

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 995 014**

51 Int. Cl.:

C12N 15/86 (2006.01)

A61K 39/12 (2006.01)

A61K 39/165 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.04.2018** **PCT/US2018/026079**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.11.2018** **WO18212842**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.04.2018** **E 18802836 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.08.2024** **EP 3625349**

54 Título: **Virus modificados**

30 Prioridad:

16.05.2017 US 201762506892 P

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

05.02.2025

73 Titular/es:

**MAYO FOUNDATION FOR MEDICAL EDUCATION
AND RESEARCH (100.00%)
200 First Street S.W.
Rochester, MN 55905, US**

72 Inventor/es:

**MUNOZ ALIA, MIGUEL A. y
RUSSELL, STEPHEN JAMES**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 995 014 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 modificados

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud reivindica prioridad a la Solicitud de EE. UU. N° de Serie 62/506,892, presentada el 16 de mayo de 2017.

5 ANTECEDENTES*1. Campo técnico*

Este documento se refiere a virus de sarampión recombinantes que tienen una susceptibilidad reducida a la neutralización de anticuerpos (por ejemplo neutralización de anticuerpos por suero de vacunas contra el virus del sarampión).

10 2. Información básica

El virus del sarampión (MV) causa muchas muertes cada año, principalmente niños menores de cinco años. Los niños no vacunados corren el mayor riesgo de sarampión y muertes relacionadas con el sarampión. En particular, los lactantes cuyos títulos de anticuerpos contra el sarampión maternos han disminuido a niveles no protectores pero aún son demasiado pequeños para recibir la vacuna contra sarampión recomendada para lactantes de 9 a 12 años, pueden tener un riesgo elevado de sarampión y muertes relacionadas con el sarampión.

Además, los MV del linaje Edmonston han demostrado ser fármacos anticancerígenos potencialmente potentes cuando se administran a pacientes de cáncer seronegativo para el sarampión. Sin embargo, más del 90 % de los pacientes de cáncer en la mayoría de los países tienen títulos protectores de anticuerpos contra el sarampión en la sangre (por ejemplo debido a la infección natural por sarampión o la vacunación contra el sarampión). El suero humano inmune al sarampión anula la eficacia terapéutica de MV oncolíticos en ratones portadores de tumores al neutralizar el virus antes de que alcance su objetivo (las células tumorales). Por lo tanto, la mayoría de los pacientes de cáncer no pueden beneficiarse de la terapia con MV oncolítico administrado sistémicamente. El documento WO 2014/015242 A1 describe virus de sarampión con una susceptibilidad reducida a la neutralización.

SUMARIO

25 La presente invención se define mediante las reivindicaciones independientes.

Este documento proporciona virus de sarampión recombinantes que tienen una susceptibilidad reducida a la neutralización de anticuerpos (por ejemplo neutralización de anticuerpos por anticuerpos anti-MV monoclonales y/o suero de vacunas contra MV). Por ejemplo, este documento proporciona MV recombinantes con una capacidad reducida de ser reconocidos por los anticuerpos anti-MV que se generaron contra un MV de tipo salvaje o una vacuna contra MV preexistente en comparación con los polipéptidos H y F de MV de tipo salvaje o los polipéptidos H y F de una vacuna contra MV preexistente.

Como se demuestra en el presente documento, un MV recombinante con un gen H sustituido que codifica una proteína H de sarampión mutada de manera múltiple, de la que se han eliminado varios epítomos inmunodominantes, y un gen F sustituido que codifica una proteína F del virus del moquillo canino, es resistente a la neutralización por suero humano inmune al sarampión. Un MV recombinante descrito en el presente documento se puede utilizar para abordar las principales limitaciones de las vacunas contra el sarampión disponibles actualmente, las vacunas de plataforma basadas en MV y MV oncolíticos, concretamente su susceptibilidad a la neutralización por suero humano inmune al sarampión.

En un aspecto, esta invención presenta un virus de sarampión recombinante que incluye un ácido nucleico que codifica un polipéptido H del virus de sarampión que incluye SEQ ID NO:9, que tiene las siguientes sustituciones de aminoácidos: S189P, E235G, N238D, L249P, G302R, Y310C, Q311R, R377Q, M378K, D416N, E471K, N481Y, K488E, G491E, H495R, D505T, R533G, S546G, R547G y F552V; y un ácido nucleico que codifica un polipéptido F del virus del moquillo canino, en donde dicho polipéptido H del virus del sarampión codificado y dicho polipéptido F del virus del moquillo canino se incorporan en la envoltura de dicho virus recombinante, en donde dicho virus carece tanto de un polipéptido F del virus del sarampión como de un ácido nucleico que codifica dicho polipéptido F del virus del sarampión, y en donde dicho virus carece tanto de un polipéptido H del virus de sarampión de tipo salvaje como de un ácido nucleico que codifica dicho polipéptido H del virus del sarampión de tipo salvaje.

En otro aspecto, esta invención presenta una composición para uso en un método para la viroterapia oncolítica en un paciente de cáncer inmune al sarampión, incluyendo dicho método la administración a dicho paciente de dicha composición que comprende el virus del sarampión recombinante del anterior aspecto.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente alguien con habilidad ordinaria en la materia a la que pertenece esta invención. Aunque se pueden utilizar métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento, a continuación se describen métodos y materiales adecuados. En caso de conflicto entre la presente memoria descriptiva y una referencia mencionada en el presente documento, controlará la presente memoria descriptiva, que incluye definiciones. Además, los materiales, métodos y ejemplos son únicamente ilustrativos y no pretenden ser limitantes.

DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 presenta mutaciones codificadas en el polipéptido MV-H para escapar de la neutralización.

La Figura 2 muestra que las mutaciones en MV-H eluden anticuerpos neutralizantes, pero los anticuerpos específicos de F neutralizan el MV.

La Figura 3 incluye esquemas de MV, CDV y MV que codifican CDV H, CDV F o ambos y su correspondiente sensibilidad de neutralización por sueros humanos completos agrupados o MV H/F absorbidos específicamente.

La Figura 4 representa el tropismo y la capacidad de fusión de un polipéptido H de MV en combinación con un polipéptido F de CVD.

La Figura 5 ilustra que un polipéptido H de MV puede inducir anticuerpos ampliamente neutralizantes contra múltiples cepas de MV.

La Figura 6 muestra un polipéptido H de MV de origen natural (SEQ ID NO: 1), un ácido nucleico que codifica un polipéptido H de MV de origen natural (SEQ ID NO:2), un polipéptido H modificado (SEQ ID NO:3), un polipéptido F de MV de origen natural (SEQ ID NO:4), un ácido nucleico que codifica un polipéptido F de MV de origen natural (SEQ ID NO:5), polipéptidos F de CDV (SEQ ID NOs: 6 y 7), un polipéptido H de CDV (SEQ ID NO:8) y un polipéptido H de MV de origen natural de MV/Madrid.SPA/50.10[H1] (SEQ ID NO:9).

Figures 7A-E. Sistema genético inverso para el rescate del virus sigiloso: Optimización del plásmido de expresión de antígeno. (A) Número de células que expresan GFP determinado por citometría de flujo tres días después de la transfección de células de rescate BHK. (B) La producción de virus el tercer día después de la transfección se determinó mediante células de rescate mediante congelación-descongelación (P_0) y titración en células Vero. (C) Diagrama de dispersión que muestra la correlación entre eficiencia de rescate y producción de virus. (Pearson $r=0,789$, $p<0,05$). Las líneas discontinuas representan 95 % de intervalo de confianza. (D) Rescate de virus recombinantes. Las células de rescate se superpusieron a las células Vero 3 días después de la transfección y 3 días después se evaluó la formación de sincitios. * Indica falta de representatividad en la microfotografía. La flecha indica una única célula GFP-positiva. Después de cinco pasajes semiciegos, el virus sigiloso comenzó a propagarse de manera similar al virus parental. (E) Construcciones de plásmido utilizadas en este estudio. Se muestran las variaciones de la secuencia clave entre construcciones. T_{min} es un promotor de T7 mínimo y la adición de GGGAGA (SEQ ID NO: 10) impulsa niveles más elevados de expresión génica (T_{opt}). Sin embargo, un promotor de T7 óptimo requiere una ribozima cabeza de martillo autodisociada (HHrbz) (Yun et al., J. Virol., 89(2):1242-53 (2015)). Se muestran la construcción 1 (SEQ ID NO:11) y la construcción 2 (SEQ ID NO:12). Se describió la construcción 3 (SEQ ID NO:13) en otro lugar (Beaty et al., mSphere, 2(2):pp00376-16 (2017)). La construcción 4 (SEQ ID NO:14) tiene adicionalmente un promotor 5' del núcleo del Factor de Elongación-1 α (hEFL-HTLV) seguido de una secuencia de intrones quiméricos. Todas las construcciones tenían la ribozima de Hepatitis delta (HDV) y el terminador T7 aguas abajo del antígeno MeV.

Figuras 8A-B. Injerto de la huella de CD46 en el genotipo H1 de MeV-H. (A) Panel izquierdo. Las células CHO que expresan o no los receptores celulares (SLAM, CD46 y nectina-4) se infectaron con MeV que expresa GFP codificando el MeV-H indicado, en moi 0.1. Se registró la autofluorescencia de eGFP 72 horas después de la infección. (A) Panel derecho. Fusión celular desencadenada por la coexpresión de la vacuna contra MeV-F y la MeV-H indicada. Se tiñeron las células 48 horas después con Giemsa y se tomaron microfotografías. Aumento, $\times 40$. (B) Cinética de la fusión célula-célula determinada por el ensayo de luciferasa dividida.

Figuras 9A-B. Variación antigénica en virus $\Delta 7$. (A) Modelo de la estructura dimerica de MeV- $\Delta 7$ con azúcar enlazado a N adherido. Los azúcares enlazados a N se representan como esferas negras (enlazados a N168, N200, N215) o naranja (enlazado N416). Se indican las diferencias de aminoácidos con respecto a la cepa Moraten de la vacuna de MeV-H. Azul, cambios específicos del genotipo H1 de MeV-H; rojo, mutaciones de nAb-escape modificadas genéticamente. (B) Mapa antigénico de virus que codifican diferentes proteínas H de MeV. La antigenicidad se determinó mediante un ensayo de microneutralización de reducción de placa viral (PRMN) y se codificó por colores según las diferencias de \log_2 NT50. En la Figura 19 se muestran curvas de neutralización individuales.

Figuras 10A-D. BH030 define un nuevo sitio antigénico en MeV-H. (A) Ensayo PRMN de mAb BH030 contra MeV recombinante que codifica diferentes MeV-H específicos del genotipo. Los puntos de datos se ajustaron

mediante análisis de regresión no lineal con Graph Pad Prism. La concentración inhibitoria del 50 % (IC₅₀) se indica mediante una línea punteada. Cabe señalar que los virus C2 escapan selectivamente a la neutralización. (B) Alineamiento de la secuencia de aminoácidos para el epítipo putativo BH030, que muestra la sustitución diferencial de aminoácidos en virus C2. Se establece consenso como SEQ ID NO:15. (C) los virus H1 muestran resistencia contra la neutralización de BH030 en comparación con los virus A y el mutante A (416DLS4NLS), pero aún así están neutralizados, así como los virus Δ7. La adición de E471E en Δ7, nombre en el presente documento Δ8, da lugar al escape BH030. (D) Sitio antigénico putativo definido por mAb BH030. Glu471 no está enmascarado por el azúcar enlazado a N416, que apantalla el sitio IIb y, por lo tanto, define un nuevo sitio antigénico putativo, V, que se expande desde los sitios IIb al sitio III.

Figuras 11A-C. Inmunogenicidad de un MeV-H derivado. (A) Representación esquemática del experimento. Se inyectaron ratones C57BL/6 por vía intravenosa en un plazo de 5 segundos con plásmidos de expresión para GFP (control negativo) o diferentes variantes de MeV-H. Un mes después, se evaluó la actividad de los anticuerpos neutralizantes mediante el ensayo PRMN contra el virus vacuna (B) o el virus Δ8 (C). Cada punto de datos representa un solo individuo. Los puntos ausentes se debieron a la muerte del animal o la escasez de material. Se incluyen datos de dos inmunizaciones diferentes. El sombreado gris indica un nivel de anticuerpos neutralizantes que se considera no protector contra la enfermedad. Las líneas punteadas de Lowe indican el límite de detección para el ensayo.

Figuras 12A-D. Los virus Δ8 escapan a una respuesta policlonal anti-MeV-H más amplia. (A) Panel izquierdo, ensayo PRMN de anticuerpos policlonales anti-MeV-H de conejo contra virus mutantes de la vacuna y MeV-H (Δ7 y Δ8). Las curvas se ajustaron mediante regresión no lineal para calcular los valores de NT₅₀. Panel derecho. Diferencias de título de neutralización (ND) entre virus. Los mismos anticuerpos policlonales anti-MeV-H de conejo se probaron adicionalmente contra un panel de virus recombinantes que codifican genes MeV-H específicos del genotipo o el mutante Δ8, el NT₅₀ se calculó como en el panel izquierdo y el ND se representa gráficamente como log₂. Una diferencia ≥2 log₂ se considera diferente antigénicamente en lo sustancial (línea punteada). (B) Seguimiento de las condiciones de depleción de glicoproteínas MeV. Niveles de anticuerpos IgG después de incubación de sueros humanos con células que no expresan o expresan alguna de las glicoproteínas MeV MeV-H y MeV-F (Figura 20), en comparación con los niveles en sueros humanos no tratados (condición 0). Las muestras de suero se diluyeron 1:10 en medio de cultivo y posteriormente se cultivaron durante 4 días sobre una monocapa de células Mel-JuSo (Mel-JuSo/wt, condición 1; Mel-Ju-So-H, condición 2; Mel-JuSo-F, condición 3). Se recogieron los sobrenadantes y se comprobó la presencia de anticuerpos específicos de MeV-F y MeV-H mediante un ensayo de inmunofluorescencia medido por FACS. La línea punteada encierra valores considerados negativos. (C) Niveles de IgG de VCA en U/mL que quedan después de la condición de depleción específica de MeV-F. (D) Capacidad de neutralización de sueros policlonales humanos frente a los virus vacuna y Δ8. Se recogieron muestras de sueros de adultos jóvenes vacunados sanos y se dejaron sin tratar o se sometieron a depleción a partir de anticuerpos específicos de MeV-F. Se utilizaron los niveles de IgG de VCA del virus de Epstein-Barr (EBV) para comparar la potencia de neutralización entre condiciones, teniendo en cuenta los factores de dilución entre ellas. Los datos se presentan como la media de muestras individuales de sueros (N=6). La línea de tendencia de la curva de neutralización a través de las muestras se determinó mediante ajuste de regresión no lineal. ***P<0,0005, prueba de rango con signo por pares emparejados de Wilcoxon.

Figuras 13A-B. Papel de MeV-H y MeV-H en la neutralización del virus. (A) Especificidad de la glicoproteína de MeV de sueros humanos agrupados. Las condiciones y los niveles específicos de IgG se describieron y se determinaron como se muestra en la Figura 12. Los datos se muestran como gráficos de histograma. (B) PRNM de virus de intercambio de envolturas. Se utilizaron rMeV isogénicos que codifican glicoproteínas de envoltura de MeV (virus 1, indicado en rojo) o CDV (virus 2, indicado en azul), así como quimeras virales entre ellos (virus 3 y 4), para la sensibilidad de neutralización frente a sueros humanos preincubados con células control (no absorbidas) o células que expresan glicoproteínas MeV-H o MeV-F. Se muestran sincitios representativos.

Figuras 14A-D. Caracterización de MeV recombinantes. (A) Cinética de replicación de virus recombinantes. Se infectaron Vero/hSLAM con el virus indicado en MOI de 0,03. En el tiempo indicado se registraron y superpusieron imágenes de autofluorescencia GFP y de campo claro. Aumento, x40. Posteriormente se recogieron células en el medio de cultivo y se determinó el título del virus en Vero/hSLAM como FFU/mL. A, H1 y Δ8 indican MeV que expresa los genes MeV-H equivalentes y MeV-F de la vacuna, mientras que el virus sigiloso es un virus que codifica MeV-HΔ8 junto con CDV-F. (B) Incorporación de proteínas en viriones. Se sometieron a electroforesis 10⁴ partículas de virus en condiciones reductoras y se sometieron a inmunotransferencia con el anticuerpo relevante. Cabe señalar que el anticuerpo anti-MeV-F no reacciona de forma cruzada con CDV-F. (C) Panel izquierdo. Valores de PRMN NT₅₀ de sueros humanos inmunes al sarampión frente a los virus MeV A (vacuna) y sigiloso. Cada línea representa un único individuo (N=14). La línea punteada indica el umbral de niveles de anticuerpos para la protección contra la enfermedad clínica. Se utilizó como control el suero anti-CVD de hurón. ***, P<0,001, según lo determinado mediante prueba de rango con signo por pares emparejados de Wilcoxon. Panel derecho, correlación entre NT₅₀ para el virus vacuna y sigiloso. Los valores de NT₅₀ se representan gráficamente en una escala log₂. P<0,001, en la prueba de correlación de Pearson y Spearman. Las líneas punteadas indicaban el intervalo de confianza del 95 % para el análisis de regresión. R=0,51. (D) PRMN de antisuero policlonal MeV de cobaya contra los virus A y sigiloso. Se realizó una regresión no lineal para calcular los valores de NT₅₀, que se transformaron a mIU/mL (3584 para el virus A y 563 para el virus sigiloso).

Figuras 15A-D. Comparación de la huella de los receptores en MeV-H. (A) Representación esquemática de la secuencia primaria MeV-H. De izquierda a derecha: C, cola citoplasmática; T, dominio transmembrana; dominio de tallo; β 1-6, palas de hélice beta 1-6. Se indican las posiciones de aminoácidos que delimitan los diferentes dominios. (B a D) MeV-H se muestra como una cinta con un color del arco iris coherente con el panel A, mientras que los receptores se muestran como una superficie translúcida coloreada en cian (SLAM, panel A), magenta (nectina-4, panel B) y azul (CD46, panel C). Las esferas indican residuos $\leq 4,5\text{\AA}$ de la entidad receptora SLAM (PDB: 3ALZ), nectina-4 (PDB: 4GJT) y CD46 (PDB: 3INB), coloreado de cian, magenta y azul, respectivamente. En cada estructura del complejo del receptor MeV-H, las esferas tienen un color diferente a la coloración del receptor si el residuo también es relevante para la interacción con cualquiera de los otros receptores, y se colorean en consecuencia. El residuo Y524 relevante para la interacción con los tres receptores está coloreado en naranja. Como comparación, la orientación MeV-H se mantiene constante en todos los paneles. La representación en bastón representa residuos implicados estructuralmente según lo definido por $< 4,5\text{\AA}$ de la entidad receptora, pero no funcionalmente (L464, L482, F483, L500, D530, Y543, S548) y viceversa (V451, N-Y481, K488, P497) (Mateo et al., J. Virol., 87(16):9208-16 (2013)).

Figuras 16A-D. Uso de receptor para el virus sigiloso. (A) Infección por virus sigiloso de un panel de células CHO que expresan o no los receptores MeV. La infección se realizó en MOI 0,03 y se registró 3 días después. Aumento x40. (B) Citometría de flujo para determinar la expresión superficial de receptores MeV en el panel CHO. Las células se tiñeron con el anticuerpo correspondiente y el número de moléculas por célula se determinó con Quantibrite BD. (C) Ensayo de fusión cinética después de coexpresión de la cepa de la vacuna contra MeV-F con la cepa de la vacuna contra MeV-H o MeV-H Δ 8. Media \pm desviación estándar (n=3). (D) Unión de receptores MeV-Fc a la proteína MeV-H unida a plástico, controlada por OD (Figura 18). Los puntos de datos se presentan como media \pm desviación estándar (n=3) y se ajustaron a un modo de unión total de un sitio ($R^2 \geq 0,99$). * $P < 0,05$; ** $P < 0,005$; *** $P < 0,0001$. ANOVA de un factor con las comparaciones múltiples de Bonferroni.

Figura 17. Ensayo de fusión cinética en células Vero. La cepa de la vacuna contra MeV-H o Δ 8 se transfectó conjuntamente con la cepa de la vacuna contra MeV-F. La fusión se cuantificó mediante el ensayo de luciferasa dividida. La transfección de MeV-F por sí sola sirvió como control negativo. Media \pm desviación estándar de un experimento representativo realizado por triplicado.

Figura 18. Método ELISA para la determinación de la unión del receptor a MeV-H. Los micropocillos revestidos previamente con Strep-tactin XT se incubaron con sobrenadante que contenía MeV-H, seguido de incubación con anticuerpo anti-FLAG (control) o receptor-Fc único. La unión se reveló mediante anti IgG conjugada con HRP y se siguió mediante densidad óptica.

Figura 19. Ensayo PRMN de mAbs anti-MeV-H. Los resultados se expresan como % de control de virus en ausencia de mAb. Los datos se presentan como media \pm desviación estándar de dos experimentos independientes realizados por cuadruplicado.

Figura 20. Citometría de flujo para caracterizar la expresión de la glicoproteína MeV en líneas celulares Mel-JuSo. Las células Mel-JuSO parentales y las células Mel-JuSO que expresan MeV-H o MeV-F se tiñeron con mAb anti-MeV-H (C28-10-8) o anti-MeV-F (F3-5) y los resultados se muestran como histogramas.

Figura 21. Análisis de correlación para los niveles de anticuerpos IgG específicos de MeV-H y MeV-F. Los puntos negros representan individuos vacunados únicos. La flecha indica un suero humano agrupado (Valley Biomedical). Análisis estadístico realizado con correlación de Pearson de dos colas.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Este documento proporciona ácidos nucleicos, polipéptidos y virus que contienen los ácidos nucleicos y/o polipéptidos. Este documento también proporciona métodos para usar los virus para tratar pacientes de cáncer o para vacunar lactantes para ayudar a protegerlos de infecciones por MV. Por ejemplo, este documento proporciona polipéptidos de hemaglutinina (H) MV, ácidos nucleicos que codifican polipéptidos H de MV, polipéptidos F de CDV, secuencias de ácidos nucleicos que codifican polipéptidos F de CDV y virus que contienen tales ácidos nucleicos y/o polipéptidos. Por ejemplo, este documento proporciona un virus recombinante (por ejemplo un MV o un adenovirus (Ad)) que contiene un ácido nucleico que codifica un polipéptido H modificado y un ácido nucleico que codifica un polipéptido F modificado. Tal virus recombinante puede exhibir susceptibilidad reducida a la neutralización de anticuerpos, una capacidad reducida para desencadenar la fusión de membranas y/o una disminución de la aptitud replicativa. Un virus recombinante descrito en el presente documento se puede propagar en células (por ejemplo células humanas como células Vero y células HeLa) tan eficientemente como un virus de tipo salvaje. Los virus descritos en el presente documento se pueden utilizar para tratar pacientes de cáncer o para vacunar lactantes de manera que los virus exhiban una susceptibilidad reducida a la neutralización de anticuerpos. En algunos casos, se puede utilizar un virus recombinante para tratar cáncer en pacientes que tienen inmunidad preexistente contra el sarampión. En algunos casos, se puede utilizar un virus recombinante para vacunar niños que tienen anticuerpos contra el sarampión neutralizantes (por ejemplo anticuerpos neutralizantes contra el sarampión adquiridos por vía transplacentaria).

Este documento proporciona polipéptidos H, polipéptidos F y ácidos nucleicos que los codifican, que son heterólogos a los polipéptidos H y F de origen natural.

El término "ácido nucleico" tal como se utiliza en el presente documento abarca tanto ARN como ADN, incluido ADNc,

ADN genómico y ADN sintético (por ejemplo sintetizado químicamente). Un ácido nucleico puede ser bicatenario o monocatenario. Un ácido nucleico monocatenario puede ser la cadena sentido o la cadena antisentido. Además, un ácido nucleico puede ser circular o lineal.

Un "ácido nucleico aislado" se refiere a un ácido nucleico que está separado de otros ácidos nucleicos que están presentes en un genoma viral, incluyendo ácidos nucleicos que flanquean normalmente uno o ambos lados del ácido nucleico en un genoma viral. El término "aislado" tal como se utiliza en el presente documento con respecto a ácidos nucleicos incluye también cualquier secuencia de ácidos nucleicos de origen no natural, ya que tales secuencias de origen no natural no se encuentran en la naturaleza y no tienen secuencias inmediatamente contiguas en un genoma de origen natural.

Un ácido nucleico aislado puede ser, por ejemplo, una molécula de ADN, siempre que se elimine o esté ausente una de las secuencias de ácido nucleico que, por lo general, se encuentran flanqueando inmediatamente esa molécula de ADN en un genoma de origen natural. Por lo tanto, un ácido nucleico aislado incluye, entre otros, una molécula de ADN que existe como una molécula separada (por ejemplo un ácido nucleico sintetizado químicamente o un ADNc o un fragmento de ADN genómico producido mediante PCR o tratamiento con endonucleasa de restricción) independientemente de otras secuencias, así como ADN que se incorpora en una construcción de ácido nucleico (por ejemplo un vector como un vector de expresión, un plásmido que se replica de manera autónoma o un virus (por ejemplo un paramixovirus, retrovirus, lentivirus, Ad, virus de herpes, adenovirus, parovirus como un virus asociado a Ad, rhabdovirus, como un virus de estomatitis vesicular o virus vacuna) o en el ADN genómico de un procarionte o eucariota. En casos en los que un ácido nucleico aislado es un virus, el virus puede ser, por ejemplo, un virus oncolítico o un vector viral (por ejemplo un vector de transferencia génica viral. Por ejemplo, un vector viral puede ser un vector derivado de un Ad, un virus asociado a Ad, un retrovirus, un lentivirus, un virus de herpes, un virus vacuna o un rhabdovirus. Además, un ácido nucleico aislado puede incluir un ácido nucleico modificado genéticamente, como una molécula de ADN que es parte de un ácido nucleico híbrido o de fusión. Un ácido nucleico existente entre cientos o millones de otros ácidos nucleicos, por ejemplo, en bibliotecas de ADNc o bibliotecas genómicas, o cortes de gel que contienen una digestión de restricción de ADN genómico, no se considera un ácido nucleico aislado.

Tal como se utiliza en el presente documento, un "polipéptido" se refiere a una cadena de residuos de aminoácido, independientemente de la modificación postraduccional (por ejemplo fosforilación o glicosilación).

Un ácido nucleico que modifica un polipéptido H modificado proporcionado en el presente documento puede codificar un polipéptido H de MV que es heterólogo a los polipéptidos H de MV de origen natural o al polipéptido H que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en GenBank N° de Acceso AAF85673 (Versión AAF85673.1, GI N° 9181880; SEQ ID NO:1). En bases de datos públicas se pueden encontrar ejemplos adicionales de polipéptidos H de MV de origen natural (y las secuencias de ácidos nucleicos que los codifican). Por ejemplo, GenBank N° de Acceso KP191044 (Versión KP191044.1, GI No. 727347518; SEQ ID NO:2) proporciona un ejemplo de una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido H de tipo salvaje. En algunos casos, un polipéptido H de MV diseñado para ser heterólogo a polipéptidos H de MV de origen natural y/o heterólogo al polipéptido H que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 1 se puede denominar polipéptido H modificado. El término "secuencia de aminoácidos de polipéptido H" tal como se utiliza en el presente documento se refiere a una secuencia de aminoácidos que es al menos 85 por ciento (por ejemplo al menos 85, 90, 95, 99 o 100 por ciento) idéntica a la secuencia establecida en SEQ ID NO:1. En algunos casos, un polipéptido H modificado puede tener al menos 6 (por ejemplo 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 o más) residuos de aminoácidos asociados con epítopos inmunodominantes de la glicoproteína H de MV que se han modificado (por ejemplo sustituido). Las sustituciones de aminoácidos en polipéptidos H están ubicadas típicamente en posiciones implicadas en la unión de polipéptidos H a sus receptores.

En algunos casos, un polipéptido H modificado puede tener una o más sustituciones de aminoácidos, por ejemplo, en cada uno de los 6 sitios antigénicos establecidos en la Tabla 1.

Tabla 1. Sitios antigénicos de polipéptidos H.

Sitio	Nombre	Posición de inicio	Posición de parada
1	Ia, V, VI, E4, 1, LE	307	318
2	Ib, NE, IV	233	250
3	IIa, SSE, VII,2	487	495
4	IIb, SSE, VII,2	471	477
5	III, VII, E2, IIIB, 3, 4, RBE	530	562
6	'Lazo', HNE, I, E3, D, D/E	377	405

En algunos casos, un polipéptido H modificado puede tener una o más sustituciones de aminoácidos, por ejemplo, 7

de los 8 sitios antigénicos establecidos en la Tabla 2 o cada uno de los 8 sitios antigénicos establecidos en la Tabla 2.

Tabla 2. Sitios antigénicos de polipéptidos H.

Sitio	Nombre	Posición de inicio	Posición de parada
1	E1, ϕ	280	285
2	Ia, V, VI, E4, I, LE	307	318
3	Ib, NE, IV	233	250
4	IIa, SSE, VII,2	487	495
5	IIb, SSE, VII,2	471	477
6	III, IIIA, VII, E2, IIIB, 3, 4, RBE	530	562
7	'Lazo', HNE, I, E3, D, D/E	377	405
8	V	450	456
		464	470
		478	484

5

En algunos casos, un polipéptido H modificado puede tener 6 o más (por ejemplo 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 o más) sustituciones de aminoácidos, por ejemplo, en posiciones correspondientes a los aminoácidos D149, A158, T174, T176, T177, F180, L181, S189, R195, N200, R211, R212, V220, E235, S240, G243, L246, L249, H252, V259, F276, V280, D283, S285, L296, G302, E303, S305, P308, Q311, S316, S318, M333, Q334, P338, L339, V345, I346, L351, V357, A359, K364, V367, R377, M378, F382, A392, C394, P397, V412, T420, V421, L423, K424, H448, V450, K460, E471, I473, F476, K477, N481, G491, E/G492, H495, D505, L517, R533, I559, V562, I564, D574, Q575, K576, A587, G603, V608, T609, E611, G613, T614, R616 y/o R617 de un polipéptido H de longitud completa que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO:1. Por ejemplo, un polipéptido H modificado proporcionado en el presente documento puede tener la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO:1 con la excepción de que el polipéptido H de MV tiene 6 o más (por ejemplo 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 o más) de las siguientes sustituciones de aminoácidos: H17S, D149N, S189P, G211S, E235G, N238D, S240N, L249P, L276G, V280I, G302R, E303G, Q311R, Q334H, A359T, K364N, R377Q, M378K, P397L, T420A, V421A, L423P, E471K, F476L, N481Y, G491D, H495R, D505T, R533G, I594L, V562T, D574A, K576R, G603E, T609N, G613E y T614A.

20

En algunos casos, un polipéptido H modificado puede tener 6 o más (por ejemplo 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 o 19) sustituciones de aminoácidos, por ejemplo, en posiciones correspondientes a los aminoácidos S189, E235, N238, L249, G302, Y310, Q311, R377, M378, D416, E471, N481, K488, G491, H495, D505, R533, S546, R547 y/o F552 de un polipéptido H de longitud completa que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO:9. Por ejemplo, un polipéptido H modificado proporcionado en el presente documento puede tener la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO:9 con la excepción de que el polipéptido H de MV tiene 6 o más (por ejemplo 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 o 19) de las siguientes sustituciones de aminoácidos: S189, E235, N238, L249, G302, Y310, Q311, R377, M378, D416, N481, K488, G491, H495, D505, R533, S546, R547 y F552. En algunos casos, un polipéptido H modificado proporcionado en el presente documento puede tener la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO:9 con la excepción de que el polipéptido H de MV tiene 6 o más (por ejemplo 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20) de las siguientes sustituciones de aminoácidos: S189, E235, N238, L249, G302, Y310, Q311, R377, M378, D416, E471, N481, K488, G491, H495, D505, R533, S546, R547 y F552.

30

En algunos casos, un polipéptido H modificado proporcionado en el presente documento puede incluir una o más modificaciones de aminoácidos como las descritas en otra parte (véase, por ejemplo, el documento WO 2014/015242, Hu et al. (Virology, 192(1):351-4 (1993)); Hummel y Bellini (J. Virol., 69(3):1913-16 (1995)); Rima et al. (J. Gen. Virol., 78:97-106 (1997)); Li y Qi (Arch. Virol., 147(4):775-86 (2002)); Santibanez et al. (J. Gen. Virol., 86:365-74 (2005); and Tahara et al. (J. Virol., 82(9):4630-7 (2008)). Por ejemplo, un polipéptido H modificado proporcionado en el presente documento puede incluir también una o más de las siguientes sustituciones de aminoácidos: N238D, N282K, Y310C, N405S, D416N, K488E, S546G, R547G y F552V. En algunos casos, un polipéptido H modificado proporcionado en el presente documento puede incluir también una o más de las siguientes sustituciones de aminoácidos: N238D, N282K, Y310C, N405S, D416N, E471K, K488E, S546G, R547G y F552V. Como otro ejemplo, un polipéptido H modificado proporcionado en el presente documento puede incluir SEQ ID NO:9 que tiene una sustitución de aminoácido en 6 o más (por ejemplo 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 o 19) de las siguientes posiciones: S189, E235, N238, L249, G302, Y310, Q311, R377, M378, D416, N481, K488, G491, H495, D505, R533, S546, R547 y F552. Por ejemplo, un polipéptido H modificado proporcionado en el presente documento puede incluir SEQ ID NO:9 que tiene 6 o más (por ejemplo 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 o 19) de las siguientes

35

40

45

sustituciones de aminoácidos: S189P, E235G, N238D, L249P, G302R, Y310C, Q311R, R377Q, M378K, D416N, N481Y, K488E, G491E, H495R, D505T, R533G, S546G, R547G y F552V. Como otro ejemplo, un polipéptido H modificado proporcionado en el presente documento puede incluir SEQ ID NO:9 que tiene una sustitución de aminoácido en 6 o más (por ejemplo 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20) de las siguientes posiciones: S189, E235, N238, L249, G302, Y310, Q311, R377, M378, D416, E471, N481, K488, G491, H495, D505, R533, S546, R547 y F552. Por ejemplo, un polipéptido H modificado proporcionado en el presente documento puede incluir SEQ ID NO:9 que tiene 6 o más (por ejemplo 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20) de las siguientes sustituciones de aminoácidos: S189P, E235G, N238D, L249P, G302R, Y310C, Q311R, R377Q, M378K, D416N, E471K, N481Y, K488E, G491E, H495R, D505T, R533G, S546G, R547G y F552V.

Las sustituciones de aminoácidos pueden ser conservadoras o no conservadoras. Las sustituciones de aminoácidos conservadoras reemplazan un aminoácido por un aminoácido de la misma clase, mientras que las sustituciones de aminoácidos no conservadoras reemplazan un aminoácido por un aminoácido de una clase diferente. Ejemplos de sustituciones conservadoras incluyen sustituciones de aminoácidos dentro de los siguientes grupos: (1) glicina y alanina; (2) valina, isoleucina y leucina; (3) ácido aspártico y ácido glutámico; (4) asparagina, glutamina, serina y treonina; (5) lisina, histidina y arginina; y (6) fenilalanina y tirosina. En algunos casos un polipéptido H modificado proporcionado en el presente documento puede tener la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO:3. En algunos casos un polipéptido H de MV modificado puede ser un polipéptido H de otro miembro del género morbillivirus (por ejemplo CDV, CeMV, FeMV, PPRV, PDV y RPV). Por ejemplo, un polipéptido H de MV modificado puede ser un polipéptido H de CDV (por ejemplo un polipéptido que tiene la secuencia establecida en GenBank N° de Acceso AAC26995 (Versión AAC26995.1; SEQ ID NO:8).

Un ácido nucleico que modifica un polipéptido F modificado proporcionado en el presente documento puede codificar un polipéptido F que es heterólogo a polipéptidos F de MV de origen natural o al polipéptido F que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en GenBank N° de Acceso AAF85672 (Versión AAF85672.1, GI N° 9181879; SEQ ID NO:4). En bases de datos públicas se pueden encontrar ejemplos de polipéptidos F de MV de origen natural (y las secuencias de ácidos nucleicos que los codifican). Por ejemplo, GenBank N° de Acceso KP205324 (Versión KP205324.1, GI No. 727347524; SEQ ID NO:5) proporciona un ejemplo de un ácido nucleico que codifica un polipéptido F de tipo salvaje. En algunos casos, un polipéptido F de MV diseñado para ser heterólogo a polipéptidos F de MV de origen natural y/o heterólogo al polipéptido F que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO:4 se puede denominar polipéptido F modificado. El término "secuencia de aminoácidos de polipéptido F" tal como se utiliza en el presente documento se refiere a una secuencia de aminoácidos que es al menos 85 por ciento (por ejemplo al menos 85, 90, 95, 99 o 100 por ciento) idéntica a la secuencia establecida en SEQ ID NO:4. En algunos casos un polipéptido F de MV modificado puede ser un polipéptido F de otro miembro del género morbillivirus (por ejemplo CDV, CeMV, FeMV, PPRV, PDV y RPV). Por ejemplo, un polipéptido F de MV modificado puede ser un polipéptido F de CDV (por ejemplo un polipéptido que tiene la secuencia establecida en GenBank N° de Acceso ABR08390 (Versión ABR08390.1, GI No. 148724186; SEQ ID NO:6) o GenBank N° de Acceso ABR08390 (Versión ABO31365.1, GI No. 129770954; SEQ ID NO:7).

Este documento proporciona también virus recombinantes (por ejemplo MV o Ad) que contienen un ácido nucleico que codifica un polipéptido H modificado descrito en el presente documento y un ácido nucleico que codifica un polipéptido F modificado descrito en el presente documento. Un virus recombinante proporcionado en el presente documento puede ser un virus quimérico. En algunos casos, un virus recombinante puede contener un ácido nucleico que codifica un polipéptido H de MV modificado descrito en el presente documento y un ácido nucleico que codifica un polipéptido F de MV modificado descrito en el presente documento. En algunos casos, un virus recombinante puede contener un polipéptido H de MV modificado descrito en el presente documento y un polipéptido F de MV modificado descrito en el presente documento.

En algunos casos, un virus recombinante proporcionado en el presente documento puede ser un morbillivirus. Cualquier morbillivirus apropiado puede contener un ácido nucleico descrito en el presente documento (por ejemplo un ácido nucleico que codifica un polipéptido H de MV modificado y/o un ácido nucleico que codifica un polipéptido F de MV modificado). Especies del género morbillivirus incluyen, entre otros, MV (MV), virus del moquillo canino (CDV), morbillivirus de cetáceos (CeMV), morbillivirus de felinos (FeMV), virus de la peste de pequeños rumiantes (PPRV), virus del moquillo focino (PDV) y virus de la peste bovina (RPV). En algunos casos, un morbillivirus proporcionado en el presente documento se obtiene a partir de MV. Ejemplos de cepas de MV incluyen, entre otras, MV/Madrid.SPA/50.10[H1], Edmonston, y vacuna Moraten.

En algunos casos, un virus recombinante proporcionado en el presente documento puede ser un Ad. Cualquier Ad apropiado puede contener un ácido nucleico descrito en el presente documento (por ejemplo un ácido nucleico que codifica un polipéptido H de MV modificado y/o un ácido nucleico que codifica un polipéptido F de MV modificado). En humanos, especies de la familia de adenovirus incluyen, entre otros, especies A (AdA), especies B (AdB), especies C (AdC), especies D (AdD), especies E (AdE), especies F (AdF) o especies G (AdG).

Un ácido nucleico proporcionado en el presente documento se puede obtener utilizando cualquier método apropiado, incluyendo, entre otros, clonación molecular común y técnicas químicas de síntesis de ácidos nucleicos. Por ejemplo,

la PCR se puede utilizar para construir ácidos nucleicos que codifican un polipéptido H modificado o un polipéptido F modificado proporcionado en el presente documento. PCR se refiere a un procedimiento o una técnica en la que el ácido nucleico objetivo se amplifica de una manera similar a la descrita en la Patente de EE. UU. N° 4,683,195, y modificaciones posteriores del procedimiento descrito en la misma.

Un ácido nucleico proporcionado en el presente documento se puede incorporar en virus mediante técnicas estándar. Por ejemplo, las técnicas recombinantes se pueden utilizar para insertar un ácido nucleico que codifica un polipéptido H modificado o un polipéptido F modificado proporcionado en el presente documento en un ADNc viral infeccioso. En algunos casos, un ácido nucleico puede ser exógeno a una partícula viral, por ejemplo un vector de expresión contenido dentro de una célula de manera que el polipéptido codificado por el ácido nucleico es expresado por la célula y después incorporado a una nueva partícula viral (por ejemplo en la envoltura de una nueva partícula viral como un virus recombinante).

Los polipéptidos H de origen natural tienen normalmente actividades de unión a receptor y hemaglutinación y cooperan funcionalmente con polipéptidos F virales para inducir la fusión entre células diana. Tal fusión puede ser mediada por interacciones entre polipéptidos H y receptores en células diana (por ejemplo CD46, SLAM, Nectina-4, desmogleína-2 o ácido siálico).

Los virus recombinantes (por ejemplo MV o Ad) proporcionados en el presente documento (por ejemplo que contienen un ácido nucleico que codifica un polipéptido H modificado o un ácido nucleico que codifica un polipéptido F modificado) pueden tener entrada celular dependiente de Nectina-4 reducida (o no) en comparación con un virus que tiene un polipéptido H de origen natural y/o un polipéptido F de origen natural. Por ejemplo, cuando un polipéptido H modificado y un polipéptido F modificado se incorporan en un virus, el nivel de entrada celular dependiente de Nectina-4 exhibido por el virus puede reducirse (o eliminarse) en relación con el nivel de entrada celular dependiente de Nectina-4 exhibido por un virus de tipo salvaje que contiene un correspondiente polipéptido H de origen natural. Un morbillivirus (por ejemplo un MV) que contiene un polipéptido H modificado y un polipéptido F modificado descrito en el presente documento puede exhibir entrada dependiente de Nectina-4 en células (por ejemplo células epiteliales) reducida (o no) en comparación con la cantidad de entrada dependiente de Nectina-4 de un MV-H no modificado en células (por ejemplo células epiteliales). La entrada celular a través de Nectina-4 se puede evaluar mediante técnicas estándar como las descritas en el presente documento (véase Ejemplo 1). Los morbillivirus recombinantes proporcionados en el presente documento pueden conservar la capacidad de unirse a CD46 y/o SLAM. Por lo tanto, los virus que contienen un ácido nucleico que codifica un polipéptido H modificado y un ácido nucleico que codifica un polipéptido F modificado puede exhibir entrada celular dependiente de CD46 o SLAM, y las células que contienen tales virus pueden fusionarse de manera dependiente de CD46 o SLAM. La entrada celular a través de receptores CD46 y/o SLAM se puede evaluar mediante técnicas estándar como las descritas en el documento WO 03/093431. Los morbillivirus recombinantes proporcionados en el presente documento pueden conservar la capacidad de unirse a CD46 y no a SLAM. Por lo tanto, los virus que contienen un ácido nucleico que codifica un polipéptido H modificado y un ácido nucleico que codifica un polipéptido F modificado puede exhibir entrada celular dependiente de CD46 y las células que contienen tales virus pueden fusionarse de manera dependiente de CD46.

Un virus proporcionado en el presente documento puede estar atenuado. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "atenuado" se refiere a un virus que está inmunológicamente relacionado con un virus de tipo salvaje, pero que no es patógeno en sí mismo. Un MV atenuado, por ejemplo, no produce la enfermedad de sarampión clásica. Los virus atenuados son normalmente competentes para la replicación en el sentido de que son capaces de infectar y replicarse en una célula huésped sin funciones virales adicionales suministradas, por ejemplo, por un virus auxiliar o una construcción de expresión de plásmido que codifica tales funciones adicionales.

Se puede utilizar cualquier método apropiado para identificar un virus que contenga un ácido nucleico proporcionado en el presente documento. Tales métodos incluyen, entre otras, PCR y técnicas de hibridación de ácidos nucleicos como análisis Northern y Southern. En algunos casos, se pueden utilizar técnicas inmunohistoquímicas y bioquímicas para determinar si un virus contiene un ácido nucleico particular mediante detección de la expresión de un polipéptido codificado por ese ácido nucleico particular.

Los virus recombinantes (por ejemplo MV o Ad) que contienen un ácido nucleico que codifica un polipéptido H modificado y un ácido nucleico que codifica un polipéptido F modificado proporcionados en el presente documento se pueden utilizar para tratar pacientes de cáncer. Un virus particular se puede propagar en células huésped para aumentar el número de copias disponibles de ese virus, normalmente en al menos 2 veces (por ejemplo en 5 a 10 veces, en 50 a 100 veces, en 500 a 1.000 veces o incluso hasta 5.000 a 10.000 veces). Un virus se puede expandir hasta obtener la concentración deseada en un medio de cultivo celular estándar (por ejemplo DMEM o RPMI- 1640 suplementado con 5-10 % de suero bovino fetal a 37°C en 5 % de CO₂). Un título viral se puede analizar normalmente mediante inoculación de células (por ejemplo células Vero) en cultivo. El virus se puede cosechar a partir de células infectadas mediante raspado de células de los platos, sometiénolas a congelación/descongelación (por ejemplo aproximadamente dos rondas) y centrifugado. Los sobrenadantes aclarados representan un virus "purificado en placa".

Las reservas virales se pueden producir mediante infección de monocapas celulares (por ejemplo adsorción durante

alrededor de 1,5 horas a 37°C), seguida de raspado de las células infectadas en un medio adecuado (por ejemplo Opti-MEM; Gibco/Invitrogen, Carlsbad, CA) y lisis por congelación/descongelación. Las reservas virales se pueden dividir en alícuotas y congelar, y se pueden almacenar a -70°C hasta -80°C a concentraciones más elevadas que la dosis terapéuticamente efectiva. Una reserva viral se puede almacenar en una solución estabilizadora. Las soluciones estabilizadoras son conocidas en la técnica e incluyen, entre otros, azúcares (por ejemplo trehalosa, dextrosa, glucosa), aminoácidos, glicerol, gelatina, glutamato monosódico, Ca^{2+} y Mg^{2+} .

En algunos casos, los virus recombinantes (por ejemplo MV o Ad) que contienen un ácido nucleico que codifica un polipéptido H modificado y un ácido nucleico que codifica un polipéptido F modificado proporcionados en el presente documento se pueden utilizar para tratar cáncer (por ejemplo para reducir el tamaño del tumor, inhibir el crecimiento tumoral o reducir el número de células tumorales viables). Tal como se utiliza en el presente documento, "reducir el número de células tumorales viables" abarca (1) ralentizar la tasa de crecimiento de una población de células tumorales de manera que, tras un cierto periodo de tiempo, un tumor en un individuo tratado sea más pequeño de lo que habría sido sin tratamiento; (2) inhibir completamente el crecimiento de una población de células tumorales de manera que un tumor deje de crecer por completo después del tratamiento; y/o (3) reducir la población de células tumorales de manera que un tumor se vuelva más pequeño o incluso desaparezca después del tratamiento.

Los virus recombinantes (por ejemplo MV o Ad) que contienen un ácido nucleico que codifica un polipéptido H modificado y un ácido nucleico que codifica un polipéptido F modificado proporcionados en el presente documento se pueden administrar a un paciente de cáncer, por ejemplo, mediante inyección directa en un grupo de células cancerosas (por ejemplo un tumor) o suministro intravenoso a células cancerosas. Los tipos de células cancerosas susceptibles de tratamiento con virus incluyen células neuronales, células gliales, células mielomonocíticas y similares. Los métodos proporcionados en el presente documento se pueden utilizar para tratar tipos de cáncer que incluyen, entre otros, mieloma, melanoma, glioma, linfoma y cánceres de pulmón, cerebro, estómago, colon, recto, riñón, próstata, ovario y mama. Un MV atenuado que contiene un polipéptido H modificado y un polipéptido F modificado proporcionado en el presente documento se puede utilizar para tratar, por ejemplo, un linfoma (por ejemplo un linfoma no Hodgkin).

Un virus proporcionado en el presente documento se puede administrar a un paciente en una solución biológicamente compatible o un vehículo de suministro farmacéuticamente aceptable, mediante administración directa en un grupo de células cancerosas (por ejemplo intratumoralmente) o sistémicamente (por ejemplo por vía intravenosa). Las formulaciones farmacéuticas adecuadas dependen en parte del uso y la vía de entrada, por ejemplo transdérmica o mediante inyección. Tales formas no deben impedir que la composición o la formulación lleguen a una célula diana (es decir, a una célula a la que se desea suministrar el virus) o que ejerzan su efecto. Por ejemplo, las composiciones farmacológicas inyectadas en el torrente sanguíneo deben ser solubles.

Si bien las dosis administradas variarán de un paciente a otro (por ejemplo dependiendo del tamaño de un tumor), se puede determinar una dosis efectiva estableciendo como límite inferior la concentración de virus que ha demostrado ser segura como vacuna (por ejemplo 10^3 pfu) y aumentando a dosis más elevadas de hasta 10^{12} pfu, mientras se sigue una reducción en el crecimiento de células cancerosas junto con la presencia de cualquier efecto secundario perjudicial. Una dosis terapéuticamente efectiva proporciona normalmente al menos una reducción del 10 % en el número de células cancerosas o en el tamaño tumoral. Los estudios de dosis creciente se pueden utilizar para obtener un efecto deseado para un tratamiento viral dado (véase, por ejemplo, Nies y Spielberg, "Principles of Therapeutics," In Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, eds. Hardman, et al, McGraw-Hill, NY, 1996, pp 43-62).

Los virus proporcionados en el presente documento se pueden suministrar en una dosis que oscila, por ejemplo, de alrededor de 10^3 pfu a alrededor de 10^{12} pfu (normalmente $>10^8$ pfu). Se puede proporcionar una dosis terapéuticamente efectiva en dosis repetidas. La dosis repetida es apropiada en casos en los que las observaciones de síntomas clínicos o tamaño tumoral o ensayos de seguimiento indican que un grupo de células cancerosas o tumor ha dejado de reducirse o que el grado de actividad viral está disminuyendo mientras el tumor está aún presente. Las dosis repetidas (utilizando el mismo o diferente virus modificado) se pueden administrar por la misma vía que se utilizó inicialmente o por otra vía. Una dosis terapéuticamente efectiva se puede suministrar en varias dosis discretas (por ejemplo con días o semanas de diferencia). En algunos casos se puede proporcionar de una a alrededor de doce dosis. En algunos casos, una dosis terapéuticamente efectiva de MV atenuado se puede suministrar por una formulación de liberación sostenida.

Los virus proporcionados en el presente documento se pueden administrar utilizando un dispositivo para proporcionar liberación sostenida. Una formulación para liberación sostenida de un virus puede incluir, por ejemplo, un excipiente polimérico (por ejemplo un gel hinchable o no hinchable, o colágeno). Se puede proporcionar una dosis terapéuticamente efectiva de un virus dentro de un excipiente polimérico, en donde la composición de excipiente/virus se implanta en un sitio de células cancerosas (por ejemplo en la proximidad o dentro de un tumor). La acción de los fluidos corporales disuelve gradualmente el excipiente y libera de manera continua la dosis efectiva de virus durante un periodo de tiempo. En algunos casos, un dispositivo de liberación sostenida puede contener una serie de capas activas y espaciadoras alternas. Cada capa activa de tal dispositivo contiene normalmente una dosis de virus

embebida en excipiente, mientras que cada capa espaciadora contiene solo excipiente o bajas concentraciones de virus (es decir, inferiores a la dosis efectiva). A medida que cada capa sucesiva del dispositivo se disuelve, se suministran dosis pulsadas de virus. El tamaño/la formulación de las capas espaciadoras determina el intervalo de tiempo entre dosis y se optimiza según el régimen terapéutico que se utiliza.

5 Un virus proporcionado en el presente documento se puede administrar directamente. Por ejemplo, un virus se puede inyectar directamente en un tumor (por ejemplo un linfoma) que es palpable a través de la piel. En tal método se puede utilizar también la guía ultrasónica. En algunos casos, la administración directa de un virus se puede conseguir a través de una línea de catéter u otro dispositivo de acceso médico, y se puede utilizar en combinación con un sistema de generación de imágenes para localizar un grupo de células cancerosas. Mediante este método, un dispositivo de dosificación implantable se coloca normalmente en la proximidad de un grupo de células cancerosas utilizando un alambre guía insertado en el dispositivo de acceso médico. Una dosis efectiva de un virus también se puede administrar directamente a un grupo de células cancerosas que es visible en un campo quirúrgico expuesto.

15 En algunos casos, un virus proporcionado en el presente documento se puede suministrar sistémicamente. Por ejemplo, el suministro sistémico se puede conseguir por vía intravenosa a través de inyección o a través de un dispositivo de suministro intravenoso para administración de dosis múltiples de un medicamento. Tales dispositivos incluyen, entre otros, agujas de infusión aladas, catéteres intravenosos periféricos, catéteres de línea media, catéteres centrales insertados periféricamente y catéteres o puertos colocados quirúrgicamente.

20 El curso de la terapia vírica se puede seguir mediante evaluación de cambios en síntomas clínicos (conocidos en la técnica para cada tipo de cáncer particular) o mediante seguimiento directo del tamaño de un grupo de células cancerosas o tumor. Un método para utilizar un virus de la invención para tratar cáncer se considera efectivo si el número de células cancerosas, el tamaño tumoral, el nivel de antígeno específico del tumor y/u otros síntomas clínicos se reducen al menos en 10 por ciento después de la administración del virus. Para un tumor sólido, por ejemplo, la efectividad del tratamiento vírico se puede evaluar mediante medición del tamaño o peso del tumor antes y después del tratamiento. El tamaño tumoral se puede medir directamente (por ejemplo utilizando calibradores) o mediante técnicas de generación de imágenes (por ejemplo rayos X, generación de imágenes resonancia magnética o tomografía computarizada) o a partir de la evaluación de datos ópticos no relacionados con la imagen (por ejemplo datos espectrales). Para un grupo de células cancerosas (por ejemplo células leucémicas), la efectividad del tratamiento viral se puede determinar mediante medición del número absoluto de células leucémicas en la circulación de un paciente antes y después del tratamiento. La efectividad del tratamiento vírico también se puede evaluar mediante seguimiento de los niveles de un antígeno específico del cáncer. Los antígenos específicos del cáncer incluyen, por ejemplo, antígeno carcinoembrionario (CEA), antígeno prostático específico (PSA), fosfatasa ácida prostática (PAP), CA 125, alfa-fetoproteína (AFP), antígeno de carbohidrato 15-3 y antígeno de carbohidrato 19-4.

35 En algunos casos, los virus recombinantes (por ejemplo MV o Ad) que contienen un ácido nucleico que codifica un polipéptido H modificado y un ácido nucleico que codifica un polipéptido F modificado proporcionados en el presente documento se pueden utilizar para vacunar humanos (por ejemplo lactantes menores de 9 meses de edad o lactantes menores de 15 años de edad). Cuando se vacuna un lactante menor de 9 meses o 15 meses de edad utilizando los MV proporcionados en el presente documento como una vacuna, la vacuna puede inducir eficazmente una respuesta inmunitaria protectora contra la infección por MV aunque el lactante contenga anticuerpos anti-MV maternos. Por ejemplo, un MV recombinante que contiene un ácido nucleico que codifica un polipéptido H modificado y un ácido nucleico que codifica un polipéptido F modificado se puede utilizar para estimular una respuesta inmunitaria contra MV en un humano.

45 Cualquier paciente apropiado puede ser tratado utilizando los materiales y métodos descritos en el presente documento. Por ejemplo, un paciente de cáncer tratado o un lactante vacunado utilizando un MV recombinante descrito en el presente documento puede ser un mamífero (por ejemplo humano, primate no humano, perro y gato), ave o reptil.

EJEMPLOS

Ejemplo 1 - MV recombinantes

Se produjo un virus de sarampión (MV#1) con una proteína H modificada (SEQ ID NO:3) que tenía las siguientes sustituciones de aminoácidos (con respecto a SEQ ID NO:1): H17S, D149N, S189P, G211S, E235G, N238D, S240N, L249P, L276G, V280I, N282K, G302R, E303G, Y310C, Q311R, Q334H, A359T, K364N, R377Q, M378K, P397L, N405S, D416N, T420A, V421A, L423P, F476L, N481Y, K488E, G491D, H495R, D505T, R533G, S546G, R547G, F552V, V562T, D574A, K576R, I594L, G603E, T609N, G613E y T614A. Esta proteína H modificada (SEQ ID NO:3) se produjo mediante introducción de 19 mutaciones puntuales en la proteína hemaglutinina del virus del sarampión (SEQ ID NO:9) de la cepa de tipo salvaje MV/Madrid.SPA/50.10 (genotipo H1). Las 19 mutaciones puntuales eran S189P, E235G, N238D, L249P, G302R, Y310C, Q311R, R377Q, M378K, D416N, N481Y, K488E, G491E, H495R, D505T, R533G, S546G, R547G y F552V.

Una cepa de la vacuna contra MV (MV#2) y la MV#1 recombinante se incubaron durante 1 hora a 37°C con mAb mostrado en la Figura 1 antes de la infección de células Vero/hSLAM sembradas en una placa de 96 pocillos. El número de focos eGFP positivos infectados se contó por cuadruplicado 48 horas después de la infección y se expresó como porcentaje del número de focos EGFP positivos infectados en ausencia de nAb. MV#1 evitó neutralizar anticuerpos dirigidos a múltiples sitios antigénicos. Las modificaciones de la proteína H que contribuyeron a que MV#1 escapara de la neutralización se muestran en la Figura 1.

Para determinar la resistencia de MV#1 al antisuero humano contra el sarampión, se sometieron a depleción los anticuerpos específicos de glicoproteína MV (por ejemplo H reactivos y F reactivos) a partir del suero humano inmune al sarampión. Se diluyeron muestras de suero 1:10 en medio de cultivo (RPMI 1640 (CORNING, Manassas, VA, USA) sin suero fetal bovino (FBS)) y posteriormente se cultivaron durante 4 días en una monocapa de células Mel-JuSo que expresaban o no expresaban glicoproteínas de MV. Se recogieron los sobrenadantes y se analizaron en una dilución final de 1:100 para detectar la presencia de anticuerpos específicos de H o F o VCA mediante un ensayo de inmunofluorescencia medido por FACS, utilizando las células de melanoma transfectadas de manera estable Mel-JuSo/MV-H o Mel-JuSO/MV-F como células diana. Los anticuerpos específicos de VCA contra el virus de Epstein-Barr (EBV) se cuantificaron mediante un ELISA comercial (IBL International, Hamburgo, Alemania). MV#1 se neutralizó eficientemente por anticuerpos F reactivos en suero humano inmune al sarampión. Se utilizó un ensayo de microneutralización de reducción de placa fluorescente para determinar la inmunidad anti-MV-H inducida tras la vacunación. MV#1 era resistente al componente H reactivo de la respuesta de anticuerpos humanos contra el sarampión.

Para confirmar que, aparte de los anticuerpos específicos de la proteína H de MV, los anticuerpos específicos de la proteína F de MV también son importantes para la neutralización de MV, se produjo otro virus del sarampión de la cepa Edmonston de tipo salvaje (MV#3) mediante reemplazo de la proteína F de MV de un MV de la cepa Edmonston de tipo salvaje con una proteína F de CVD de la cepa Ondersterpoort de tipo salvaje. Se produjeron otros dos virus del sarampión (MV#4 y MV#5). MV#4 se produjo mediante reemplazo de la proteína H de MV de un MV de la cepa Edmonston de tipo salvaje por una proteína H de CDV de tipo salvaje. MV#5 se produjo mediante reemplazo de la proteína F de MV de MV#4 por una proteína F de CDV de tipo salvaje (por ejemplo la cepa Ondersterpoort). En la Figura 2 se muestran representaciones esquemáticas de virus MV#3, MV#4 y MV#5. Los virus MV#2, MV#3, MV#4 y MV#5 se probaron de la siguiente manera. Se infectaron células Vero/cSLAM con los diferentes virus y se tomaron microfotografías 48 horas después de la infección. Se realizó un ensayo de neutralización y este reveló que tanto MV H como MV F provocan anticuerpos neutralizantes.

Una fusión heterotípica productiva de CDV Ondersterpoort y MVH#1. las células CHO que expresaban o no los receptores de MV se sembraron en una placa de 24 pocillos y se sometieron a cotransfección con plásmidos que codifican las proteínas MVH#1 (1 µg) y F (1 µg; cepa de la vacuna contra MV, MVF; cepa de la vacuna Ondersterpoort, CDV F). Se evaluó la formación de sincitio 24 horas después. Los resultados de la actividad de formación de sincitio demostraron que CDV F puede desencadenar la fusión sin alteración en la formación de sincitio cuando se coexpresa con MVH#1 de manera dirigida. Se rescató un virus que codificaba tanto MVH#1 como CDV F y este confirmó el monotropismo de células que expresan CD46.

Los patrones de expresión superficial para los receptores de MV se examinaron utilizando citometría de flujo. Dos días después de la infección se evaluó la infección productiva al microscopio. Estos resultados demostraron que el MV que codifica MV#1 y CDV F se propagó eficientemente en células que expresan el receptor CD46.

Se inmunizaron ratones C57BL/6 (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME, EEUU) a través de suministro hidrodinámico con plásmido pCG (5 µg) que codifica para la proteína MVH de MV#1. La capacidad de neutralización de los anticuerpos generados se evaluó 4 semanas después de la recogida de sangre de la vena yugular. Los sueros de ratones se inactivaron con calor y se diluyeron en serie en Opti-MEM. Se mezcló un volumen igual de virus respectivos que codifican diferentes proteínas del gen MVH a 30 PFU/pocillo con los respectivos anticuerpos policlonales en varias diluciones en serie 2 veces en placas de 96 pocillos (Costar Corp., Cambridge, MA, USA), se incubaron a 37°C durante 1 hora y se inocularon en células Vero/hSLAM confluyente al 80 hasta al 90 %. Se visualizó la autofluorescencia de eGFP bajo un microscopio fluorescente después de 2 días de cultivo y se dio un título de neutralización como la dilución más alta que bloquea el 100 % de la infectividad viral. Estos resultados demostraron que MV#1 provocó una respuesta del anticuerpo neutralizante dirigida por la glicoproteína H que neutraliza de manera cruzada cepas de MV de tipo salvaje.

Ejemplo 2 - MV recombinantes adicionales

Para este Ejemplo 2, MV se denomina MeV; MV#1 se denomina MeVΔ7, Δ7 o Δ8; MV#2 se denomina MeV#1; MV#3 se denomina Virus 3; MV#4 se denomina MeV#4; y MV#5 se denomina MeV#2. La síntesis de varios de estos se describió de nuevo en el Ejemplo 2 y algunos de los datos presentados en el Ejemplo 1 se presentaron también en el Ejemplo 2. Además, se utilizó MeVΔ7 para generar el virus Δ8.

Células y virus

Se cultivaron células Vero (CCL-81, ATCC), células Vero transfectadas humanas (Vero/hSLAM) (Ono et al., J. Virol., 75(9):4399-401 (2001)) y caninas (Vero/dogSLAM) (von Messling et al., J. Virol., 77(23):12579-91 (2003)) SLAM en medio esencial mínimo modificado de Dulbecco (DMEM) (HyClone, GE Healthcare Life Science) suplementado con 5 % (vol./vol.) de suero bovino fetal inactivado por calor (FBS) (Gibco) y 0,5 mg/mL de Geneticina (G418; Comins) (Vero/hSLAM) or 1 mg/mL Zeocin (ThermoFisher, Waltham MA) (Vero/dSLAM). Se cultivaron células de ovario de hámster chino (CHO), CHO-CD46 (Nakamura et al., Nat. Biotechnol., 22(3):331-6 (2004)), CHO-SLAM (Tatsuo et al., Nature, 406:893-6 (2000)) y CHO-N4 (Liu et al., J. Virol., 88(4):2195-204 (2014)) como se ha descrito. Se mantuvieron células de riñón de hamster bebé (BHK) en DMEM-10 % FBS. Se propagaron virus como se describe en otra parte (Munoz-Alia et al., J. Virol., 91(11):e00209-17 (2017); Munoz-Alia et al., PLoS One, 13(2):e0192245 (2018)).

Construcciones y rescate de MeV recombinantes

El MeV recombinante se basó en el clon de ADNc molecular de la cepa de la vacuna Moraten/Schwartz contenida en el plásmido p(+)-MeV^{vac2}(EGFP)N (del Valle et al., J. Virol., 81(19):10597-605 (2007)). En este plásmido, la proteína fluorescente verde potenciada (EGFP) se insertó aguas arriba en el gen N. Para evitar la inestabilidad del plásmido en su propagación en bacterias, el esqueleto del plásmido se reemplazó por el vector pSMART[®]LCkan (Lucigen, Middleton, WI) de manera escalonada siguiendo dos enfoques. En el primer enfoque, se añadió al vector un sitio de clonación múltiple que comprendía enzimas de restricción SacII y NotI. Entonces se insertó un promotor T7 óptimo seguido de una ribozima cabeza de martillo (HHrbz) (Figura 7) aguas arriba del genoma viral mediante inserción de la secuencia directamente en el cebador directo, amplificando el genoma MeV hasta un sitio de restricción interno único SacII ubicado al comienzo del gen P. Entonces se insertó el fragmento SacII-NotI en el plásmido p(+)-MV^{vac2}(EGFP)N en el vector pSMART[®]LCkan igualmente digerido. En el segundo enfoque, se sintetizó y se ligó al vector un casete que contenía el promotor del núcleo del factor de Elongación Humano 1α, el intrón quimérico, el promotor de ARN polimerasa T7, HHrbz y los sitios de clonación. Todas las propagaciones de plásmido se realizaron en células de *Escherichia coli* Stbl2[™] (Invitrogen, 10268019) cultivadas a 30 °C.

Para producir MeV de intercambio de envoltura se utilizaron genes H (CDV-H) y F (CDV-F) de la cepa de la vacuna Onderstepoort de CDV contenidos originalmente en el plásmido pCG (von Messling et al., J. Virol., 75(14):6418-27 (2001)). Para reemplazar MeV-H del esqueleto de MeV se utilizó en primer lugar mutagénesis dirigida al sitio (kit de mutagénesis dirigida al sitio QuikChange, Agilent) para eliminar un sitio SpeI en CDV-H, y después se introdujo una sustitución Y537D para reducir la unión mediante anticuerpos neutralizantes de reactividad cruzada en sueros humanos (Zhang et al., Virology, 482:218-24 (2015)). Se introdujeron sitios de restricción PacI y SpeI (subrayados) al comienzo y al final del gen, respectivamente, mediante reacción en cadena de polimerasa utilizando el cebador directo 5'-taattaaaacttagggtgcaagatcatcgataatgctccctaccaagacaagg-3' y cebador inverso 5'-actatggatgcctgatgctcgggtgacatcatgtgattggtcactagcagccttaatgggtgatggtggtgctccccccttg cggccgcggcgctggcgctctaccctcgatagcggttcatgagaaatcttatacggac-3', dejando inalterada la región no traducida (UTR). El producto de PCR se digirió con PacI y SpeI y se clonó en el esqueleto de MeV. Para reemplazar MeV-F del plásmido antígeno MeV se digirió pCG-CDV-F con HpaI/SpeI y se insertó en pCG-MeV-F igualmente digerido. El fragmento NarI/SpeI de este plásmido se utilizó entonces para reemplazar el de MeV.

La recuperación de MeV recombinantes (rMeV) se realizó mediante cotransfección de plásmido antígeno rMeV, plásmidos de soporte N, P y L derivados de un genotipo B3.1 aislado de MeV (Munoz-Alia et al., Virus Res., 196:122-7 (2015)) y una polimerasa de RNA T7 optimizada para codón (obtenida a partir de Behr Lee, plásmido Addgene 65974), con reactivo de transfección Lipofectamine LTX/PLUS (Invitrogen). Las células transfectadas se cocultivaron con células VerohSLAM y a continuación se amplificó el virus. La identidad de los MeV recombinantes se confirmó mediante secuenciación de Sanger después de la extracción de ARN de células infectadas.

Ensayo de fusión

Se transfectaron células (5×10⁵/pocillo en una placa de 6 pocillos) utilizando Eugene HD (Promega) con (1 µg) de plásmido pCG que codifica para la cepa de la vacuna contra MeV-F y pCG que codifica el MeV-H apropiado. Se evaluó la actividad de fusión 24 horas después tras tinción con Hema-Quik (Fisher Scientific 123-745).

Para cuantificar la fusión celular se utilizó el ensayo de luciferasa doblemente dividida como se describió en otra parte (Saw et al., Methods, 90:68-75 (2015)). Brevemente se transfectaron células efectoras BHK (3 × 10⁴) en una placa de 96 pocillos con 33 ng de cada uno de los plásmidos de expresión MeV-H y MeV-F y uno de los plásmidos de luciferasa dividida, DSP₈₋₁₁ (obtenido de Z. Matsuda). Como control, solo se transfectaron los plásmidos MeV-F y DSP₈₋₁₁. Se transfectaron 2 × 10⁵ células por pocillo en placas de 6 pocillos de células diana, células CHO y células CHO que expresaban los respectivos receptores del virus del sarampión con 1,5 µg del otro plásmido reportero doblemente dividido (DSP₁₋₇). 24 horas después de la transfección se separaron las células diana con Versene (Life Technologies) y se cocultivaron con las células efectoras en medios Fusion (DMEM-F12 sin rojo de fenol + HEPES 40 mM), suplementado con dilución 1:1000 del sustrato de luciferasa permeable a la célula EnduREN (Promega). La

luminiscencia resultante de la fusión celular y la mezcla del contenido citoplasmático entre células objetivo y efectoras se siguió con un luminómetro Topcount NXT (Packard Instrument Company, Meriden CT) en los puntos temporales indicados. Los datos representaban la media y la desviación estándar de tres réplicas para cada plásmido H.

Análisis FACS y Cuantificación de Moléculas de Superficie Celular

- 5 Las células se lavaron y se separaron utilizando Versene (Gibco) y se incubaron inmediatamente con anticuerpos anti-SLAM conjugados con ficoeritrina (FAB1642P; R&D Systems), anti-CD46 (FAB2005P; R&D Systems) y anti-nectina-4 (FAB2659P; R&D Systems), o con anticuerpo de isotipo de control (IC0041P; R&D Systems). Tras la incubación durante 1 hora a 4°C, las células se lavaron de nuevo y se midió la fluorescencia en un sistema de citometría de flujo FACSCanto (BD Bioscience). Se estimó el número de receptores por célula en referencia a perlas de calibración (BD QuantiBrite; BD Biosciences).

Proteínas Recombinantes y Ensayos de Unión

- 15 La secuencia codificante del ectodominio CD46 (residuos 35-328) se amplificó a través de PCR a partir del vector pGEM-CD46 (Sino Biologicals Inc., HG12239-G) y se insertó en el vector pFUSE (pfc1-hg1e3; Invivogen) en marco con la secuencia líder de la cadena Ig κ murina y una secuencia de disociación de proteasa 3C en el extremo 5' de la región Fc utilizando kit de clonación In-Fusion (Clontech). Las proteínas recombinantes CD46-Fc, SLAM-Fc, y nectina-4-Fc (Munoz-Alia et al., PLoS One, 13(2):e0192245 (2018)) se expresaron en células Expi293 (Gibco) y se purificaron a partir del sobrenadante de cultivo como se describió en otra parte (Munoz-Alia et al., PLoS One, 13(2):e0192245 (2018)). La expresión y la purificación de MeV-H soluble recombinante se realizó como se describió en otra parte (Munoz-Alia et al., J. Virol., 91(11):e00209-17 (2017)). La unión de los receptores Fc a MeV-H se determinó mediante ensayo de inmunoabsorción enlazado a enzimas como se describió en otra parte (Munoz-Alia et al., PLoS One, 13(2):e0192245 (2018)). La absorbancia a 450 nm se midió en un lector de microplacas Infinite M200Pro (Tecan). Los datos se analizaron utilizando el software Prism (GraphPad) y se ajustaron a un modo de saturación de unión a un sitio para determinar la concentración de semisaturación (valores de Kd aparentes [constante de disociación]). Los valores presentados exhibieron un ajuste excelente ($R^2 > 0,99$).

Contenido en proteína vírica

- 25 Se calentaron preparaciones de virus en presencia de DTT, se fraccionaron en gel de poliacrilamida Bis-Tris al 4-12 % y se transfirieron a membranas de PDVF. Entonces se analizaron transferencias con anti-MeV-Hcyt, anti-MeV-N, anti-MeV-F y anti-GFP sondeadas con anticuerpo de conejo secundario conjugado (ThermoFisher, #31642). Las transferencias se revelaron con Sustrato Quimioluminiscente SuperSignal Wester Pico (ThermoFisher) y se analizaron bajo un Sistema de Generación de Imágenes ChemiDoc (BIO-RAD).

Ensayos serológicos

- 35 Se realizó el ensayo de neutralización vírica en base al ensayo de microneutralización por reducción de placa basada en fluorescencia (PRMN) como se describió en otra parte (Munoz-Alia et al., J. Virol., 91(11):e00209-17 (2017); Munoz-Alia et al., PLoS One, 13(2):e0192245 (2018); and Munoz-Alia et al., Virus Res., 236:30-43 (2017)). Cada ensayo se repitió al menos dos veces en días diferentes con cuatro réplicas por ensayo. Se calculó la concentración inhibitoria del cincuenta por ciento (IC_{50}) tras ajuste de los datos a una dosis-respuesta sigmoidal (pendiente variable) con el software GraphPad (Prism 7).

Se generaron antisueros anti-MeV-H de conejo mediante inmunización con adenovirus que expresaba MeV-H de la cepa de la vacuna (Lech et al., PLoS One, 8(1):e52306 (2013)).

- 40 Se obtuvieron los siguientes reactivos a través de recursos BEI, NIAID, NIH: Anticuerpos Policlonales contra el Virus del Moquillo canino, Lederle Avirulento (antisuero, hurón), NR-4025; y anticuerpos policlonales contra el Virus del Sarampión, Edmonston, (antisuero, cobaya), NR-4024.

- 45 Se produjeron anticuerpos antihemaglutinina monoclonales murinos y se caracterizaron como se describió en otra parte (Muñoz-Alía et al., Virus Research, e00209-17 (2017); Ziegler et al., J. Gen. Virol., 77(Pt 10):2479-89 (1996); Fournier et al., J. Gen. Virol., 78:1295-302 (1997); Ertl OT. Regiones inmunodominantes y nuevos dominios funcionales en la proteína hemaglutinina del virus del sarampión. Alemania: Eberhard Karls University; 2003; Hu et al., Virology, 192:351-4 (1993); and Masse et al., J. Virol., 78(17):9051-63 (2004)). Se generaron anticuerpos policlonales por inyección hidrodinámica de base génica (Liu et al., Gene Ther., 6(7):1258-66 (1999)) de ratones C57BL/6 con 20 μ g de ADN plasmídico.

- 50 Se recogió suero humano del banco sérico Erasmus MC' a partir de sujetos sanos de 17-18 años de edad (de Swart

et al., J. Virol., 79(17):11547-51 (2005)). Es probable que nunca hayan estado expuestos al MeV de tipo salvaje y recibieron una vacuna contra el sarampión monovalente a la edad de 14 meses y una vacuna contra el sarampión, las paperas y la rubéola a la edad de 9 años. Todos los sueros policlonales y ascitis que contenían mAb se inactivaron por calor (30 minutos, 56°C) antes de la prueba.

- 5 Se determinó el título de IgG del virus de Epstein-Barr (BCA) mediante un ensayo disponible comercialmente (IBL International GmbH, cat. No. 57351). El ensayo para la determinación de niveles de IgG específicos de MeV se realizó como se describió en otra parte (de Swart et al., J. Virol., 79(17):11547-51 (2005); y de Swart et al., J. Virol. Methods., 71:35-44 (1998)).

Modelización estructural

- 10 Se generó un modelo de MeV-H sigiloso con confianza >90 % utilizando el programa Phyre2 (Kelley et al., Nat. Protoc., 10(6):845-58 (2015)). Después se sometió la estructura a glicosilación *in silico* utilizando el servidor GlyPro (<http://www.glycosciences.de>), que produjo un modelo complejo de N-glicano pentaantennarios en todos los sitios de N-glicosilación previstos, incluyendo N168 y N187, que forman parte de regiones desordenadas. Los receptores CD46 de la coestructura cristalográfica MeV-H/CD46 (PDB 3INB) se superpusieron y se manipularon utilizando el software
- 15 PyMOL (<http://pymol.org>).

Análisis estadístico

Se calculó el significado estadístico con GraphPad Prism 7 siguiendo la prueba estadística apropiada.

Resultados

Modelización de una deriva antigénica en MeV-H

- 20 El MeV-H tiene siete sitios antigénicos principales y las múltiples interrupciones de hasta cuatro de esos sitios no anulan la neutralización de anticuerpos policlonales (Munoz-Alia et al., J. Virol., 91(11):e00209-17 (2017); Lech et al., PLoS One, 8(1):e52306 (2013); and Munoz-Alia et al., PLoS One, 13(2):e0192245 (2018)). Es posible que, debido a la falta de inmunodominancia de células B, la ablación de todos los sitios antigénicos puede generar una variante no neutralizable. Para explorar esto, todos los epítomos descritos para MeV-H se interrumpieron sistemáticamente. El
- 25 diseño experimental se basó en la incorporación de selecciones espontáneas de mutantes de escape de mAb neutralizantes sobre el fondo de MeV-H de genotipo H1. Esta cepa particular se eligió en base a una observación previa de ser uno de los MeV-H antigénicamente más avanzados (Munoz-Alia et al., PLoS One, 13(2):e0192245 (2018)), lo que permitiría minimizar la alteración de la proteína MeV-H, rígida de otro modo (Fulton et al., Cell Rep., 11(9):1331-8 (2015)). Se generó una lista de regiones de unión de nAb y las rupturas de esas regiones se combinaron
- 30 en un único MeV-H, denominado $\Delta 7$ en el presente documento (también conocido como MV#1 en el Ejemplo 1)(Tabla 3).

Tabla 3.

Sitios antigénicos	Nombres alternativos	Sustitución	Resistencia a mAb	Referencias
Φ	E1	N282K	BH015, BH130	B
Ia	I, VI, E4, LE, V	E235G	E185	C
		G302R	E39	C
		Y310C	BH038, BH141, I-29	A
		Q311R	E103	C
Ib	NE, IV	L249P	BH047, BH059, BH129	D
IIa	II, SSE, VII	E488K	BH097	E
		G491D	16CD11	F
IIb	II, SSE, VII	416DLS4NLS	E128 BH125	C B
III	III, IIIA, IIIB, VII, RBE, E2	S189P	I-44	F
		D505T	80-II-B2	G
		R533G	Cl55 16DE6	H F
		R547G	20H6	E

Sitios antigénicos	Nombres alternativos	Sustitución	Resistencia a mAb	Referencias
		F552V	I-41	F
		R377Q, M378K	L77	I
IV	Lazo', HNE, I, E3, D, D/E	P397L	BH006, BH216	(54)
		N405S	8905	H
		E471K	BH030	Ejemplo 2 en el presente documento

Para referencias:

A= Lech et al., PLoS One, 8(1):e52306 (2013).

B= Munoz-Alia et al., PLoS One, 13(2):e0192245 (2018).

C= Tahara et al., J. Virol., 87(1):666-75 (2013).

D=Munoz-Alia et al., J. Virol., 91(11):e00209-17 (2017).

E=Lech et al., Virology, 454-455:237-46 (2014).

F=Hu et al., Virology, 192(1):351-4 (1993).

G=Hummel et al., J. Virol., 69(3):1913-6 (1995).

H=Muñoz-Alía et al., Virus Research, 236: 30-43 (2017).

I=Liebert et al., J. Virol., 68(3):1486-93 (1994).

J=Finsterbusch et al., J. Gen. Virol., 90:2739-45 (2009).

Ingeniería de tropismo en MeV-H

Dado que las mutaciones en el sitio antigénico III (sitio de unión a receptor, RBS) eran incompatibles con el tropismo de tipo salvaje (SLAM y nectina-4), el plan era cambiar la especificidad del receptor hacia CD46 a través de una serie de sustituciones de aminoácidos: N481Y (Lecouturier et al., J. Virol., 70(7):4200-4 (1996)), H495R (Okada et al., J. Virol., 83(17):8713-21 (2009)) y S546G (Shibahara et al., J. Gen. Virol., 75:3511-6 (1994)). Para evaluar el impacto de las sustituciones de aminoácidos en la actividad de fusión dependiente del receptor, se realizó la expresión transitoria de los mutantes de MeV-H en combinación con MeV-F derivado de la vacuna. También se rescataron los correspondientes MeV recombinantes mediante genética inversa, ya que la transmisión célula-célula se puede producir en ausencia de formación obvia de sincitio (Langedijk et al., J. Virol., 85(21):11242-54 (2011)). Los resultados se mostraron en la Figura 8. Cuando se utilizó la cepa (A) de la vacuna contra MeV-H, se observó tanto la entrada del virus como la fusión celular en células CHO que expresaban SLAM, CD46 o nectina-4. De manera similar, MeV-H H1 permitió la entrada del virus y la formación de sincitios en las células que expresaban SLAM y nectina-4. La introducción de N481Y, H495R o H495R/S546G en este último contexto no aumentó significativamente la actividad de fusión dependiente de CD46 como se observó en los ensayos de transfección transitoria. Sin embargo, se observó la entrada del virus en ausencia de formación de sincitio para los mutantes N481Y y H495R/S546G. La inclusión de H495R en el contexto del mutante N481Y restauró los niveles de fusión dependiente de CD46 a los observados por MeV-H A. La adición de S546G en este mutante mejoró casi 2 veces la fusión dependiente de CD46 y se observó un aumento similar con el mutante N481Y/S546G. Sin embargo, la infección por mejora dependiente de CD46 solo se observó cuando se utilizó el triple mutante (N481Y/H495R/S546G), por lo que se eligió esta combinación como fondo de mutaciones de escape de nAb.

MeV-H puede resistir sistemáticamente la neutralización por 30 anticuerpos monoclonales murinos conocidos

La Tabla 3 se utilizó inicialmente como base para generar un virus de escape de dominio globular MeV-H. Utilizando esta información, junto con las sustituciones de triple tropismo CD46, se diseñó directamente un virus $\Delta 7$, en el que están interrumpidos los siete sitios antigénicos operacionalmente no solapantes descritos hasta ahora (Φ , Ia, Ib, IIa, IIb, III y IV) (Figura 9A). Para determinar si el número de mutaciones introducidas era suficiente para anular la neutralización de otros nAb específicos para cada sitio, se determinó la sensibilidad de neutralización de los virus que poseían MeV-H A, H1 y $\Delta 7$ frente a un panel de 30 mAb. Los resultados se resumieron en la Figura 9B, mostrando que los virus A fueron neutralizados por los 30 nAb probados, mientras que este número se redujo a 18 para virus H1. En el otro extremo, los virus $\Delta 7$ solo fueron neutralizados por nAb BH030.

El hecho de que tanto el virus $\Delta 7$ como el H1 fueran neutralizados de manera similar por BH030 indicaba que las mutaciones introducidas en $\Delta 7$ no eliminaron este epítipo nAb. Sin embargo, ambos virus mostraron una reducción de 18 veces en la sensibilidad a la neutralización en comparación con los virus A (IC_{50} de 1312 ng/mL frente a 71,6 ng/mL).

Se realizó lo siguiente para determinar si el fenotipo era aplicable a otras proteínas MeV-H específicas de tipo salvaje o si era una peculiaridad del fondo del genotipo H1 utilizado. El análisis de neutralización indicaba que los virus H1

poseían cierta resistencia a la neutralización por BH030 en comparación con virus A, B3.1, C1, D4, D6, D7, D8, D9, F y G. Sin embargo, los virus C2 mostraron una falta completa de sensibilidad a la neutralización (Figura 10A). Sobre la base del análisis secuencial de la secuencia de aminoácidos y la estructura molecular de MeV-H, se identificó una mutación E471K como un candidato para la resistencia a nAb (Figura 10B). Para confirmar estas predicciones, se insertó la mutación E417K en el virus $\Delta 7$ (este nuevo virus se denominó el "virus $\Delta 8$ ") y se evaluó la sensibilidad de neutralización del virus $\Delta 8$ a nAb BH030. A diferencia de los virus $\Delta 7$, los virus $\Delta 8$ mostraron un escape completo de la neutralización mediada por BH030 (Figura 10C). Curiosamente, E471 se sitúa dentro de la región asignada al sitio antigénico IIb (II en Tahara et al., J. Virol., 87(1):666-75 (2013) o "epítipo apantallado por azúcar" in Tahara et al., Viruses, 8(8): pii:E216 (2016)), que se define por estar enmascarado por un azúcar enlazado a N416 presente en algunos genotipos (Figura 10D). Para confirmar que un azúcar adherido a N416 no protege de la neutralización de BH030, se probó la sensibilidad de neutralización de un virus A mutante D416N (Muñoz-Alia et al., PLoS One, 13(2):e0192245 (2018)). Dado que los virus $\Delta 7$ también poseían un azúcar N416, no se observó resistencia a la neutralización, lo que sugiere que BH030 podría dirigirse a un nuevo sitio antigénico operativamente no superpuesto (diseñado como V en el presente documento, que presumiblemente se expande entre los sitios antigénicos IIb y III (Figura 10D). Estos resultados mostraron que las mutaciones de residuos clave en los principales sitios antigénicos pueden combinarse para dar lugar al escape de neutralización de un gran panel de 30 anticuerpos neutralizantes.

La eliminación de epítopos en MeV-H suprime la neutralización cruzada

Se realizó lo siguiente para determinar si la interrupción del epítipo de células B en MeV-H afectaba a su antigenicidad. Se administró a ratones una inyección hidrodinámica de plásmido codificante MeV-H y se evaluaron las respuestas de anticuerpos un mes después (Figura 11A). Los ensayos de neutralización mostraron que los ratones inmunizados con MeV-H $\Delta 7$ tenían un título de anticuerpos neutralizantes inferior a MeV-HA pero no alcanzaron significado estadístico, probablemente debido a la variabilidad (Figura 11B). Sin embargo, MeV-H $\Delta 8$ fue incapaz de generar niveles detectables (Figura 11C). Seguidamente se evaluó si MeV-H $\Delta 8$ generaba anticuerpos de reactividad no cruzada contra nuevos epítopos mediante el sondeo de la actividad de neutralización de los propios virus $\Delta 8$. Los resultados mostrados en la Figura 11C mostraron que los virus $\Delta 8$ se neutralizaron por anticuerpos homotípicos, es decir, anticuerpos activados por inmunización con MeV-H $\Delta 8$, como lo fue por anti-MeV- H H1 y $\Delta 7$, por tener epítopos en común pero distintos de MeV-H A. Los anticuerpos neutralizantes inducidos por la inmunización con MeV-HA no ejercieron una actividad neutralizante contra los virus $\Delta 8$. Entonces, la eliminación de múltiples sitios antigénicos suprime la neutralización cruzada y permite que el virus escape de una respuesta policlonal anti-MeV-H.

Los virus $\Delta 7$ pueden escapar de anticuerpos neutralizantes inducidos por la vacuna contra el sarampión policlonal si están desprovistos de anticuerpos específicos de MeV-F

Diferentes modelos animales podrían exhibir un repertorio de anticuerpos diferente (Nachbagauer et al., Nat. Immunol., 18(4):464-73 (2017)). La respiración de anticuerpos surgidos en conejos después de la inmunización con MeV-H A se evaluó a través de análisis de neutralización. Aunque el virus $\Delta 8$ mostró una tendencia a la neutralización (Figura 12A), exhibió una reducción de 8 veces (3 log₂) en el título ND₅₀ en comparación con el virus vacuna. Dado que una diferencia de 4 veces (2 log₂ o unidades antigénicas (Smith et al., Science, 305(5682):371-6 (2004)) o superior justifica una actualización de la vacuna contra la gripe estacional humana (Russell et al., Vaccine, 26(Suppl 4):D31-4 (2008); and Garten et al., Science, 325(5937): 197-201 (2009)), el virus $\Delta 8$ se consideró de manera significativa diferente antigénicamente del virus vacuna. Por el contrario, el virus precursor inmediato ($\Delta 7$) era antigénicamente indistinguible como lo era el precursor parental (H1). Debido a que una mutación K471E distingue virus $\Delta 7$ de $\Delta 8$ y conduce a una variación antigénica, existía el deseo de asegurar que las diferencias antigénicas fueran el resultado de la combinación de todas las selecciones de mutantes mAb-escape y no de la existencia de mutantes dominantes. Por lo tanto, se probó un panel previo de MeV recombinante que poseía otras proteínas génicas MeV-H específicas del genotipo (Munoz-Alia et al., J. Virol., 91(11):e00209-17 (2017); y Munoz-Alia et al., PLoS One, 13(2):e0192245 (2018)). Fue de particular interés el MeV C2, ya que poseía la mutación K471E. Sin embargo, las diferencias en los títulos de PRMN eran menos de 2 veces en todos los casos y, por lo tanto, se consideraron insignificantes. En general, estos resultados sugieren que la variación antigénica en el virus del sarampión tiene un componente incremental y pulsado; es decir, más allá de un umbral antigénico, las sustituciones de aminoácidos podrían tener un efecto acumulativo.

Dado que los virus $\Delta 7$, pero no los $\Delta 8$, podrían utilizarse potencialmente como prevacuna en lactantes con anticuerpos maternos, se realizaron pruebas para probar si la variación antigénica en $\Delta 7$ podría conducir a un menor reconocimiento por sueros de pacientes que han recibido la vacuna contra el sarampión. Esto implicó inicialmente la selección para prueba de seis muestras de sueros de individuos holandeses de 17 a 23 años de edad en el momento de la recogida de suero. En base al título de neutralización y al registro de brotes de sarampión en los Países Bajos, es probable que las muestras humanas correspondan a receptores de dos dosis de vacuna contra el sarampión. El virus $\Delta 7$ y la cepa de la vacuna fueron probados por PRMN con sueros humanos #126, #128, #129, #134, #136 y #137. El título medio de ND₅₀ para los virus $\Delta 8$ era 1,41 veces inferior (0,50 unidades antigénicas) que el del título homólogo de la cepa de la vacuna, lo que indica una falta de variación antigénica entre los dos virus. Se encontró una correlación entre anticuerpos específicos de MeV-H y MeV-F (Pearson R=0,54, p<0,05). Para probar si los anticuerpos específicos de MeV-F enmascaraban una posible variación antigénica, los anticuerpos específicos de MeV-F se

sometieron a depleción y se repitió el ensayo. Como se ilustra en la Figura 12B, la incubación de los sueros humanos con células transfectadas simuladas (condición 1) no dio lugar a una disminución de anticuerpos IgG específicos de MeV-F en comparación con la muestra no tratada (condición 0). Por el contrario, la incubación con células que expresan MeV-F dio lugar a la depleción de anticuerpos específicos de MeV-F, mientras que los niveles de anticuerpos específicos de MeV-H permanecieron inalterados. Para tener en cuenta los pequeños factores de dilución introducidos en las diferentes condiciones de depleción, se probaron adicionalmente los anticuerpos IgG de VCA de Epstein Barr, ampliamente extendidos en la población humana, y se utilizaron como control del nivel de anticuerpos utilizados de los mismos (Figure 12C). Entonces se volvió a analizar la capacidad de neutralización de sueros humanos no agotados y sometidos a depleción de MeV-F. Mientras que los sueros humanos sometidos a depleción de MeV-F perdieron una potencia de neutralización insignificante frente al virus vacuna (1 unidad antigénica), la reducción fue ahora significativa (7 veces) cuando se compararon virus $\Delta 7$ con el virus vacuna (Figura 12D).

Estos resultados indican que la vacunación en humanos induce una respuesta de anticuerpos neutralizantes más estrecha que en conejos, y los virus $\Delta 7$ podrían cerrar potencialmente la brecha de vacunación para jóvenes lactantes si carecen de anticuerpos anti-MeV-F.

MeV-H y MeV-F provocan anticuerpos neutralizantes

Los anticuerpos neutralizantes contra MeV-F en sueros humanos inmunes al sarampión pueden amortiguar el efecto de sustituciones antigénicas acumulativas en MeV-H. Para obtener más información sobre la contribución de dos glicoproteínas MeV a la neutralización del virus, se utilizó un enfoque doble: 1) Depleción de anticuerpos específicos de MeV-H y MeV-F (Figura 13A) y 2) Estudio de la sensibilidad a la neutralización de un conjunto isogénico de quimeras virales con tres intercambios de glicoproteínas diferentes. Este virus de intercambio de envoltura tenía todos los genes derivados de MeV con la excepción de H y F, que se intercambiaron individual y doblemente con los Virus del Moquillo Canino (CDV) H y F (Miest et al., Mol. Ther., 19(10):1813-20 (2011); and Zhang et al., Virology, 482:218-24 (2015)). Por lo tanto, el doble cambio de genes de las proteínas MeV-H y MeV-F para los de CDV generó MeV#2, mientras que un único cambio en MeV-H o MeV-F produjo MeV#3 y MeV#4, respectivamente (Figura 13B). El gen de la proteína H de CVD utilizado poseía una sustitución Y537D intencional a propósito de la cepa de la vacuna Onderstepoort, ya que se demostró que reduce la posible neutralización cruzada de CDV por sueros humanos (Munoz-Alia et al., J. Virol., 91(11):e00209-17 (2017); Zhang et al., Virology, 482:218-24 (2015)). El MeV parental (MeV#1), así como las tres quimeras (MeV#2, MeV#3, MeV#4) formaron sincitios indistinguibles en células Vero, lo que demuestra complementación heterotípica (Figura 13B).

Para los anticuerpos específicos de MeV H o MeV-F, se utilizó un grupo de sueros humanos disponible comercialmente compuesto de aproximadamente 60 a 80 donantes americanos. Debido a los elevados títulos de anticuerpos en este grupo, es probable que haya sido inducido principalmente por la exposición a virus de tipo salvaje (Itoh et al., J. Clin. Microbiol., 40(5):1733-8 (2002)). La Figura 13A ilustra el proceso de depleción. La absorción sérica con células que expresan MeV-H (condición 2) eliminó por completo toda la actividad de unión del suero humano a la proteína MeV-H, mientras que los niveles de anticuerpos específicos de MeV-F no se vieron afectados. Por el contrario, la absorción con MeV-F (condición 3) eliminó específicamente la unión de suero humano a MeV-F, mientras que los anticuerpos específicos de MeV-H no se vieron afectados. La absorción de suero con la línea celular parental no dio lugar a una disminución de la unión de suero humano a MeV-H y MeV-F en comparación con el material sérico humano original (condición 1 y 0, respectivamente).

Entonces se midió la potencia de neutralización de anticuerpos reactivos MeV-H y MeV-F en humanos inmunes al sarampión. El ensayo PRMN mostró que la absorción del componente MeV-F o MeV-H no afectó sustancialmente a la actividad neutralizante de sueros humanos contra MeV (MeV#1). Por otro lado, la absorción sérica tanto con MeV-F como con MeV-H dio lugar a la pérdida completa de actividad neutralizante para sueros humanos. Por lo tanto, tanto los anticuerpos específicos de MeV-H como MeV-F eran igualmente importantes para neutralizar MeV. Como se esperaba, los sueros humanos inmunes al sarampión no mostraron actividad neutralizante contra MeV#2, independientemente del tratamiento con sueros. Por otro lado, MeV#1, MeV#3 y MeV#4 se neutralizaron eficientemente sin distinción por sueros no absorbidos. En cuanto a las quimeras virales con intercambios simples (MeV#3 y MeV#4), estas mostraron resistencia a la neutralización solo cuando se sometió a depleción el componente del anticuerpo específico de MeV que coincidía con el presente virus. Estos resultados indican que tanto MeV-F como MeV-H son inmunogénicos y cooperan para amortiguar variaciones antigénicas.

La novedad antigénica no sacrifica la aptitud física

A continuación, planteamos la hipótesis de que la amplitud de la respuesta de anticuerpos contra ambas glicoproteínas de la envoltura Me alberga la estaticidad antigénica de MeV. En un intento de abordar esta hipótesis, se buscó el rescate de virus $\Delta 8$ en combinación con CDV-F heterotípico, como un representante de un virus por completo distinto antigénicamente (este virus se denominará sigiloso en adelante). El MeV sigiloso no se obtuvo hasta que se mejoró la robustez del sistema de rescate MeV. A diferencia del rescate de la vacuna recombinante parental MeV Moraten, MeV sigiloso se aisló y se expandió a partir de una única célula GFP-positiva observada después de múltiples intentos

de rescate independientes. Después de cinco pasos semiciegos, el virus pudo propagarse a través de la monocapa celular (Figura 7). El virus se propagó adicionalmente para producir una reserva de virus y se probó para secuenciación de Sanger y análisis Western-blot. La inmunotransferencia de viriones purificados demostró que el virus sigiloso carecía de la proteína MeV-F homotípica y, por lo demás, mostraba un contenido en proteína similar al de la cepa de la vacuna (Figura 14B). Además, los resultados de la secuenciación no mostraron ninguna mutación compensatoria en ninguna de las secuencias codificantes de glicoproteínas, lo que confirma adicionalmente la viabilidad de un virus sigiloso que codifica MeV-HΔ8 en combinación con CDV-F.

Para determinar si MeV sigiloso asociaba una compensación de aptitud, se examinó la cinética de crecimiento de MeV sigiloso en células cultivadas. Esas cinéticas se compararon con las de MeV recombinantes que poseían MeV-H A, MeV-H H1 y MeV-HΔ8. MeV A se replicó a títulos más elevados a 12 y 48 hpi que los virus sigilosos y Δ8 (Figura 14A). Estos dos virus mostraron un pico de titulación con retraso de 24 horas. MeV H1 se replicó a títulos más bajos que cualquier de los otros virus a lo largo del curso del tiempo. Dado que MeV Δ8 poseía un MeV-H derivado de MeV-H H1, estos resultados indicaron que las mutaciones introducidas en MeV-H cooperan para una mejor complementación con proteínas F heterólogas.

A continuación, se utilizaron 15 muestras de sueros humanos para determinar si el virus sigiloso era realmente resistente a la neutralización por anticuerpos humanos desencadenado por la vacuna contra el sarampión (virus A). Se evitaron los sueros humanos agrupados utilizados anteriormente, ya que los títulos elevados son indicativos de diferentes historias de exposición al virus del sarampión, lo que podría haber inducido diferentes repertorios de anticuerpos neutralizantes específicos del genotipo (de Swart et al., J. Gen. Virol., 90:2982-9 (2009); Tamin et al., J. Infec. Dis., 170:795-801 (1994); and Muñoz-Alía et al., Virus Research, 236: 30-43 (2017)). Esto podría complicar futuras interpretaciones, ya que la deriva antigénica en el virus sigiloso fue modelizada por anticuerpos monoclonales inducidos por el virus vacuna. Se utilizaron hurones vacunados con CDV como control negativo y positivo para la neutralización del virus vacuna y sigiloso, respectivamente. Los sueros #126, #128, #129, #134, #136 y #137, utilizados en la Figura 12, no pudieron ser probados debido a la escasez de material. Los valores de NT₅₀ de las muestras analizadas mostraron una media geométrica general 5,39 veces inferior (2,43 unidades antigénicas) en la potencia de neutralización frente al virus sigiloso, que oscilaba entre 3,12 y 10,9 veces (Figura 14C). El suero 152 produjo un título ND₅₀ 4 veces inferior (1,64 unidades antigénicas) contra el virus sigiloso y el del suero 131 y 157 estaba en el umbral (4 veces). De todos los sueros probados, el suero 152 fue el único que mostró niveles de protección contra el virus sigiloso (430 mIU/mL) y tenía el título NT₅₀ más elevado de todos los sueros humanos probados contra la cepa de la vacuna (1344 mIU/mL). Entonces era tentador especular que la magnitud de respuesta de los anticuerpos contra la vacuna homotípica determinaba si se alcanzaban o no los niveles de protección contra la infección por el virus sigiloso. El análisis de correlación apoyó la hipótesis (Persona $r=0,9112$; $p<0,0001$), lo que sugiere un nivel mínimo de título NT₅₀ de 926 mIU/mL para protección contra la infección por virus sigiloso frente a los actuales 210 mIU/mL utilizados como predictor de seroconversión contra el virus de la vacuna (Haralambieva et al., Vaccine, 29:4485-91 (2011)).

Se realizó lo siguiente para determinar en qué medida la amplitud y la magnitud de respuesta de anticuerpos afectó la variación antigénica observadas en el virus sigiloso. La variación antigénica se midió en un modelo de cobaya, que demostró inducir títulos más elevados de anticuerpos reactivos de manera cruzada contra el virus de la influenza que los de ratones o hurones (Nachbagauer et al., Nat. Immunol., 18(4):464-73 (2017)). En el contexto de MeV, las cobayas montaron una respuesta de anticuerpos altamente neutralizante al virus homólogo de la vacuna con un valor NT₅₀ de 3584 mIU/mL (Figura 14D). Por el contrario, el título ND₅₀ contra el virus sigiloso heterólogo fue ~ 6 veces inferior (NT₅₀= 563) y, por lo tanto, antigénicamente significativo. Estos resultados indican que la inmunodominancia se conservó en gran medida a través de las especies y que se puede generar variación antigénica para escapar a los niveles protectores inducidos tras la vacunación.

El virus sigiloso es únicamente CD46 trópico

En virus de influenza A, la avidez de unión al receptor y la variación antigénica están estrechamente relacionadas (Hensley et al., Science, 326:734-6 (2009); and Li et al., J. Virol., 87(17):9904-10 (2013)) y pueden compensar la pérdida de aptitud viral (Kosik et al., PLoS Pathog., 14(1):e1006796 (2018)). Para comenzar a abordar si las especificidades del receptor se ven afectadas cuando hay mutaciones de nAb-escape, se infectaron células CHO que expresaban individualmente los receptores MeV. Inesperadamente, dada la íntima interacción estructural y funcional entre CD46 y nectina-4 (Figura 15), el virus sigiloso demostró producir una fusión dependiente de CD46 altamente eficiente, pero no mostró ninguna en células CHO que expresaban nectina-4 (Figura 16A). Las diferencias en la densidad de receptores se excluyeron como posible explicación de la discriminación de CD46 sobre el uso de nectina-4, ya que el número de moléculas en la superficie celular era comparable entre las dos y 10 veces más elevado que el de las células CHO que expresaban SLAM (~ 20.000) (Figura 16B). Se obtuvieron resultados similares cuando el panel de células CHO se infectó con virus Δ8, codificando el mismo MeV-HΔ8 que en el virus sigiloso, lo que argumenta en contra de la interacción entre MeV-H Δ8 y CDV-F como la razón causal. Sin embargo, otras interacciones con la proteína de la matriz MeV (MeV-M) podrían influir aún en las interacciones de unión al receptor. A continuación, se estudió si un ensayo de fusión basado en transfección transitoria sería paralelo a los resultados observados en el contexto del virus. El enfoque fue utilizar MeV-F en combinación con MeV-H A o MeV-HΔ8. Este indicó que MeV-HΔ8 discriminó nectina-4 sin afectar significativamente la fusión dependiente de CD46 (Figura 16C). Se observó una

actividad de fusión dependiente de CD46 similar con células humanas y de mono verde africano (Figura 17). Las constantes de disociación de unión al receptor se examinaron para las diversas proteínas MeV-H recombinantes (A, H1 y $\Delta 8$) mediante ELISA (Figura 18). A diferencia del anticuerpo anti-FLAG utilizado como control, los receptores celulares recombinantes mostraron avidez de unión diferencial para las proteínas MeV-H (Figura 16D). MeV-H $\Delta 8$ se unió a CD46 aproximadamente 4000 veces mejor que MeV-H A y H1, con una K_d aparente de 190 pM frente a 819 μ M para MeV-H A (K_d era ambigua). Los valores de unión para nectina-4 fueron los peores en los tres receptores y la saturación no se consiguió en la concentración más elevada utilizada. Aunque no aparecieron diferencias significativas para la K_d de nectina-4 con respecto a las proteínas MeV-H recombinantes, los valores B_{max} para MeV-H $\Delta 8$ disminuyeron aproximadamente a la mitad en comparación con MeV-H A y H1 (1,56, 1,14 y 0,74, respectivamente). Como se esperaba, MeV-H $\Delta 8$ mostró una unión insignificante a SLAM-Fc. MeV-H H1 mostró menor unión a SLAM-Fc que MeV-H A, con K_d de 10,43 μ M y 2,68 μ M, pero los valores B_{max} eran también menores (2,09 y 1,19, respectivamente). En conjunto, estos resultados demuestran que MeV-H $\Delta 8$ discrimina el uso de CD46 sobre nectina-4 a través de un aumento en la interacción de avidez con CD46 mientras disminuye la de nectina-4.

Como se describe en el presente documento, se eliminaron sistemáticamente 30 epítomos de anticuerpos conocidos de la glicoproteína H del sarampión. Los virus que tenían esa glicoproteína H del sarampión demostraron resistencia a la neutralización por anticuerpos anti-H presentes en suero humano, de ratón y conejo inmunes al sarampión. Además, se utilizó la sustitución de la glicoproteína F del sarampión por la proteína F homóloga de un morbillivirus relacionado para generar MeV sigiloso, un MeV recombinante resistente a la neutralización por suero humano inmune al sarampión. Se demostró que el virus permanece completamente fusogénico y crece únicamente en células CD46 positivas sin coste en la aptitud del virus. Estos resultados demuestran que la plataforma de MeV sigiloso se puede utilizar para viroterapia oncolítica en pacientes de cáncer inmunes al sarampión.

REIVINDICACIONES

1. Un virus del sarampión recombinante que comprende:

un ácido nucleico que codifica un polipéptido H del virus del sarampión que comprende SEQ ID NO:9 que tiene las siguientes sustituciones de aminoácidos: S189P, E235G, N238D, L249P, G302R, Y310C, Q311R, R377Q, M378K, D416N, E471K, N481Y, K488E, G491E, H495R, D505T, R533G, S546G, R547G y F552V;

y

un ácido nucleico que codifica un polipéptido F del virus del moquillo canino, en donde dicho polipéptido H del virus del sarampión codificado y dicho polipéptido F del virus del moquillo canino se incorporan en la envoltura de dicho virus recombinante,

en donde dicho virus carece tanto de un polipéptido F del virus del sarampión como de un ácido nucleico que codifica dicho polipéptido F del virus del sarampión, y

en donde dicho virus carece tanto de un polipéptido H del virus de sarampión de tipo salvaje como de un ácido nucleico que codifica dicho polipéptido H del virus del sarampión de tipo salvaje.

2. Una composición para uso en un método para la viroterapia oncolítica en un paciente de cáncer inmune al sarampión, comprendiendo dicho método la administración a dicho paciente de dicha composición que comprende el virus del sarampión recombinante de la reivindicación 1.

FIG. 1

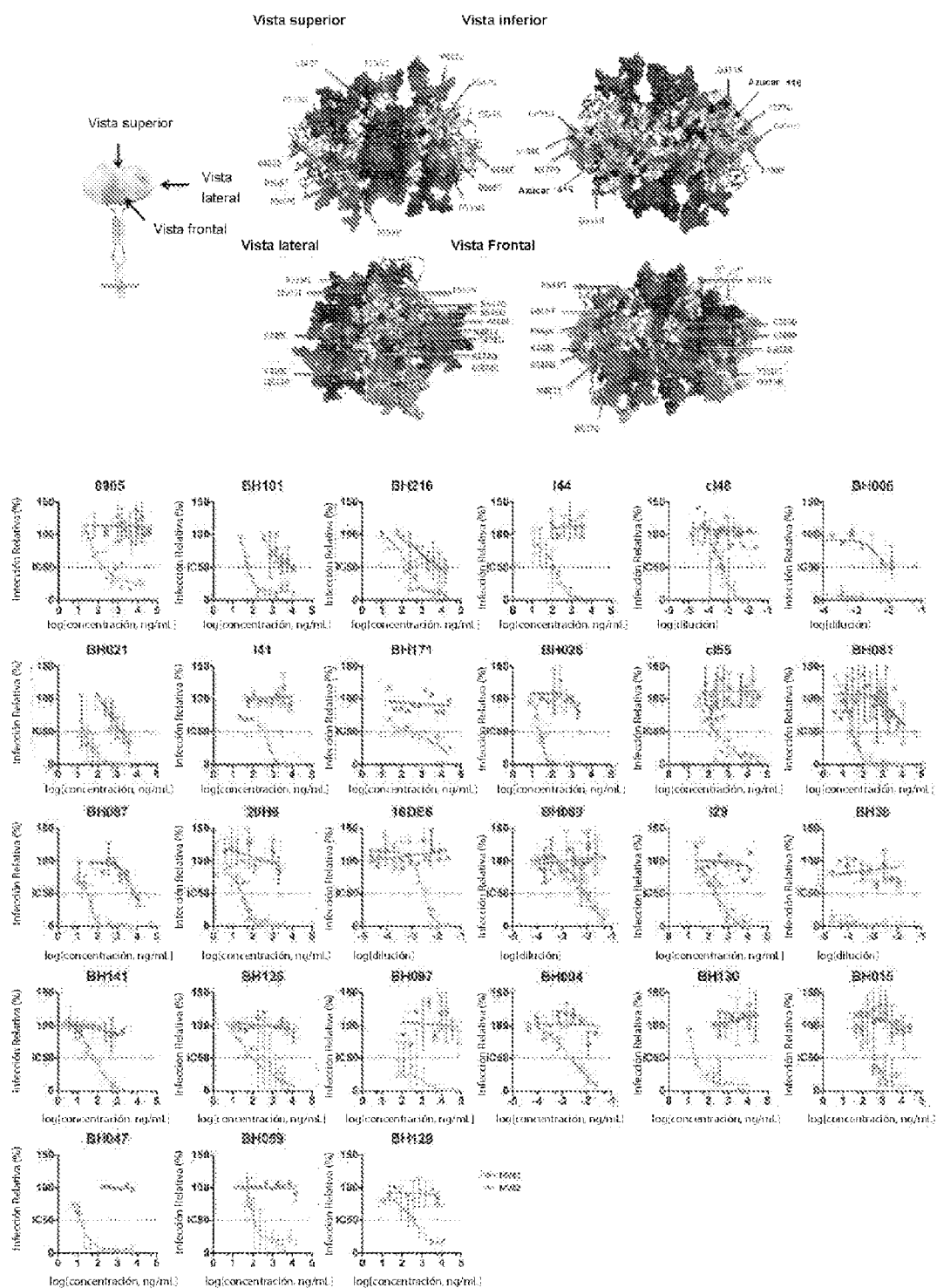


FIG. 2

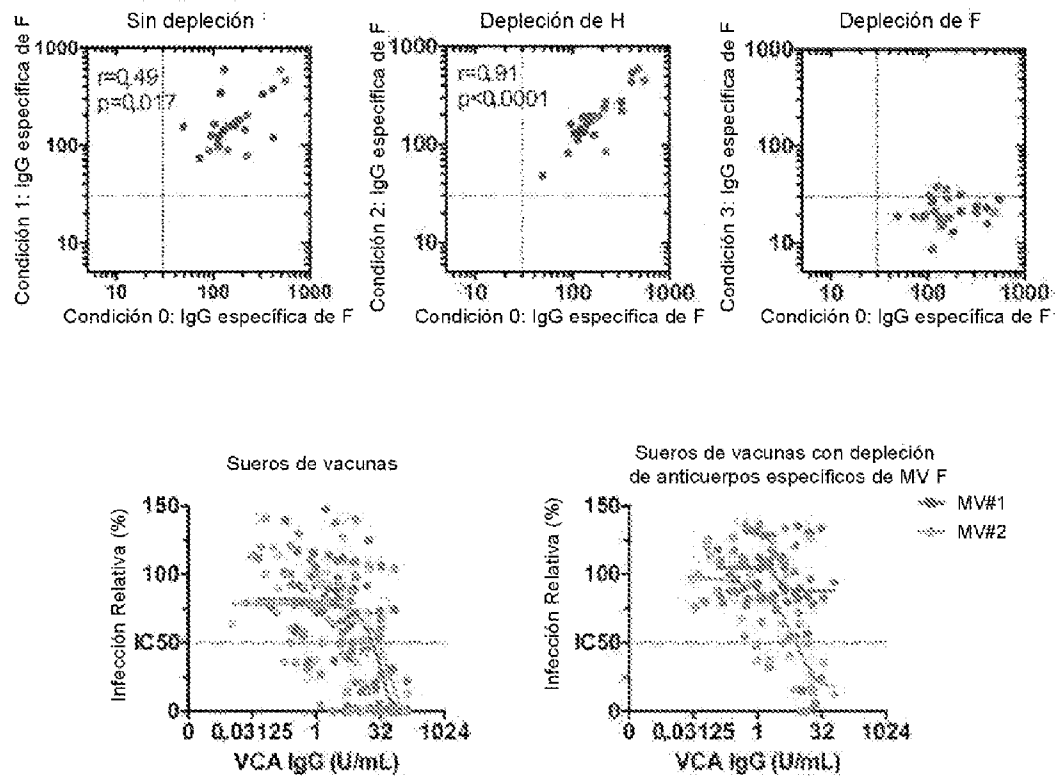


FIG. 3

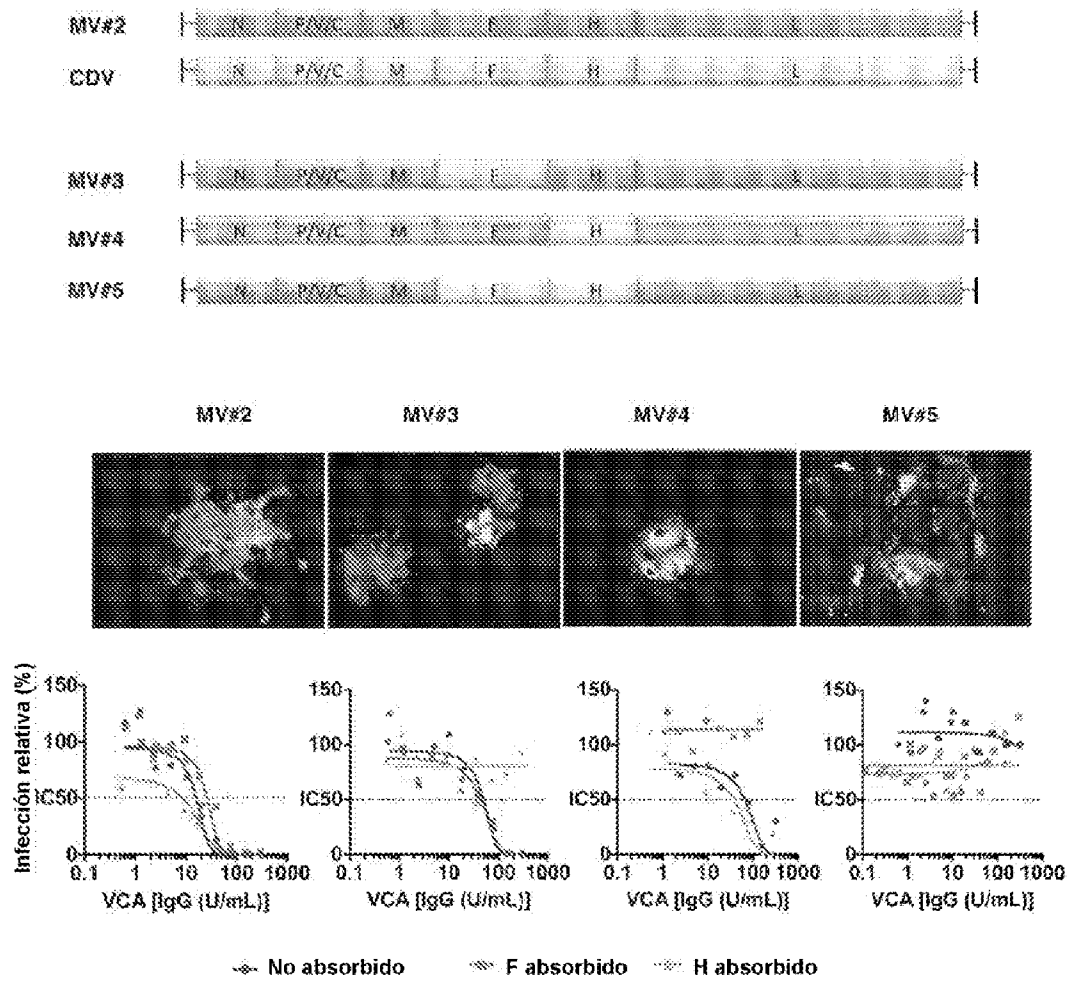


FIG. 4

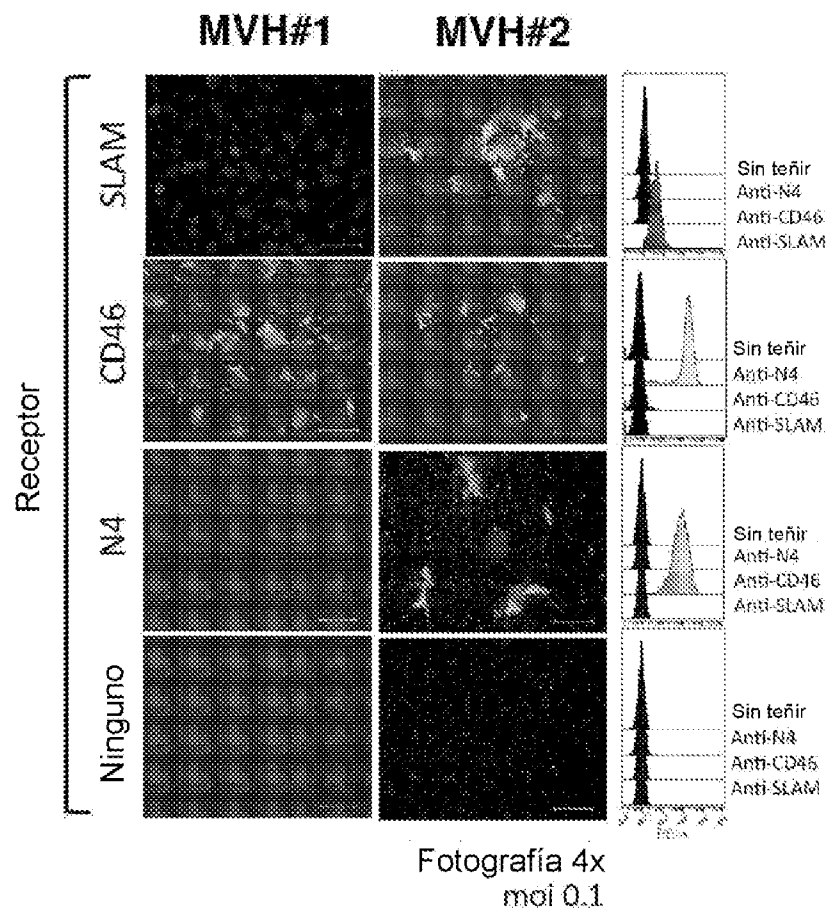
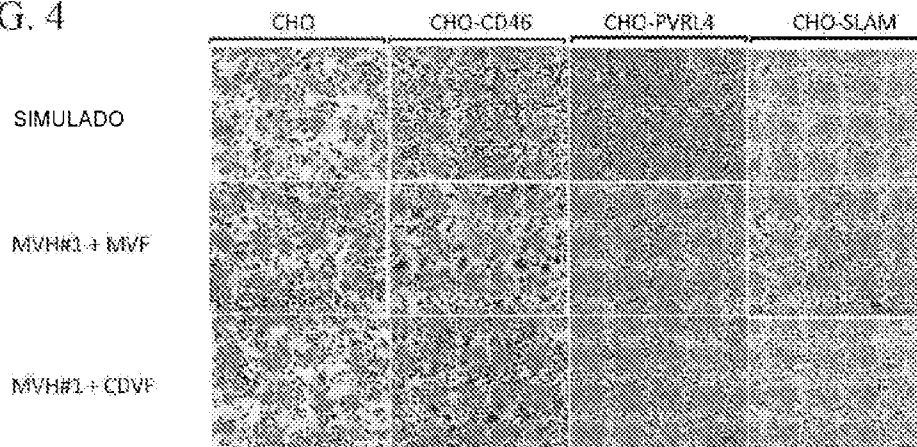


FIG. 5

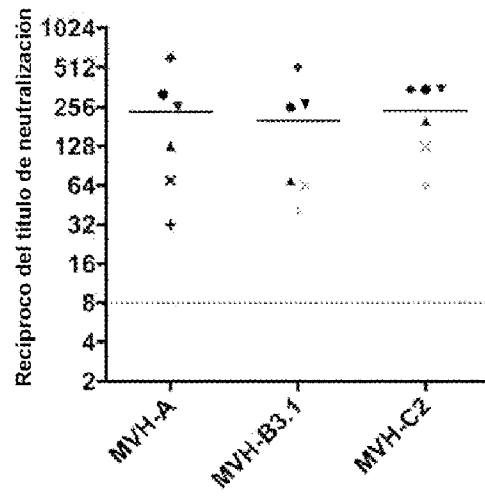


FIG. 6

SEQ ID NO:1

MSPQDRINAFYKDNPHPKGSRIVINREHLMIDRPYVLLAVLFVMEFLSLIGLLAIAGIRLHRAA
 IYTAEIHKSLSTNLDVTNSIEHQVKDVLTPLEFKIIGDEVGLRTPQRFTDLVKLISDKIKFLNPD
 REYDERDLTWCINPPERIKLDYDQYCADVAAEELMNALVNSTLLETTRTNQFLAVSKGNCSGPT
 TIRGQFSNMSLSLLDLYLGRGYNVSSIIVTMTSQGMYGGTYLVEKPNLSSKRSELSQLSMYRVFE
 VGVIRNPGLGAPVFHMTNYLEQPVSNDLNSNCMVALGELKLAALCHGEDSITIPYQSGSGKGVSFQ
 LVKLGWKSPTDMQSWVPLSTDDPVIDRLYLSSHARGVIADNQAKWAVPTTRTDDKLRMETCFQQ
 ACKGKIQALCENPEWAPLKDNRIPSYGVLSVDLSLTVELKIKIASGFGPLITHGSGMDLYKSNH
 NNVYWLTIIPPMKNLALGVINTLEWIIPRFKVSPLYFTVPIKEAGEDCHAPTYLPAEVDGDVKLSS
 NLVILPGQDLQYVLATYDTSRVEHAVVYVYSPSRSESYFYFPRLPKGVPIELQVECFETWDQK
 LWCRHFVCLADSESGGHITHSGMVMGMVSVCTVTREDGTNRR

SEQ ID NO:2

ATGTCACCCGCAAAGAGACCCGATAAATGCCTTCTACAAAGATAACCCCTTATCCCAAGGGAAGTA
 GGATAGTTATTAACAGAGAACATCTTATGATTGACAGACCCTATATTCTGCTGGCTGTTCTGTT
 CGTCATGTTTCTGAGCTTGATCGGATTGCTGGCAATTGCAGGCATTAGACTTCATCGGGCAGCC
 ATCTACACCCGCGGAGATCCATAAAAGCCTCAGTACCAATCTAGATGTGACTAACTCAATCGAGC
 ATCAGGTCAAGGACGTGCTGACACCACTCTTTAAAATCATCGGGGATGAAGTGGGCCTGAGAAC
 ACCTCAGAGATTCACTGACCTAGTGAAATTCATCTCTGACAAGATTAAATTCTTAATCCGGAT
 AGGGAGTACGACTTCAGAGATCTCACTTGGTGCATCAACCCGCCAGAGAGGATCAAACCTAGATT
 ATGATCAATACTGTGCAGATGTGGCTGCTGAAGAGCTCATGAATGCATTGGTGAACTCAACTCT
 ACTGGAGACCAGAACCAACCAATCAGTTCCTAGCTGTCTCAAAGGGAACTGCTCAGGGCCCACT
 ACAATCAGAGGTCAATTCTCAAACATGTGCGCTGTCCTTGTTGGACTTGTACTTAGGTCGAGGTT
 ACAATGTGTCATCTATAGTCACTATGACATCCCAGGGAATGTATGGGGGAACCTACCTAGTGGA
 AAAGCCTAATCTGAACAGCAAAGGGTCAGAGTTGTCACAACTGAGCATGTACCGAGTGTTTGAA
 GTAGGTGTTATCAGAAACCCGGGTTTGGGGGCTCCGGTGTTCCATATGACAACTATTTTGGAGC
 AACCAGTCAGTAATGGTCTCGGCAACTGTATGGTGGCTTTGGGGGAGCTCAAACCTCGCAGCCCT
 TTGTCACGGGGACGATTCTATCACAATTCCTATCAGGGATCAGGGAAAGGTGTCAGCTTCCAG
 CTCGTCAAGCTGGGTGTCTGGAAATCCCCAACCGACATGCAATCCTGGGTCCCCTTATCAACGG
 ATGATCCAGTGGTAGACAGGCTTTACCTCTCATCTCACAGAGGTGTCATCGCTGACAATCAAGC
 AAAATGGGCTGTCCCGACAACACGAACAGATGACAAGTTGCGAATGGAGACATGCTTCCAGCAG
 GCGTGTAAGGTAAAATCCAAGCACTCTGCGAGAATCCCGAGTGGGTGCCATTGAAGGATAACA
 GGATTCCTTCATACGGGGTCCTGTCTGTTGATCTGAGTCTGACAGTTGAGCTTAAAATCAAAAT
 TGCTTCGGGATTTCGGGCCATTGATCACACACGGCTCAGGGATGGACCTATACAAATCCAACCGC
 AACAAATGTGTATTGGCTGACTATTCCGCCAATGAGAAATCTAGCCTTAGGCGTAATCAACACAT
 TGGAGTGGATACCGAGATTCAAGGTTAGTCCCAACCTCTTCACTGTCCCAATTAAGGAAGCAGG
 CGAGGACTGCCATGCCCCAACATACCTACCTGCGGAGGTGGACGGTGATGTCAAACCTCAGTTCC
 AACCTGGTGATTCTACCTGGTCAAGATCTCCAATATGTTTTGGCAACCTACGATACCTCCAGGG
 TTGAGCATGCTGTGGTTTATTACGTTTACAGCCCAAGCCGCTCATTTTCTTACTTTTATCCTTT
 TAGGTTGCCTATAAAGGGGGTCCCAATCGAACTACAAGTGGAATGCTTCACATGGGACCAAAAA
 CTCTGGTGCCGTCACTTCTGTGTGCTTGCGGACTCAGAATCCGGCGGACATATCACTCACTCTG
 GGATGGTGGGCATGGGAGTCAGCTGCACAGCTACCCGGGAAGATGGAACCAATCGCAGATAA

FIG. 6 (cont.)

SEQ ID NO:3

MSPQQRDRINAFYKDNPHSKGSRIVINREHLMIDRPYVLLAVLFVMFSLIGLLAIAGIRLHRA
AIYTAEIHKSLSTNLDVTNSIEHQVKDVLTPLEFKIIGDEVGLRTPQRFETDLVKFISDKIKFLN
PDREYDFRDLTWCINPPERIKLNYDQYCADVAAEELMNALVNSTLLETTRTTNQFLAVSKGNCP
GPTTIRGQFSNMSLSLLDLYLSRGYNVSSIIVTMTSQGMYGTYLVGKPDLSKGSSELSQPSMY
RVFEVGVIRNPGLGAPVFHMTNYFEQPISKDLSNCMVALGELKLAALCHRGDSITIPCRGSGK
GVSFQVLKLGWVKSPTDMHSWVPLSTDDPVIDRLYLSSFRGVITDNQANWAVPTTRTDDKLQK
ETCFQQACKGKIQALCENLEWAPLKDSRI PSYGVLSVNLSLAAE PKTKIASGFGPLITHGSGM
DLYKSNHNNVYWLTI PPMKNLALGVINTLEWIPRLKVSPLYFTVPIEEADEDCRAFTYLP AEV
TGDVKLSSNLVILPGQDLQYVLATYDTSGVEHAVVYVYVSPGGSFSYVYPFRLPIKGTPIELQ
VECFTWAQRLWCRHFCVLADSESGGHLTHSGMVGMEVSCTVNRDEANRR

SEQ ID NO:4

MSIMGLKVNVS AIFMAVLLTLQTPTGQIHWGNLSKIGVVGIGSASYKVMTRSSHQSLVIKLM PN
ITLLNNCTRVEIAEYRRLLR TVLEPIRDALNAMTQNI RPVQSVASSRRHKRFAGVVLAGAALGV
ATAAQITAGIALHQSM LNSQAIDNLRASLETTNQAIETIRQAGQEMILAVQGVQDYINNELIPS
MNQLSCDLIGQKLGLKLLRYYTEILSLFGPSLRDPISAEISIQALSYALGGDINKVLEKLGYSG
GDLLGILESGGIKARITHVDTESYFIVLSIAYPTLSEIKGVI VHRLEGVSYNIGSQEWYTTVPK
YVATQGYLISNFEDESSCTFMPEGTVCSQNALYPMSPLLQECLRGYTKSCARTLVSGSFGNRFIL
SQGNLIANCASILCKCYTTGTIINQDPDKILTYIAADHCPVVEVNGVTIQVGSRRYPDAVYLHR
IDLGPPI SLERLDVGTNLGNIAIAKLEDAKELLE SSDQILRSMKGLSSTSIVYILIAVCLGGLIG
IPALICCCRGR CNKKGEQVGMSRPG LKPDLTGTSKSYVRSL

FIG. 6 (cont.)

SEQ ID NO:5

ATGGGTCTCAAGGTGAACGTCTCTGCCGTATTCATGGCAGTACTGTAACTCTCCAAACACCC
GCCGGTCAAATTCATTGGGGCAATCTCTCTAAGATAGGGGTAGTAGGAATAGGAAGTGCAAGC
TACAAAGTTATGACTCGTTCCAGCCATCAATCATTAGTCATAAAATTAATGCCCAATATAACT
CTCCTCAATAACTGCACGAGGGTAGAGATTGCAGAATACAGGAGACTACTAAGAACAGTTTTG
GAACCAATTAGGGATGCACTTAATGCAATGACCCAGAACATAAGGCCGGTTCAGAGCGTAGCT
TCAAGTAGGAGACACAAGAGATTTGCGGGAGTAGTCCTGGCAGGTGCGGCCCTAGGTGTTGCC
ACAGCTGCTCAGATAACAGCCGGCATTGCACTTCACCGGTCCATGCTGAACTCTCAGGCCATC
GACAATCTGAGAGCGAGCCTGGAACTACTAATCAGGCAATTGAGGCAATCAGACAAGCAGGG
CAGGAGATGATATTGGCTGTTCAAGGTGTCCAAGACTACATCAATAATGAGCTGATACCGTCT
ATGAACCAGCTATCTTGTGATCTAATCGGTGAGAAGCTCGGGCTCAAATTGCTTAGATACTAT
ACAGAAATCCTGTCATTATTTGGCCCCAGCCTACGGGACCCCATATCTGCGGAGATATCTATC
CAGGCTTTGAGTTATGCACTTGGAGGAGATATCAATAAGGTGTTAGAAAAGCTCGGATACAGT
GGAGGCGATTACTAGGCATCTTAGAGAGCAGAGGAATAAAGGCTCGGATAACTCACGTCGAC
ACAGAGTCCTACTTCATAGTCCTCAGTATAGCCTATCCGACGCTGTCCGAGATTAAGGGGGTG
ATTGTCCACCGGCTAGAGGGGGTCTCGTACAACATAGGCTCTCAAGAGTGGTATAACCACTGTG
CCCAAGTATGTTGCAACCCAAGGGTACCTTATCTCGAATTTTGATGAGTCATCATGTACTTTC
ATGCCAGAGGGGACTGTGTGCAGCCAAAATGCCTTGTACCCGATGAGTCCTCTGCTCCAAGAA
TGCCCTCCGGGGGTCCACCAAGTCCTGTGCTCGTACACTCGTATCCGGGTCTTTTGGAACCGG
TTCATTTTATCACAGGGAACCTAATAGCCAATTGTGCATCAATTCTTTGTAAGTGTTACACA
ACAGGTACGATTATTAATCAAGACCCTGACAAGATCCTAACATACATTGCTGCCGATCGCTGC
CCGGTAGTCGAGGTGAACGGCGTGACCATCCAAGTCGGGAGCAGGAGGTATCCAGACGCTGTG
TACTTGACACAGAATTGACCTCGGTCTCCCATATCATTGGAGAGGTTGGACGTAGGGACAAAT
CTGGGGAATGCAATTGCCAAATTGGAGGATGCCAAGGAATTGTTGGAATCATCGGACCAGATA
TTGAGAAGTATGAAAGGTTTATCGAGCACTAGCATAGTCTACATCCTGATTGCAGTGTGTCTT
GGAGGGTTGATAGGGATCCCCACTTTAATATGTTGCTGCAGGGGGCGTTGTAACAAAAGGGA
GAACAAGTTGGTATGTCAAGACCAGGCCTAAAGCCTGACCTTACAGGAACATCAAATCCTAT
GTAAGATCGCTTTGA

FIG. 6 (cont.)

SEQ ID NO:6

MHNKNPKKSKPLPHTRQDPLQQHSTRSAETKTSQGGHSTTSAQRSTYHGPRTSDRSVHYIMNR
 TRSCKQTSHRSDNIPPHRDHEGIIHHTPESVTQGASSWFKRRQSNATNAGSQYTWLVLCIGI
 ASLLLCskaQIHWNNLSTIGIIGTDSVHYKIMTRPSHQYLVIKLMPNVSLIDNCTKAELGEYE
 KLLNSVLEPINQALTMTNNVKPLQSVGSGRRQRRFAGVVLAGAALGVATAAQITAGIALHQ
 NLNAQAIQSLRTSLEQSNKAIEEIREATQETVIAVQGVQDYVNNELVPAMQHMSCELVGQRLG
 LKLLRYYTELLSIFGPSLRDPISAEISIQALSYALGGEIHKILEKLGYSNNDMIAILES
 RGITKITHVDLPGLIILSISYPTLSEVKGIVHRLEAVSYNIGSQEWYTTVPKYVATNGYLISN
 FDESSCVFVSESAICSQNSLYPMSPILOQCIRGDTSSCARTLVSGTMGNKFILSKGNIVANCA
 SILECKCYSTSTIINQSPDKLLTFIASDTCPLVEIDGVTIQVGGRRQYPMVYESKVALGPAISLE
 RLDVGTNLGNALKKLDDAKVLIDSSNQILETVKRSSFNFGSLLSVPIICTALALLLLIYCK
 RRYRQTEKHNTKVDPTFKPDLTGTSKSYVRSL

SEQ ID NO:7

MHNKIPKRSKPLPHTRQDPLQQHSTRFGETTTSQGRHSTTSAQRSTHHGPRTSDRPVHHTMNR
 TRSCKQTSHRSDNIPPHRDHKGIIHHTPESVTQGASSWFKRRQFNATNAGSQCTWLVLWCIGI
 ASLFLCSKAQIHWNNLSTIGIIGTDSVHYKIMTRPSHQYLVIKLMPNVSLIDNCTKAELGEYE
 KLLNSVLEPINQALTMTNNVKPLQSVGSGRRQRRFAGVVLAGAALGVATAAQITAGIALHQ
 NLNAQAIQSLRTSLEQSNKAIEEIREATQETVIAVQGVQDYVNNELVPAMQHMSCELVGQRLG
 LKLLRYYTELLSIFGPSLRDPISAEISIQALSYALGGEIHKILEKLGYSNNDMIAILES
 RGITKITHVDLPGLIILSISYPTLSEVKGIVHRLETVSYNIGSQEWYTTVPKYVATNGYLISN
 FDESSCVFFSESAICSQNSLYPMSPILOQCIRGDTSSCARTLVSGTMGNKFILSKGNIVANCA
 SILECKCYSTSTIINQSPDKLLTFIASDTCPLVEIDGVTIQVGGRRQYPMVYESKVALGPAISLE
 RLDVGTNLGNALKKLDDAKVLIDSSNQILETVKRSSFNFGSLLSIPILICTALVLLLLLIYCCN
 RRYRQTEKHNTKVDPTFKPDLTGTSKSYVRSL

SEQ ID NO:8

MLPYQDKVGAfYKDNARANSTKLSLVTEGHGGRPPYLLFVLLILLVGILALLAITGVRFHQV
 STSNMEFSRLLKEDMEKSEAVHHQVIDVLTPLFKIIGDEIGLRLPQKLNEIKQFILQKTNFFN
 PNREFDFRDLHWCINPPSTVKVNFTNYCESIGIRKAIASAAANPILLSALS GGRGDI FPPHRC
 SGATT SVGKV FPLSVSLMSLISRTSEVINMLTAISDG VYGKTYLLVPDDIEREFDTREIRVFE
 IGFIKRWLNDMPLLQTTNYMVLPKNSKAKVCTIAVGELTLASLCVEESTVLLYHDSSGSQDGI
 LVVTLGIFWATPMDHIEEVI PVAHPSMKKIHI TNHRGFIKDSIATWMVPALASEKQEEQKGCL
 ESACQRKTYPMCNQASWEPFGGRQLPSYGRLLTLPDASVDLQLNISFTYGPVILNGDGM DY
 YESPLLN SGWLTIPPKDGTISGLINKAGRGDQFTVLP HVLT FAPRESSGNCYLP IQTSQ IRDRDV
 LIESNIVVLP TQSIRYVIATYDISRSDHAIVYVYDPIRTISYTHPFRLLTKGRPD FLRIECF
 VWDDNLWCHQFYRFEADIANSTTSVENLVRI RFSCNR

FIG. 6 (cont.)

SEQ ID NO:9

MSPQRDRINAFYKDNPHSKGSRIVINREHLMIDRPYVLLAVLFVMFLSLIGLLAIAGI
 RLHRAAIYTAEIHKSLSTNLDVTNSIEHQVKDVLTPLFKIIGDEVGLRTPQRFDTDLVK
 FISDKIKELNPDREYDFRDLTWCINPPERIKLNYDQYCADVAAEELMNALVNSTLLET
 RTTNQFLAVSKGNCSGPTTIRGQFSNMSLSLLDLYLSRGYNVSSIIVTMTSQGMYGGTY
 LVEKPNLNSKGSSELSQLSMYRVFEVGVIRNPGLGAPVFHMTNYFEQPI SKDLSNCMVA
 LGELKLAALCHGGDSITIPYQGSKGVSFQLVKLG VWKSPTDMHSWVPLSTDDPVIDR
 LYLSSHARGVITDNQANWAVPTTRTDDKLRMETCFQQACKGKIQALCENLEWAPLKDSR
 IPSYGVLSVDLSLAAEPKIKIASGFGPLITHGSGMDLYKSNHNNVYWLTIPPMKNLAL
 GVINTLEWIPRLKVSPNLFTVPIKEAGEDCHAPTYLPAEVDGDVKLSSNLVILPGQDL
 QYVLATYDTSRVEHAVVYVYSPSRSEFSYFYPFRLPIKGTPIELQVECF TWAQRLWCR
 HFCVLADSESGGHLTHSGMVGMEVSC TVNREDEANRR

FIG. 7

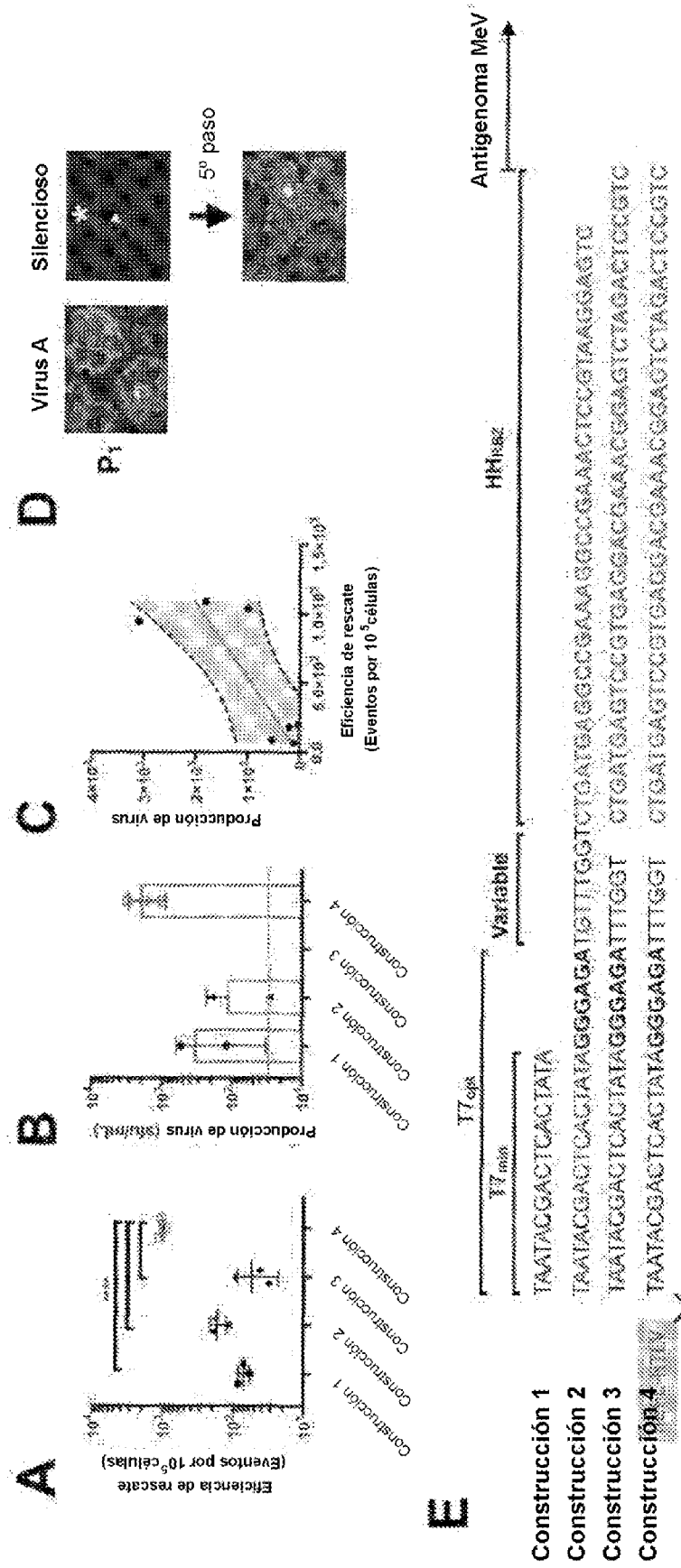


FIG. 8

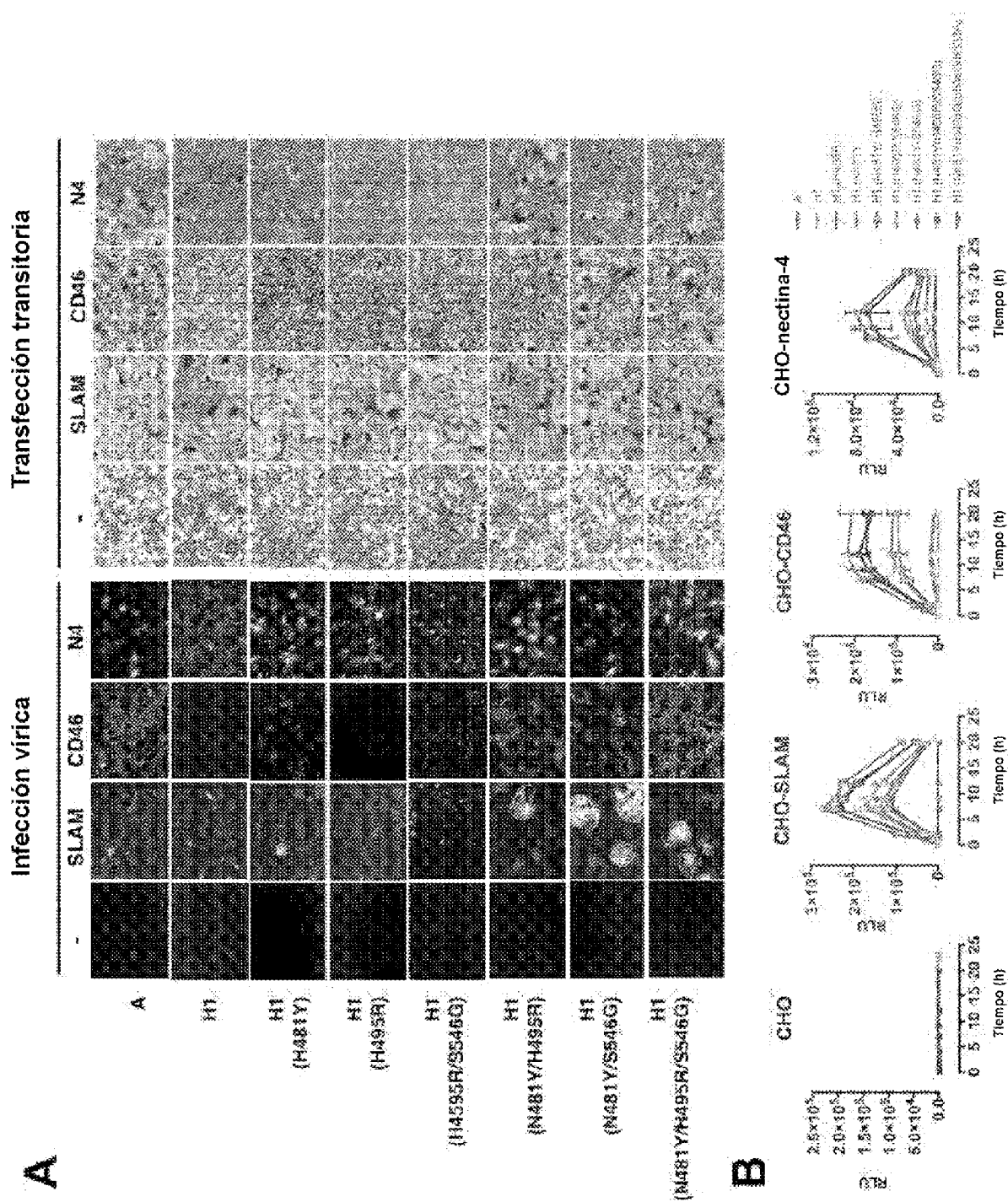


FIG. 9

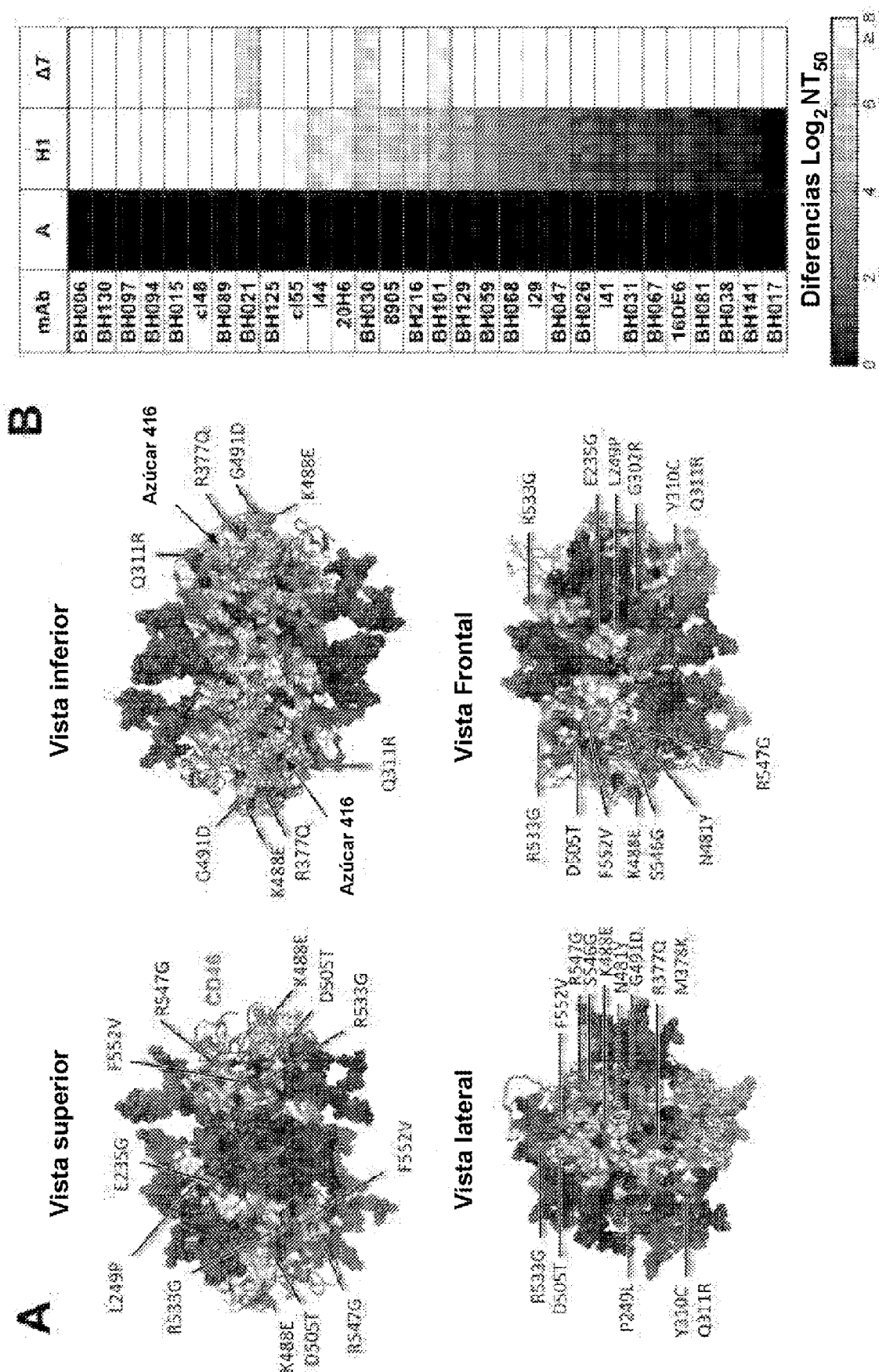


FIG. 10

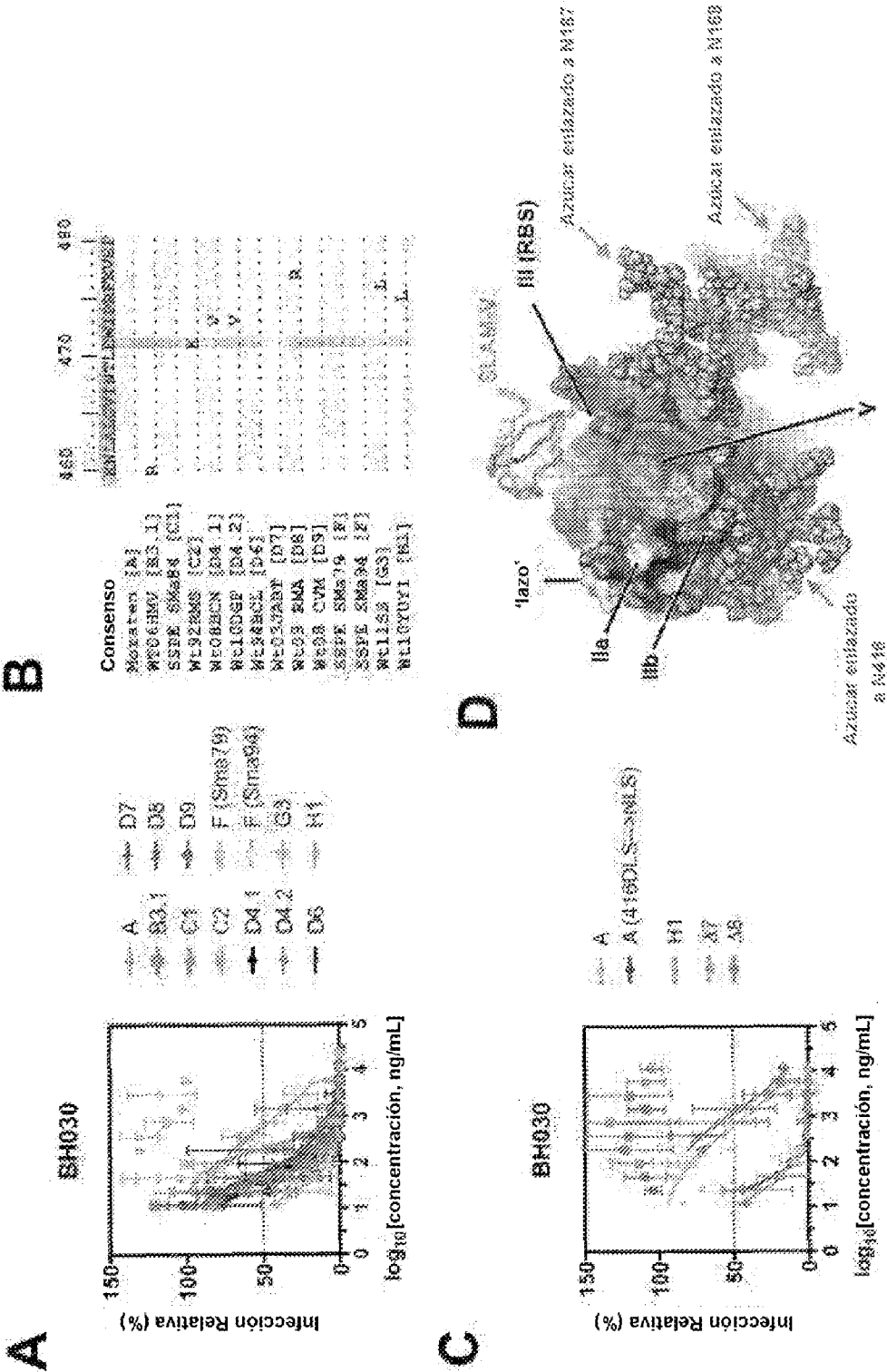


FIG. 11

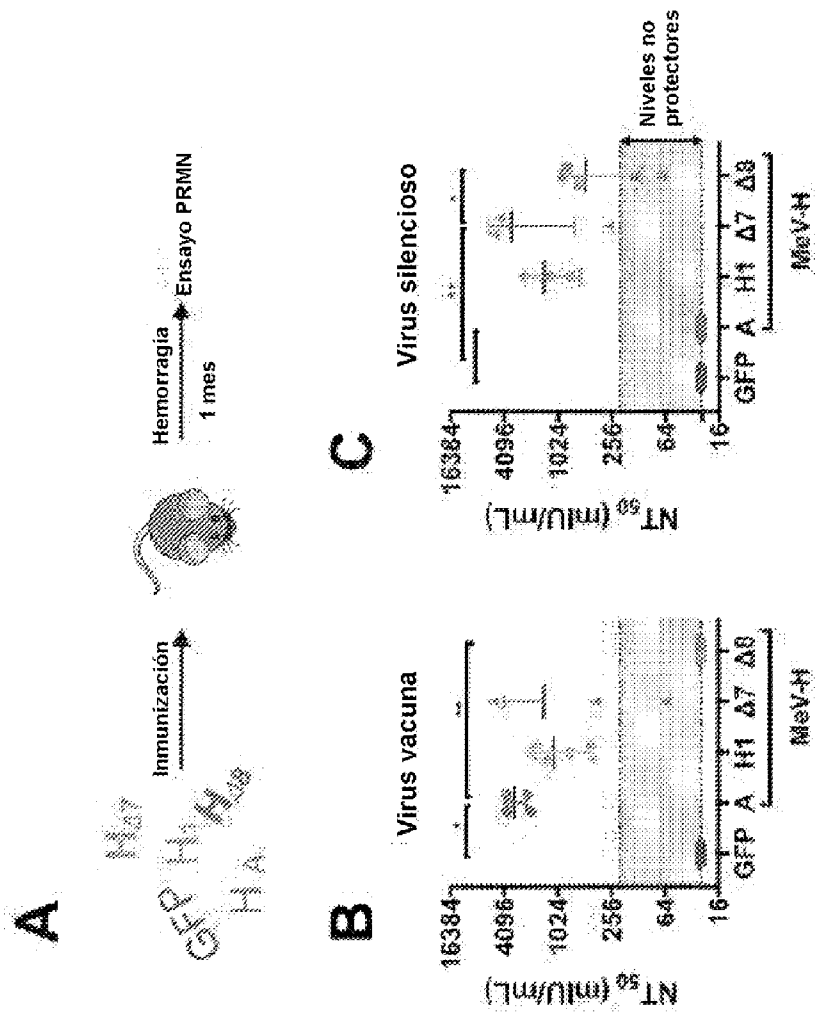


FIG. 12

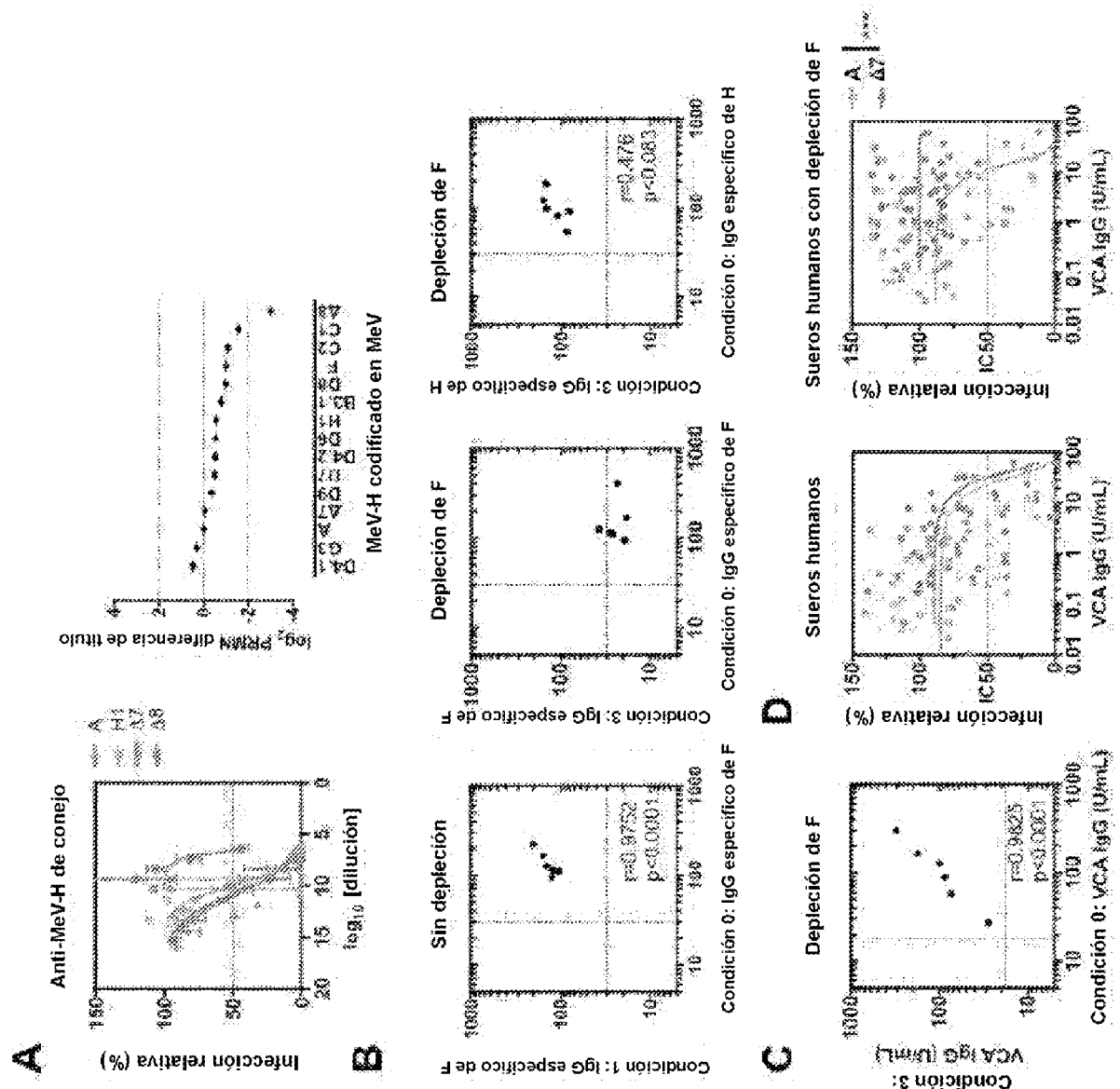


FIG. 13

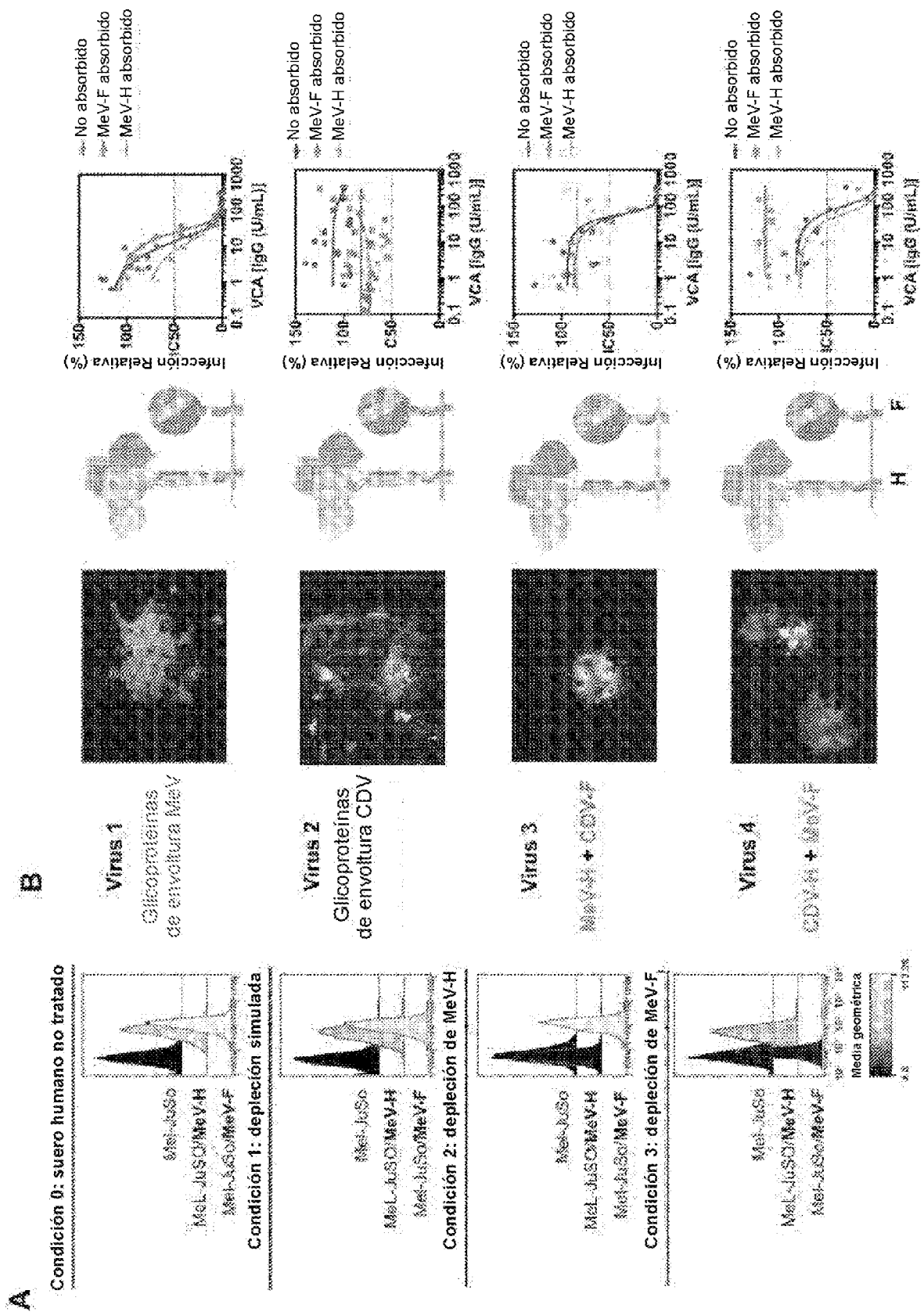


FIG. 14

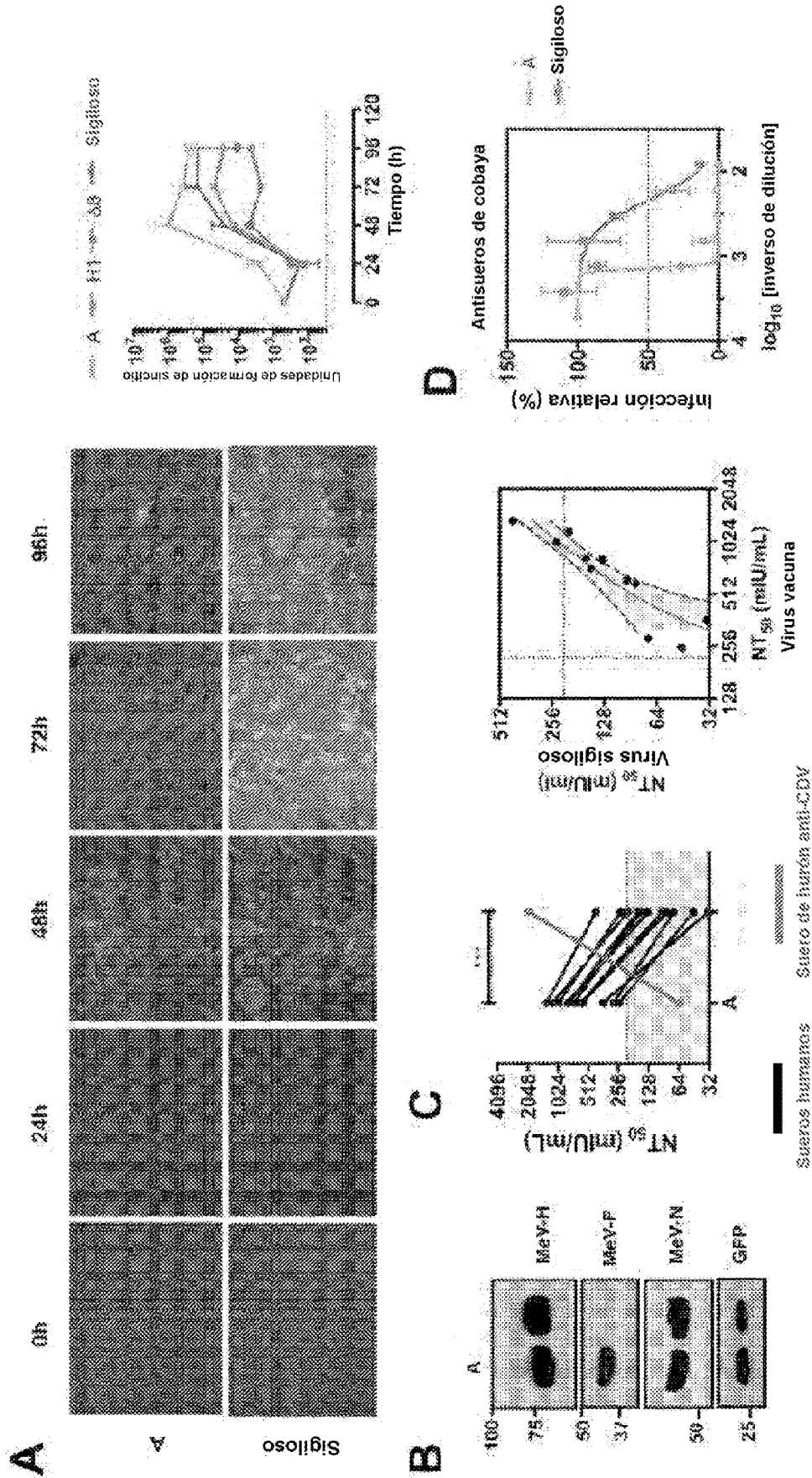


FIG. 16

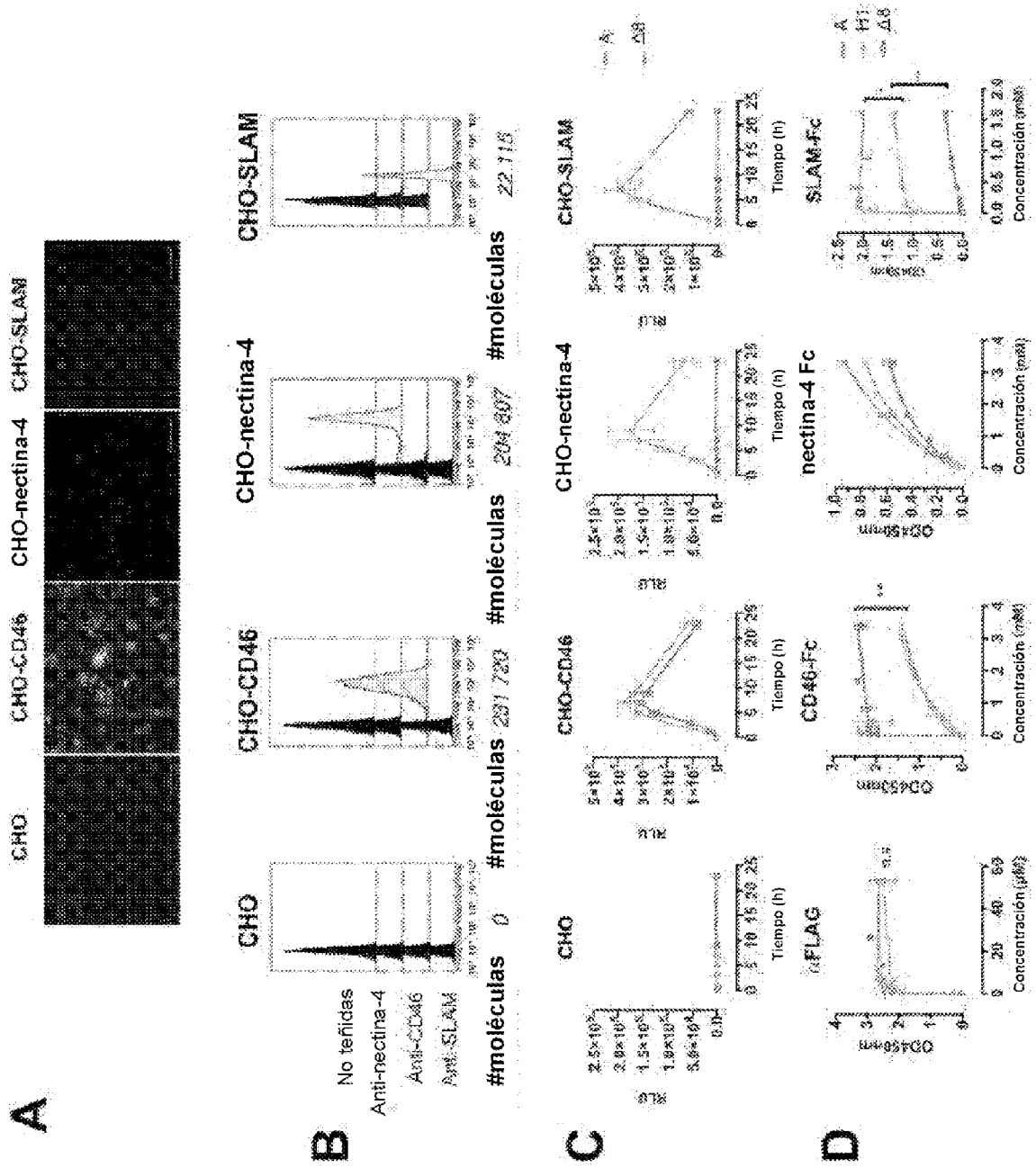


FIG. 17

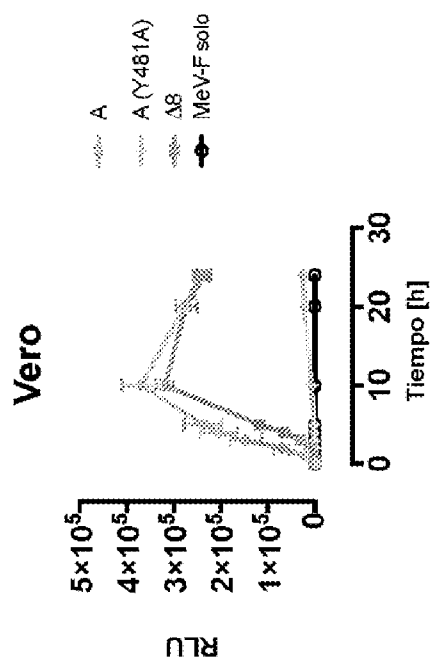


FIG. 18

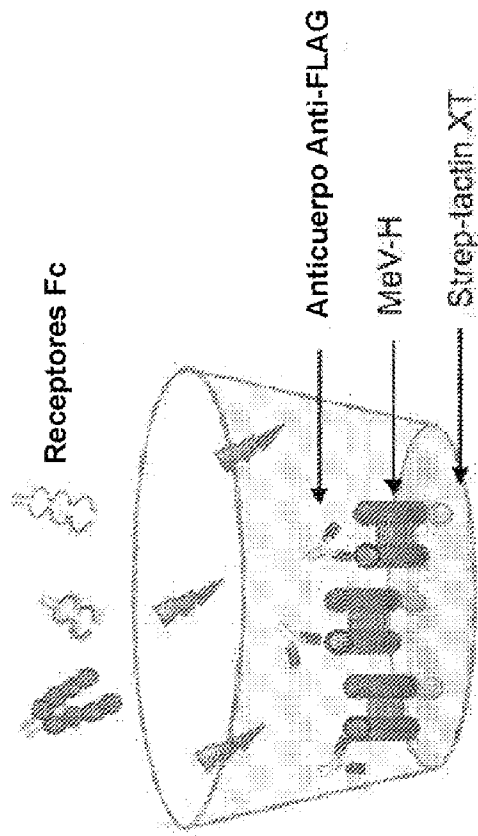


FIG. 19

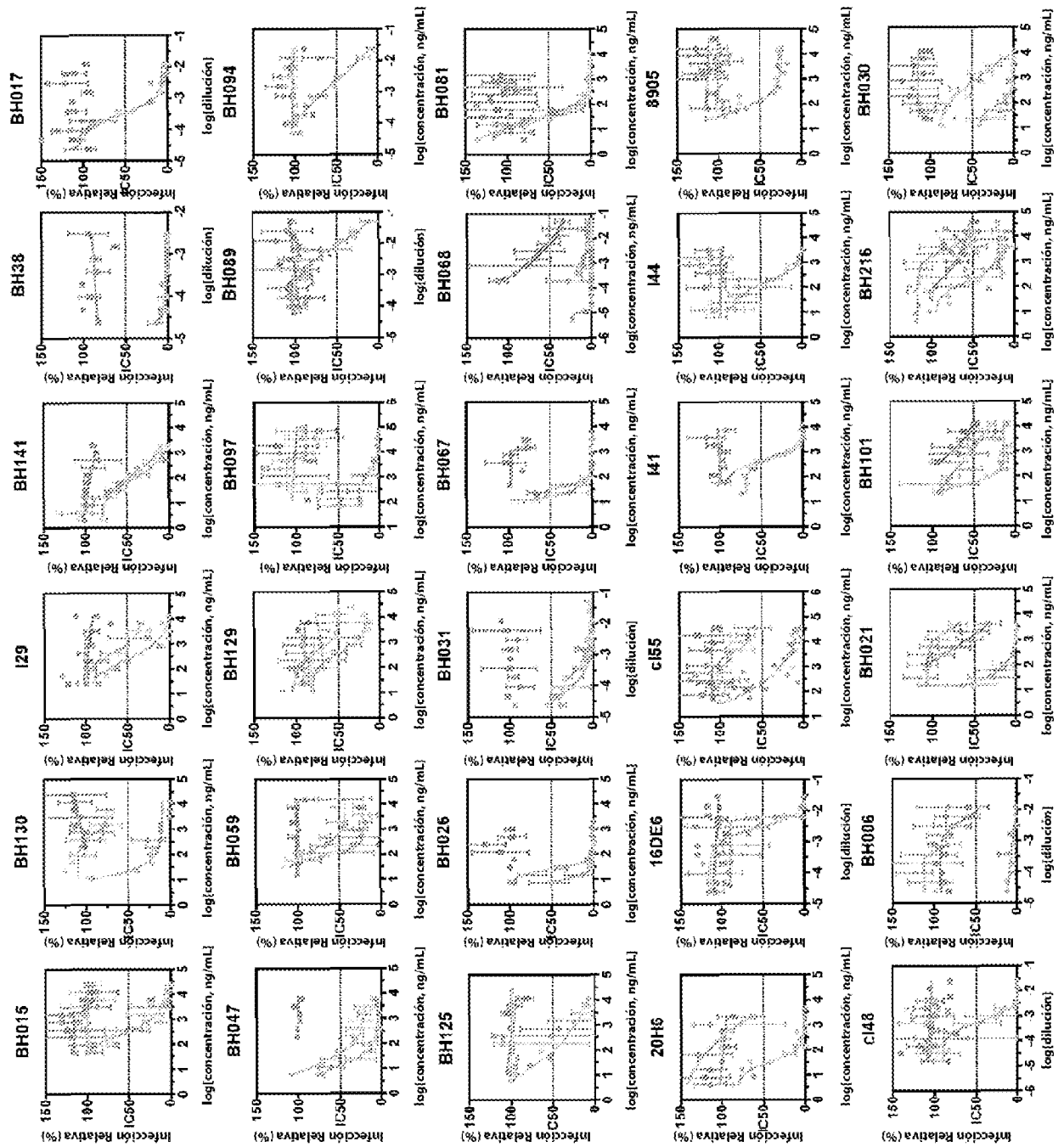


FIG. 20

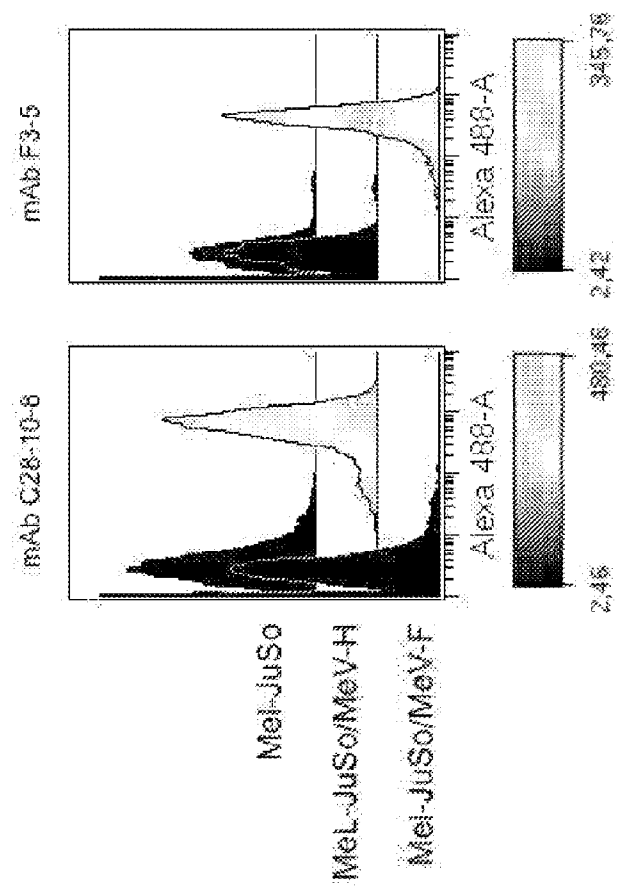


FIG. 21

