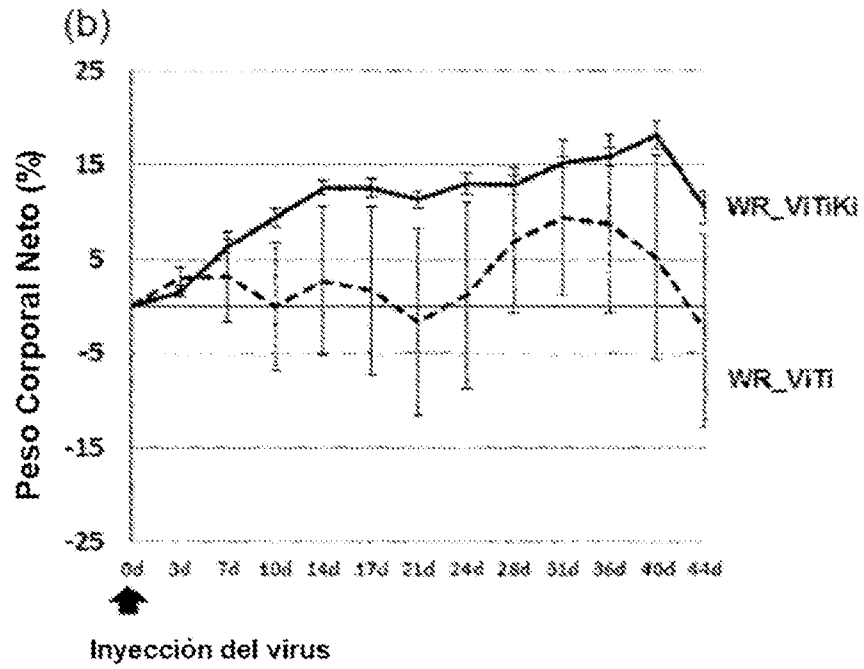
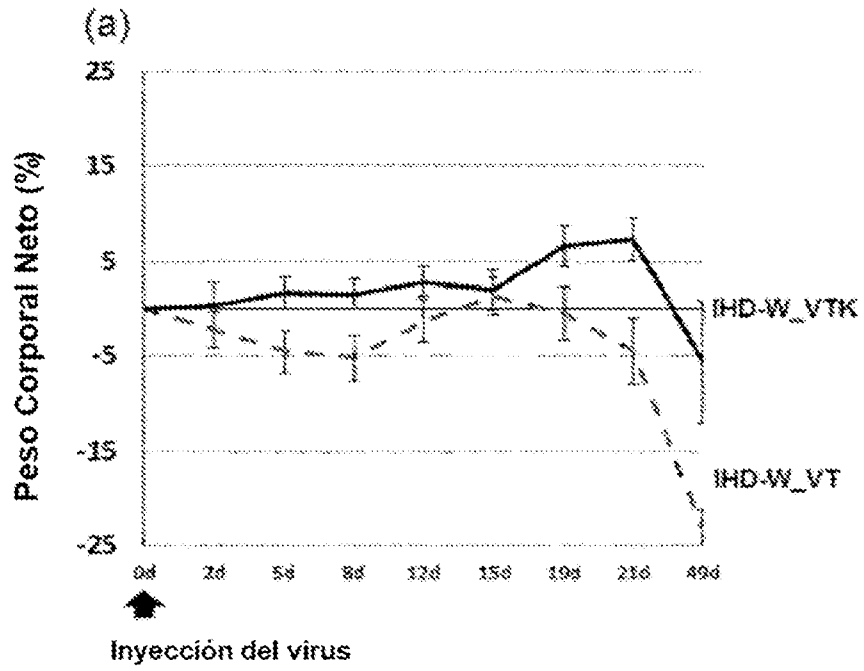
[Fig. 6]



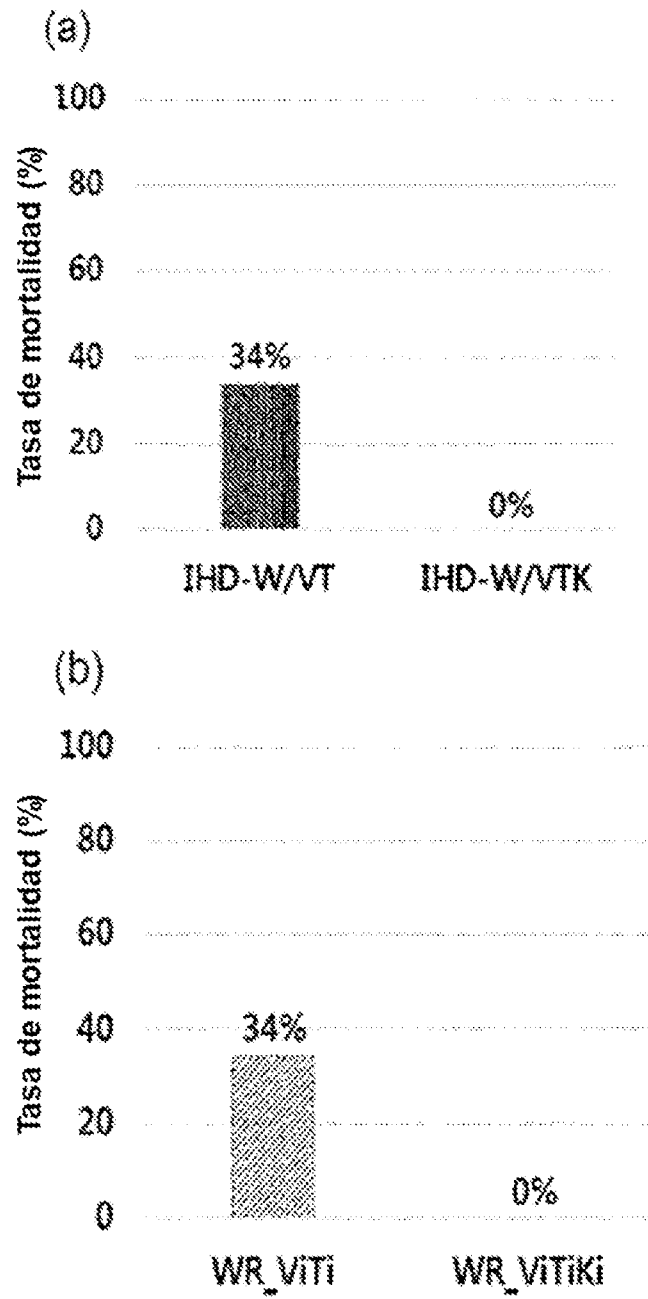
[Fig. 7]



[Fig. 8]

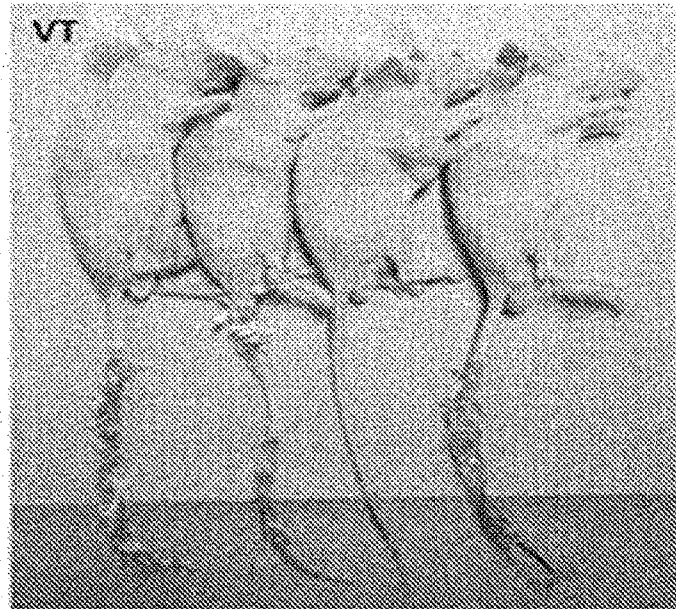


[Fig. 9]



[Fig. 10]

(a)



(b)

