

VIRUS DEL MOQUILLO CANINO HEMAGLUTININA Y POLIPÉPTIDOS DE FUSIÓN

REFERENCIA CRUZADA PARA APLICACIONES RELACIONADAS

- 5 Esta solicitud reclama el beneficio de la solicitud provisional de EE.UU. con número de serie 62/913,111, presentada el 9 de octubre de 2019. La divulgación de la solicitud anterior se considera parte (y se incorpora por referencia) de la divulgación de esta solicitud.

LISTA DE SECUENCIAS

- 10 La presente solicitud contiene un Listado de Secuencias que ha sido enviado electrónicamente en formato ASCII y se incorpora aquí por referencia en su totalidad. Dicha copia ASCII, creada el 25 de noviembre de 2020, se llama 07039-1936WO1_SL.txt y tiene un tamaño de 1 096 580 bytes.

15 *1. Campo técnico*

- Este documento se refiere a los polipéptidos de fusión (F) y hemaglutinina (H) del virus del moquillo canino (CDV). Por ejemplo, este documento se refiere a polipéptidos CDV H, polipéptidos CDV F, virus recombinantes (p. ej., virus de estomatitis vesicular (VSV)) que contienen polipéptidos CDV H y/o polipéptidos CDV F, moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido CDV H y/o polipéptidos CDV polipéptido F, métodos para producir virus recombinantes (p. ej., VSV) que contienen polipéptidos CDV H y/o polipéptidos CDV F, y métodos para usar virus recombinantes (p. ej., VSV) que contienen polipéptidos CDV H y/o polipéptidos CDV F para tratar el cáncer o enfermedades infecciosas enfermedades.

25 *2. Información de antecedentes*

- Los virus como los VSV, los virus del sarampión (MeV) y los adenovirus se pueden usar como virus oncolíticos para tratar el cáncer. El virus de la estomatitis vesicular (VSV) es un miembro de la familia Rhabdoviridae. El genoma de VSV es una sola molécula de ARN de sentido negativo que codifica cinco polipéptidos principales: un polipéptido de nucleocápside (N), un polipéptido de fosfoproteína (P), un polipéptido de matriz (M), un polipéptido de glicoproteína (G) y una polimerasa viral (L) polipéptido.

RESUMEN

Este documento proporciona métodos y materiales relacionados con los polipéptidos CDV H y/o CDV F. Por ejemplo, este documento proporciona polipéptidos CDV H, polipéptidos CDV F, virus recombinantes (p. ej., virus de estomatitis vesicular (VSV)) que contienen polipéptidos CDV H y/o polipéptidos CDV F, moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido CDV H y/o polipéptidos CDV F polipéptido, métodos para producir virus recombinantes (p. ej., VSV) que contienen polipéptidos CDV H y/o polipéptidos CDV F, y métodos para usar virus recombinantes (p. ej., VSV) que contienen polipéptidos CDV H y/o polipéptidos CDV F para tratar cáncer o enfermedades infecciosas.

Como se describe en el presente documento, los polipéptidos CDV F pueden diseñarse para que tengan una mayor actividad fusogénica cuando se expresan en células en combinación con un polipéptido CDV H en comparación con el nivel de actividad fusogénica de un polipéptido CDV F de tipo salvaje expresado por células comparables en combinación con ese Polipéptido CDV H. Por ejemplo, los polipéptidos CDV F diseñados para tener una secuencia peptídica señal truncada pueden exhibir una mayor actividad fusogénica cuando se expresan por células en combinación con un polipéptido CDV H (por ejemplo, un polipéptido CDV H de tipo salvaje o no dirigido) en comparación con el nivel de actividad fusogénica de un polipéptido CDV F de tipo salvaje que contiene una secuencia de péptido señal de longitud completa expresada por células comparables en combinación con ese polipéptido CDV H. Dichos polipéptidos CDV F pueden incorporarse en un virus para crear un virus recombinante que tiene la capacidad de aumentar la actividad fusogénica observada en las células infectadas por ese virus.

Como también se describe en el presente documento, los polipéptidos H de CDV pueden diseñarse para ser desorientados de modo que no tengan la capacidad, cuando se usan en combinación con un polipéptido F (p. ej., un polipéptido F de CDV), para ingresar a las células a través de células a través de un polipéptido Nectin 4, un polipéptido SLAMF1 o un receptor de virus presente en las células Vero de tipo salvaje. Dichos polipéptidos CDV H pueden proporcionar una plataforma para diseñar polipéptidos H que tengan la capacidad de volver a dirigirse a uno o más objetivos de interés. Por ejemplo, un polipéptido H proporcionado en el presente documento se puede diseñar adicionalmente para que contenga una secuencia de unión (por ejemplo, una secuencia de anticuerpo monocatenario (scFv)) que tenga especificidad de unión para un objetivo de interés, de modo que un virus recombinante que contenga ese polipéptido H redirigido, y un polipéptido F, pueden infectar células que expresan ese objetivo.

Además, los virus como los VSV se pueden diseñar para que tengan una molécula de ácido nucleico que codifique un polipéptido VSV N, un polipéptido VSV P, un polipéptido VSV M, un polipéptido CDV F (p. polipéptido CDV F descrito en el presente documento), un polipéptido CDV H (p. ej., un polipéptido CDV H de tipo salvaje o un polipéptido CDV H modificado por ingeniería genética descrito en el presente documento) y un polipéptido VSV L. Tal molécula de ácido nucleico puede carecer de un polipéptido VSV G funcional y/o carecer de la secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido VSV G de longitud completa. Por ejemplo, un VSV proporcionado en el presente documento puede diseñarse para que tenga una molécula de ácido nucleico que codifique un polipéptido VSV N, un polipéptido VSV P, un polipéptido VSV M, un polipéptido CDV F (p. polipéptido CDV F diseñado descrito en este documento), un polipéptido CDV H (por ejemplo, un polipéptido CDV H de tipo salvaje o un polipéptido CDV H diseñado descrito en este documento) y un polipéptido VSV L y carece de la capacidad de codificar un polipéptido VSV G funcional. En algunos casos, un VSV proporcionado en el presente documento puede diseñarse para que tenga una molécula de ácido nucleico que codifique un polipéptido VSV N, un polipéptido VSV P, un polipéptido VSV M, un polipéptido CDV F (por ejemplo, un polipéptido CDV F de tipo salvaje o un polipéptido CDV F diseñado descrito en este documento), un polipéptido CDV H (por ejemplo, un polipéptido CDV H de tipo salvaje o un polipéptido CDV H diseñado descrito en este documento) y un polipéptido VSV L con la secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido CDV F y el El polipéptido H de CDV está ubicado en la posición en la que la secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido G de VSV de longitud completa se ubica normalmente en un VSV de tipo salvaje. En algunos casos, un VSV proporcionado en este documento puede diseñarse para tener una molécula de ácido nucleico donde la secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido G de VSV se reemplaza con un ácido nucleico que codifica un polipéptido F de CDV (por ejemplo, un polipéptido F de CDV de tipo salvaje o un polipéptido de CDV F diseñado descrito en este documento) y un polipéptido de CDV H (por ejemplo, un polipéptido de CDV H de tipo salvaje o un polipéptido de CDV H diseñado descrito en este documento).

Como se describe en el presente documento, los híbridos de VSV/CDV pueden diseñarse para tener selectividad de CDV y una replicación rápida como se observa con el VSV de tipo salvaje o parental. En algunos casos, un híbrido VSV/CDV proporcionado en este documento puede diseñarse para tener un tropismo preseleccionado. Por ejemplo, se pueden usar polipéptidos CDV F y/o H que tienen especificidad inactivada para Nectin-4 y/o SLAMF1. En tales casos, se puede unir un scFv o un ligando polipeptídico, por ejemplo, al extremo C-terminal del polipéptido CDV H. En tales casos, el scFv o el ligando polipeptídico puede determinar el tropismo del híbrido VSV/CDV.

Los ejemplos de scFv que pueden usarse para dirigir híbridos VSV/CDV a receptores celulares (p. ej., receptores celulares asociados a tumores) incluyen, entre otros, anti-EGFR, anti- α FR, anti-CD46, anti-CD38, anti-HER2/neu, anti-EpCAM, anti-CEA, anti-CD20, anti-CD133, anti-CD117 (c-kit), y anti-CD138 y anti-PSMA scFv. Los ejemplos de ligandos polipeptídicos que se

5 pueden usar para dirigir híbridos VSV/CDV incluyen, entre otros, polipéptidos uPA del activador del plasminógeno de urocinasa, citocinas como IL-13 o IL-6, receptores de células T de cadena única (scTCR), polipéptidos de equistatina, células madre (SCF), EGF y polipéptidos de unión a integrina.

En algunos casos, un híbrido VSV/CDV proporcionado en este documento puede tener

10 una molécula de ácido nucleico que incluye una secuencia que codifica un polipéptido de interferón (IFN) (p. ej., un polipéptido de IFN- β humano), un polipéptido simportador de yoduro de sodio (NIS) (p. ej., un polipéptido NIS humano), un polipéptido fluorescente (p. ej., un polipéptido GFP), cualquier transgén terapéutico apropiado (p. ej., HSV-TK o citosina desaminasa), polipéptido que antagoniza la inmunidad del huésped (p. ej., influenza NS1,

15 HSV γ 34.5 o SOCS1), o antígeno tumoral (p. ej., componentes de vacunas contra el cáncer). El ácido nucleico que codifica el polipéptido IFN se puede colocar entre el ácido nucleico que codifica el polipéptido VSV M y el ácido nucleico que codifica el polipéptido VSV L. Tal posición puede permitir que los virus expresen una cantidad del polipéptido IFN que es eficaz para activar respuestas inmunitarias innatas antivirales en tejidos no cancerosos y, por lo tanto, aliviar la

20 toxicidad viral potencial, sin impedir la replicación viral eficiente en las células cancerosas. El ácido nucleico que codifica el polipéptido NIS se puede colocar entre el ácido nucleico que codifica el polipéptido VSV M y el polipéptido VSV L. Tal posición puede permitir que los virus expresen una cantidad del polipéptido NIS que (a) es eficaz para permitir la acumulación selectiva de yoduro en las células infectadas, lo que permite obtener imágenes de la distribución viral

25 usando radioisótopos y radioterapia dirigida a las células cancerosas infectadas, y (b) no es tan alto como para ser tóxico para las células infectadas. Colocar el ácido nucleico que codifica un polipéptido IFN entre el ácido nucleico que codifica el polipéptido VSV M y el ácido nucleico que codifica el polipéptido VSV L y colocar el ácido nucleico que codifica un polipéptido NIS entre el ácido nucleico que codifica el polipéptido VSV M y el polipéptido VSV L dentro el genoma de un

30 VSV puede dar como resultado VSV que son viables, que tienen la capacidad de replicarse y

propagarse, que expresan niveles apropiados de polipéptidos IFN funcionales, y que expresan niveles apropiados de polipéptidos NIS funcionales para absorber yodo radiactivo tanto para formación de imágenes como para radioterapia.

En general, un aspecto de este documento presenta un polipéptido CDV F que tiene una
5 secuencia de péptido señal que tiene menos de 75 residuos de aminoácidos de longitud. La secuencia del péptido señal puede comprender no más de 75 residuos de aminoácidos de la ID SEC N.º:6. El polipéptido CDV F puede comprender la ID SEC N.º: 4 con la condición de que el polipéptido CDV F carezca de al menos los residuos de aminoácidos 1 a 60 o carezca de al menos los residuos de aminoácidos 1 a 105 de la ID SEC N.º: 4. Un virus recombinante que
10 comprende el polipéptido CDV F y un polipéptido CDV H puede mostrar una mayor actividad fusogénica en comparación con un virus recombinante de control comparable que comprende un polipéptido CDV F de tipo salvaje de longitud completa y el polipéptido CDV H.

En otra realización, este documento presenta una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido CDV F. El polipéptido CDV F puede tener una secuencia de péptido señal
15 que tiene menos de 75 residuos de aminoácidos de longitud. La secuencia del péptido señal puede comprender no más de 75 residuos de aminoácidos de la ID SEC N.º:6. El polipéptido CDV F puede comprender la ID SEC N.º: 4 con la condición de que el polipéptido CDV F carezca de al menos los residuos de aminoácidos 1 a 60 o carezca de al menos los residuos de aminoácidos 1 a 105 de la ID SEC N.º: 4. Un virus recombinante que comprende el polipéptido
20 CDV F y un polipéptido CDV H puede mostrar una mayor actividad fusogénica en comparación con un virus recombinante de control comparable que comprende un polipéptido CDV F de tipo salvaje de longitud completa y el polipéptido CDV H.

En otra realización, este documento presenta un virus recombinante que comprende un polipéptido CDV F. El polipéptido CDV F puede tener una secuencia de péptido señal que tiene
25 menos de 75 residuos de aminoácidos de longitud. La secuencia del péptido señal puede comprender no más de 75 residuos de aminoácidos de la ID SEC N.º:6. El polipéptido CDV F puede comprender la ID SEC N.º: 4 con la condición de que el polipéptido CDV F carezca de al menos los residuos de aminoácidos 1 a 60 o carezca de al menos los residuos de aminoácidos 1 a 105 de la ID SEC N.º: 4. Un virus recombinante que comprende el polipéptido CDV F y un
30 polipéptido CDV H puede mostrar una mayor actividad fusogénica en comparación con un virus recombinante de control comparable que comprende un polipéptido CDV F de tipo salvaje de longitud completa y el polipéptido CDV H.

En otra realización, este documento presenta un virus recombinante que comprende una molécula de ácido nucleico. La molécula de ácido nucleico puede codificar un polipéptido CDV F. El polipéptido CDV F puede tener una secuencia de péptido señal que tiene menos de 75 residuos de aminoácidos de longitud. La secuencia del péptido señal puede comprender no más de 75 residuos de aminoácidos de la ID SEC N.º:6. El polipéptido CDV F puede comprender la ID SEC N.º: 4 con la condición de que el polipéptido CDV F carezca de al menos los residuos de aminoácidos 1 a 60 o carezca de al menos los residuos de aminoácidos 1 a 105 de la ID SEC N.º: 4. Un virus recombinante que comprende el polipéptido CDV F y un polipéptido CDV H puede mostrar una mayor actividad fusogénica en comparación con un virus recombinante de control comparable que comprende un polipéptido CDV F de tipo salvaje de longitud completa y el polipéptido CDV H.

En otra realización, este documento presenta un polipéptido CDV H que comprende 454A, 464A, 479A, 494A, 510A, 520A, 525A, 526A, 527S, 528A, 529A, 537A, 539A, 547A, 548A, o una combinación de los mismos según el amino numeración ácida de la ID SEC N.º:2. El polipéptido CDV H puede comprender una combinación de dos, tres, cuatro, cinco o seis de 454A, 464A, 479A, 494A, 510A, 520A, 525A, 526A, 527S, 528A, 529A, 537A, 539A, 547A y 548A.. El polipéptido CDV H puede comprender una combinación de siete, ocho, nueve, diez u once de 454A, 464A, 479A, 494A, 510A, 520A, 525A, 526A, 527S, 528A, 529A, 537A, 539A, 547A y 548A. El polipéptido CDV H puede comprender una combinación de 12, 13 o 14 de 454A, 464A, 479A, 494A, 510A, 520A, 525A, 526A, 527S, 528A, 529A, 537A, 539A, 547A y 548A. El polipéptido CDV H puede comprender 454A, 464A, 479A, 494A, 510A, 520A, 525A, 526A, 527S, 528A, 529A, 537A, 539A, 547A y 548A. El polipéptido CDV H puede comprender M437 según la numeración de aminoácidos de la ID SEC N.º:5.

En otra realización, este documento presenta un polipéptido CDV H que comprende la secuencia establecida en la Figura 11 excepto que la secuencia comprende una mutación de un residuo de aminoácido presentado seleccionado del grupo que consiste en P454, V/L/F460, L/F/W479, I494, I/L/V510, Y520, Y/N525, D/G526, I/V527, S/T528, R529, Y/D537, Y539, Y/F547 y T/M548 según la numeración de aminoácidos de la ID SEC N.º:5. El polipéptido CDV H puede comprender una mutación de dos, tres, cuatro, cinco o seis residuos de aminoácidos presentados seleccionados del grupo. El polipéptido CDV H puede comprender una mutación de siete, ocho, nueve, diez u once residuos de aminoácidos seleccionados del grupo.

El polipéptido CDV H puede comprender una mutación de 12, 13 ó 14 residuos de aminoácidos presentados seleccionados del grupo. El polipéptido CDV H puede comprender una mutación de los residuos de aminoácidos del grupo presentados. El polipéptido CDV H puede comprender M437 según la numeración de aminoácidos de la ID SEC N.º:5.

5 En otra realización, este documento presenta una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido CDV H. El polipéptido CDV H puede comprender la secuencia establecida en la Figura 11 excepto que la secuencia comprende una mutación de un residuo de aminoácido presentado seleccionado del grupo que consiste en P454, V/L/F460, L/F/W479, I494, I/ L/V510, Y520, Y/N525, D/G526, I/V527, S/T528, R529, Y/D537, Y539, Y/F547 y T/M548 según la
10 numeración de aminoácidos de la ID SEC N.º:5. El polipéptido CDV H puede comprender una mutación de dos, tres, cuatro, cinco o seis residuos de aminoácidos presentados seleccionados del grupo. El polipéptido CDV H puede comprender una mutación de siete, ocho, nueve, diez u once residuos de aminoácidos seleccionados del grupo. El polipéptido CDV H puede comprender una mutación de 12, 13 ó 14 residuos de aminoácidos presentados seleccionados del grupo. El
15 polipéptido CDV H puede comprender una mutación de los residuos de aminoácidos del grupo presentados. El polipéptido CDV H puede comprender M437 según la numeración de aminoácidos de la ID SEC N.º:5.

En otra realización, este documento presenta un virus recombinante que comprende un polipéptido CDV H. El polipéptido CDV H que comprende la secuencia establecida en la Figura
20 11 excepto que la secuencia comprende una mutación de un residuo de aminoácido presentado seleccionado del grupo que consiste en P454, V/L/F460, L/F/W479, I494, I/L /V510, Y520, Y/N525, D/G526, I/V527, S/T528, R529, Y/D537, Y539, Y/F547 y T/M548 según la numeración de aminoácidos de la ID SEC N.º:5. El polipéptido CDV H puede comprender una mutación de dos, tres, cuatro, cinco o seis residuos de aminoácidos presentados seleccionados del grupo. El
25 polipéptido CDV H puede comprender una mutación de siete, ocho, nueve, diez u once residuos de aminoácidos seleccionados del grupo. El polipéptido CDV H puede comprender una mutación de 12, 13 ó 14 residuos de aminoácidos presentados seleccionados del grupo. El polipéptido CDV H puede comprender una mutación de los residuos de aminoácidos del grupo presentados. El polipéptido CDV H puede comprender M437 según la numeración de aminoácidos de la ID
30 SEC N.º:5. El virus puede comprender un polipéptido CDV F, en el que el polipéptido CDV F comprende una secuencia de péptido señal que tiene menos de 75 residuos de aminoácidos de longitud.

La secuencia del péptido señal puede comprender no más de 75 residuos de aminoácidos de la ID SEC N.º:6. El polipéptido CDV F puede comprender la ID SEC N.º: 4 con la condición de que el polipéptido CDV F carezca de al menos los residuos de aminoácidos 1 a 60 o carezca de al menos los residuos de aminoácidos 1 a 105 de la ID SEC N.º: 4. Un virus recombinante que comprende el polipéptido CDV F y un polipéptido CDV H puede mostrar una mayor actividad fusogénica en comparación con un virus recombinante de control comparable que comprende un polipéptido CDV F de tipo salvaje de longitud completa y el polipéptido CDV H.

En otra realización, este documento presenta un virus recombinante que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido H de CDV. El polipéptido CDV H puede comprender la secuencia establecida en la Figura 11 excepto que la secuencia comprende una mutación de un residuo de aminoácido presentado seleccionado del grupo que consiste en P454, V/L/F460, L/F/W479, I494, I/ L/V510, Y520, Y/N525, D/G526, I/V527, S/T528, R529, Y/D537, Y539, Y/F547 y T/M548 según la numeración de aminoácidos de la ID SEC N.º:5. El polipéptido CDV H puede comprender una mutación de dos, tres, cuatro, cinco o seis residuos de aminoácidos presentados seleccionados del grupo. El polipéptido CDV H puede comprender una mutación de siete, ocho, nueve, diez u once residuos de aminoácidos seleccionados del grupo. El polipéptido CDV H puede comprender una mutación de 12, 13 ó 14 residuos de aminoácidos presentados seleccionados del grupo. El polipéptido CDV H puede comprender una mutación de los residuos de aminoácidos del grupo presentados. El polipéptido CDV H puede comprender M437 según la numeración de aminoácidos de la ID SEC N.º:5. El virus puede comprender una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido CDV F. El polipéptido CDV F puede tener una secuencia de péptido señal que tiene menos de 75 residuos de aminoácidos de longitud. La secuencia del péptido señal puede comprender no más de 75 residuos de aminoácidos de la ID SEC N.º:6. El polipéptido CDV F puede comprender la ID SEC N.º: 4 con la condición de que el polipéptido CDV F carezca de al menos los residuos de aminoácidos 1 a 60 o carezca de al menos los residuos de aminoácidos 1 a 105 de la ID SEC N.º: 4. Un virus recombinante que comprende el polipéptido CDV F y un polipéptido CDV H puede mostrar una mayor actividad fusogénica en comparación con un virus recombinante de control comparable que comprende un polipéptido CDV F de tipo salvaje de longitud completa y el polipéptido CDV H.

En otra realización, este documento presenta un virus recombinante descrito en este documento que es un virus híbrido de (a) CDV y (b) VSV, MeV o Adenovirus.

En otra realización, este documento presenta un virus de estomatitis vesicular con capacidad de replicación que comprende una molécula de ARN, en el que la molécula de ARN comprende una secuencia de ácido nucleico que es una plantilla para un transcrito de sentido positivo que codifica un polipéptido VSV N, una secuencia de ácido nucleico que es un molde para un transcrito de sentido positivo que codifica un polipéptido VSV P, una secuencia de ácido nucleico que es un molde para un transcrito de sentido positivo que codifica un polipéptido VSV M, una secuencia de ácido nucleico que es un molde para un transcrito de sentido positivo que codifica un polipéptido CDV F, una secuencia de ácido nucleico que es un molde para un transcrito de sentido positivo que codifica un polipéptido CDV H, y una secuencia de ácido nucleico que es un molde para un transcrito de sentido positivo que codifica un polipéptido VSV L, donde la molécula de ARN carece de una secuencia de ácido nucleico que es una plantilla para un transcrito de sentido positivo que codifica un polipéptido G de VSV funcional. El polipéptido CDV F puede tener una secuencia de péptido señal que tiene menos de 75 residuos de aminoácidos de longitud. La secuencia del péptido señal puede comprender no más de 75 residuos de aminoácidos de la ID SEC N.º:6. El polipéptido CDV F puede comprender la ID SEC N.º: 4 con la condición de que el polipéptido CDV F carezca de al menos los residuos de aminoácidos 1 a 60 o carezca de al menos los residuos de aminoácidos 1 a 105 de la ID SEC N.º: 4. Un virus recombinante que comprende el polipéptido CDV F y un polipéptido CDV H puede mostrar una mayor actividad fusogénica en comparación con un virus recombinante de control comparable que comprende un polipéptido CDV F de tipo salvaje de longitud completa y el polipéptido CDV H. El polipéptido CDV H puede ser un polipéptido CDV H descrito en uno de los párrafos anteriores. El polipéptido CDV H puede comprender una secuencia de aminoácidos de un anticuerpo de cadena sencilla. El anticuerpo monocatenario puede ser un anticuerpo monocatenario dirigido contra CD19, CD20, CD38, CD46, EGFR, α FR, HER2/neu o PSMA. La molécula de ARN puede comprender una secuencia de ácido nucleico que es un molde para un transcrito de sentido positivo que codifica un polipéptido NIS.

En otra realización, este documento presenta una composición que comprende un virus de cualquiera de los párrafos anteriores.

En otra realización, este documento presenta una molécula de ácido nucleico que comprende una hebra de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que es un molde para un transcrito de sentido positivo que codifica un polipéptido VSV N, una secuencia de ácido nucleico que es un molde para un transcrito de sentido positivo que codifica un polipéptido VSV P, una secuencia de ácido nucleico que es un molde para un transcrito de

sentido positivo que codifica un polipéptido VSV M, una secuencia de ácido nucleico que es un molde para un transcrito de sentido positivo que codifica un polipéptido CDV F, una secuencia de ácido nucleico que es un molde para un transcrito de sentido positivo que codifica un polipéptido CDV H, y una secuencia de ácido nucleico que es un molde para un transcrito de sentido positivo que codifica un polipéptido VSV L, en el que la hebra de ácido nucleico carece de una secuencia de ácido nucleico que es un molde para un sentido positivo transcrito que codifica un polipéptido VSV G funcional. El polipéptido CDV F puede tener una secuencia de péptido señal que tiene menos de 75 residuos de aminoácidos de longitud. La secuencia del péptido señal puede comprender no más de 75 residuos de aminoácidos de la ID SEC N.º:6. El polipéptido CDV F puede comprender la ID SEC N.º: 4 con la condición de que el polipéptido CDV F carezca de al menos los residuos de aminoácidos 1 a 60 o carezca de al menos los residuos de aminoácidos 1 a 105 de la ID SEC N.º: 4. Un virus recombinante que comprende el polipéptido CDV F y un polipéptido CDV H puede mostrar una mayor actividad fusogénica en comparación con un virus recombinante de control comparable que comprende un polipéptido CDV F de tipo salvaje de longitud completa y el polipéptido CDV H. El polipéptido CDV H puede ser un polipéptido CDV H descrito en uno de los párrafos anteriores. El polipéptido CDV H puede comprender una secuencia de aminoácidos de un anticuerpo de cadena sencilla. El anticuerpo monocatenario puede ser un anticuerpo monocatenario dirigido contra CD19, CD20, CD38, CD46, EGFR, α FR, HER2/neu o PSMA. La molécula de ARN puede comprender una secuencia de ácido nucleico que es un molde para un transcrito de sentido positivo que codifica un polipéptido NIS.

En otra realización, este documento presenta una composición que comprende una molécula de ácido nucleico de cualquiera de los párrafos anteriores.

En otra realización, este documento presenta un método para tratar el cáncer. El método comprende administrar una composición descrita en el presente documento (p. ej., una composición que contiene un virus descrito en el presente documento) a un mamífero que comprende células cancerosas, donde el número de células cancerosas dentro del mamífero se reduce después de la administración. El mamífero puede ser un humano. El cáncer puede ser mieloma, melanoma, glioma, linfoma, mesotelioma, cáncer de pulmón, cáncer de cerebro, cáncer de estómago, cáncer de colon, cáncer de recto, cáncer de riñón, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de mama, cáncer de páncreas, cáncer de hígado o cáncer de cabeza y cáncer de cuello.

En otra realización, este documento presenta un método para inducir la regresión del tumor en un mamífero. El método comprende administrar una composición descrita en el

presente documento (p. ej., una composición que contiene un virus descrito en el presente documento) a un mamífero que comprende un tumor, en el que el tamaño del tumor se reduce después de la administración. El mamífero puede ser un humano. El cáncer puede ser mieloma, melanoma, glioma, linfoma, mesotelioma, cáncer de pulmón, cáncer de cerebro, cáncer de estómago, cáncer de colon, cáncer de recto, cáncer de riñón, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de mama, cáncer de páncreas, cáncer de hígado o cáncer de cabeza y cáncer de cuello

En otra realización, este documento presenta un método para rescatar virus de estomatitis vesicular competentes para la replicación de las células. Los virus de la estomatitis vesicular comprenden una molécula de ARN que comprende una secuencia de ácido nucleico que es un molde para un transcrito de sentido positivo que codifica un polipéptido VSV N, una secuencia de ácido nucleico que es un molde para un transcrito de sentido positivo que codifica un polipéptido VSV P, un ácido nucleico secuencia que es un molde para un transcrito de sentido positivo que codifica un polipéptido VSV M, una secuencia de ácido nucleico que es un molde para un transcrito de sentido positivo que codifica un polipéptido CDV F, una secuencia de ácido nucleico que es un molde para un transcrito de sentido positivo que codifica un polipéptido CDV H y una secuencia de ácido nucleico que es un molde para un transcrito de sentido positivo que codifica un polipéptido VSV L, en el que la molécula de ARN carece de una secuencia de ácido nucleico que es un molde para un transcrito de sentido positivo que codifica un polipéptido VSV G funcional. El método comprende (a) insertar ácido nucleico que codifica la molécula de ARN en las células en condiciones en las que se producen virus de estomatitis vesicular con capacidad de replicación, y (b) recolectar los virus de estomatitis vesicular con capacidad de replicación.

A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que entienden comúnmente los expertos en la técnica a la que se refiere esta invención. Aunque se pueden usar métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos aquí para poner en práctica la invención, a continuación, se describen métodos y materiales adecuados. Todas las publicaciones, solicitudes de patentes, patentes y otras referencias mencionadas en este documento se incorporan como referencia en su totalidad. En caso de conflicto, prevalecerá la presente especificación, incluidas las definiciones. Además, los materiales, métodos y ejemplos son solo ilustrativos y no pretenden ser limitativos.

Los detalles de una o más realizaciones de la invención se exponen en los dibujos adjuntos y en la descripción que sigue. Otras características, objetos y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la descripción y los dibujos, así como de las reivindicaciones.

5

DESCRIPCIÓN DE DIBUJOS

Figura 1. Análisis filogenético molecular por método de Máxima Verosimilitud del gen de la hemaglutinina de los genotipos del CDV. El árbol se infirió usando el método de Máxima Verosimilitud basado en el modelo General Time Reversible. El análisis involucró 119 secuencias completas de nucleótidos de CDV H. Las cepas 22458/15 y 5804 se clasificaron como genotipos Artic-like y Europe-1/South America 1, respectivamente. Los análisis evolutivos se realizaron en MEGA7.

Figura 2. Generación de complejos CDV H/F para la fusión de células dirigidas. (A) Ensayo de formación de sincitios: se cotransfectaron monocapas de células Vero y células Vero que expresan polipéptidos Nectin-4 humanos o polipéptidos SLAMF1 de perro con plásmidos de expresión que codifican polipéptidos H y F de CDV₅₈₀₄, CDV_{22458/16} o CDV_{Onderstepoort} (formación de placa grande) (CDV_{OL}) como se indica. La formación de sincitios se registró 24 horas después de la tinción con Giemsa. (B) Las células se transfectaron adicionalmente con un plásmido de expresión de GFP para mejorar la sensibilidad. Se usó DAPI para la tinción de núcleos. (C) Dibujo esquemático de una proteína de unión de morbillivirus expandida del receptor. La proteína de unión al receptor contenía una cola citoplásmica (C), un dominio transmembrana (T) y un ectodominio fusionado con un fragmento variable de cadena única (scFv) específico de CD38 seguido de una etiqueta His. (D) Expresión superficial de proteínas de unión de morbillivirus expandidas del receptor. Las células HEK293T se transfectaron con las proteínas de unión indicadas redirigidas contra el receptor CD38 y la expresión superficial se analizó mediante FACS utilizando un anticuerpo anti-HIS conjugado con PE. (E) Representación esquemática del ensayo de fusión cuantitativo basado en el ensayo de luciferasa dividida autoasociada. Las células efectoras se transfectaron con plásmidos que codifican los polipéptidos H y F y plásmidos que codifican la mitad de la renilla luciferasa (RL) y las proteínas de fluorescencia verde (GFP). Las células diana, que portaban los receptores, se transfectaron con plásmidos que codificaban la otra mitad de los genes indicadores de división dual y se mezclaron con las células efectoras. Al mezclar el contenido, las mitades de los genes informadores que de otro modo no serían funcionales reconstituyen la actividad enzimática, que se midió en tiempo real. (F) Actividad de fusión dirigida a células de proteínas de unión de

morbillivirus expandidas del receptor CD38. Las células efectoras se cotransfectaron con los pares de polipéptidos de unión/fusión indicados. Después del cocultivo con las células diana, se registró la señal de luminiscencia. Los valores y las barras de error (SD) fueron de un experimento representativo realizado al menos por triplicado. Cabe destacar que el péptido señal CDV F se reemplazó con la forma homóloga de MEV (MeV SP). La significación estadística se calculó mediante ANOVA de dos vías con la prueba de comparación múltiple de Turquía. *, $p < 0.02$; ***, $p < 0.0005$; ****, $p < 0.0001$. (G) Integridad de los polipéptidos CDV H. Las células HEK293T se transfectaron con los polipéptidos CDV H indicados y los lisados celulares se inmunotransfirieron con anticuerpos anti-HIS (CDV H) o anti- α -actina (control de carga). (H) Fusión dirigida a células de complejos H/F redirigidos. La fusión celular se determinó como se describe en (C). Las células efectoras se cotransfectaron con los pares redirigidos a CD38 ciegos al receptor MeV H/F y CDV H₅₈₀₄/F_{22458/16} y se cubrieron con células CHO que expresan receptores relevantes. Los valores y las barras de error (SD) fueron de un experimento representativo realizado al menos por triplicado. (I) Redirigir el complejo CDV H/F a Her2/neu. Se realizó un ensayo de fusión celular utilizando complejos H/F de CDV que presentaban scFv o anticuerpos (ZX) específicos de Her2/neu. Se muestran las afinidades de unión para el ligando mostrado. (J) Relación entre la expresión del receptor y la afinidad de unión al receptor. La actividad de fusión de los polipéptidos CDV H que muestran anticuerpos específicos de Her2/neu con diferentes afinidades se evaluó en líneas celulares positivas para Her2/neu: HT₁₀₈₀ (3.4×10^3 moléculas/célula), Sko3pi (4.19×10^3 moléculas/célula), TET67L (1.5×10^5 moléculas/célula). Las células transfectadas solo con CDV F se usaron como control negativo.

Figura 3. Los complejos H/F del CDV pueden reemplazar las glicoproteínas de la envoltura del virus del sarampión para dar como resultado la entrada dirigida a las células y la resistencia de los anticuerpos contra el virus del sarampión. (A) Expresión en la superficie celular. Las células CHO se transfectaron con el plásmido que expresa el polipéptido H indicado (marcado con HIS) junto con uno de los plásmidos DSP y un plásmido que expresa el polipéptido F (MeV o CDV F_{224568/16}). 24 horas después, se determinó la expresión de H por CELISA con anticuerpos anti-HIS. (B) Las células CHO transfectadas como en (A) se cocultivaron con el derivado de células CHO indicado y se obtuvieron valores de luminiscencia durante un transcurso de tiempo de 9 horas. Los valores y las barras de error (SD) fueron de un experimento representativo realizado al menos por triplicado. (C) Composición proteica del virus del sarampión que codifica complejos CDV H/F dirigidos contra CD46 (scFv A09, Stealth 2.0). Las partículas 1.6E4 TCID₅₀ se sometieron a SDS-PAGE y se inmunotransfirieron con el anticuerpo relevante.

El virus del sarampion se traspasó como control. (D) Cinética de replicación. La cinética de crecimiento del virus Stealth 2.0 se prolonga en Vero y Vero-HIS (multiplicidad de infección (MOI) = 0.03) en los puntos de tiempo indicados. La cinética de crecimiento de MeV en células Vero/hSLAMF1 se incluye con fines comparativos. (E) Ensayo de neutralización. Se realizó un ensayo de neutralización por reducción del foco de fluorescencia con antisueros MeV y CDV. Se preincubaron diferentes diluciones del antisuero durante 1 hora a 37°C con una cantidad fija de virus. A continuación, la mezcla se produjo para infectar células Vero-HIS y la cantidad de virus en los pocillos de control sin que se hayan probado se ajustaron al 100 %. Todas las curvas de neutralización representan la media y la DE de cuatro curvas repetidas que se ejecutan en la misma placa de 96 pocillos. (F) Selectividad de receptor de virus recombinantes. Se infectaron células CHO que expresaron los receptores relevantes con los virus recombinantes a la MOI indicada. La autofluorescencia de GFP se produjo 2 días después.

Figura 4. Actividad oncolítica de MeV quimérico de envoltura dirigida a CD46. A ratones CDB17 SCID se les implantó por vía subcutánea la línea celular de mieloma humano U266.B1. Cuando el volumen del tumor alcanzó los 500 mm³, los ratones se aleatorizaron y se abandonaron sin tratar (control con PBS) o se trataron una vez con 1 x 10⁵ partículas de TCID₅₀ administradas por vía intravenosa. Posteriormente se registraron los volúmenes tumorales (B) y la supervivencia (C).

Figura 5. Esquema de ejemplos de VSV recombinantes según algunas realizaciones. VSV-hIFN β -NIS: VSV Indiana se presentó para expresar interferón beta humano (hIFN β) en la región intergénica M/G y simportador de yoduro de sodio humano (NIS) en la región intergénica G/L y se rescató como se describe en otra parte (Naik *et al.*, *Leucemia*, 26:1870-78 (2012)). Se generaron VSV que expresan CDV-F_{22458/16} (con el péptido señal del polipéptido F de CDV seleccionado por el del polipéptido F de MeV) y CDV-H₅₈₀₄ usando la plataforma pVSV-smart. Se introdujeron cambios puntuales en el polipéptido CDV-H₅₈₀₄, Y539A y R529A, mediante mutagénesis dirigida al sitio para eliminar los tropismos naturales de los polipéptidos caninos Nectin-4 y SLAMF1, respectivamente. Los virus dirigidos se generaron mostrando scFv dirigidos a EGFR o CD38 en el extremo C-terminal de CDV-H₅₈₀₄ con un péptido conector IGES y una etiqueta de polihistidina H6 (ID SEC N.º: 21). Las construcciones de VSV-CDV F/H redirigidas se rescataron en Vero-anti-H6, lo que resultó en la infección, la amplificación del virus y la fusión de las células diana. Se indican los títulos para cada virus recombinante.

Figura 6. Las monocapas de las células CHO indicadas (de tipo salvaje o que sobreexpresan de forma estable los receptores indicados) se infectaron o infectaron de forma simulada ($\text{MOI} = 0.2$) con VSV-CDVFH-GFP o VSV-CDVF/H_{aa}- α EGFR-GFP. Se tomaron micrografías fluorescentes con un aumento de 100X en los tiempos indicados. La expresión de GFP (verde) se correlaciona con la infección por virus y la propagación dentro de las monocapas.

Figura 7. Las monocapas de las células CHO indicadas (receptores EGFR o CD38 de expresión estable o de tipo salvaje) se infectaron ($\text{MOI} = 0.1$) con VSV-CDVFH_{aa}- α EGFR o VSV-CDVFH_{aa}- α CD38. Después de 42 horas, las monocapas celulares se fijaron con paraformaldehído y se tiñeron con cristal violeta. Las fotos fueron tomadas con un aumento de 40X.

Figura 8. Efectos terapéuticos del VSV-CDVFH_{aa}- α EGFR quimérico contra el cáncer de ovario humano xenoinjertado en el peritoneo. A ratones desnudos atímicos hembra de 5-6 semanas de edad (Envigo, Indianápolis, IN) se les implantaron por vía intraperitoneal 2×10^6 células SKOV3ip.1-Fluc (200 μL /ratón) (día -7). 7 días después de la implantación (día 0), los ratones portadores de tumores se aleatorizaron en función de las señales de luciferasa de luciérnaga utilizando el espectro IVIS (Perkin Elmer, Hopkinton, MA). Los ratones fueron identificados por microchip y muesca en la oreja. Después de la aleatorización, los ratones recibieron una dosis única de 1×10^7 TCID₅₀ de control de virus o solución salina (250 μL /ratón) mediante inyección intraperitoneal. Los ratones se sacrificaron si desarrollaron ascitis, tumores subcutáneos en el lugar de la inyección que eran $>10\%$ del peso corporal o si perdieron $>20\%$ del peso corporal. Todos los ratones supervivientes fueron sacrificados al final del experimento (día 92 después del tratamiento con virus). Las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier se trazaron y compararon mediante la prueba de suma de rangos logarítmicos. Las observaciones clínicas y el peso se registraron tres veces por semana hasta el final del estudio o la eutanasia del ratón.

La Figura 9 es una secuencia de ácido nucleico (ID SEC N.º: 1) de un marco de lectura abierto de CDV H que codifica un polipéptido de CDV H (ID SEC N.º: 2).

La Figura 10 es una secuencia de ácido nucleico (ID SEC N.º: 3) de un marco de lectura abierto de CDV F que codifica un polipéptido CDV F (ID SEC N.º: 4).

Figura 11. Redirección de la envoltura de CDV de tipo salvaje a EGFR y CD38. (A) Representación esquemática de la estrategia de clonación para generar polipéptidos de CDV H de tipo salvaje redirigidos (arriba). Se utilizan abreviaturas estándar de aminoácidos de una letra para indicar los cambios introducidos para eliminar el uso del receptor nativo (SLAMF1 y Nectin-4) (abajo).

La numeración de aminoácidos es con respecto a la ID SEC N.º:5. Los fragmentos de anticuerpos monocatenarios se muestran como una extensión C-terminal de la glicoproteína H utilizando un sitio de escisión del Factor Xa (Fxa) (una secuencia de aminoácidos IEGR). Hay una etiqueta opcional de seis histidinas (ID SEC N.º: 21) en todas las construcciones para facilitar el rescate

- 5 del virus en células Vero-His. (B) Experimentos de cotransfección que demuestran la competencia de fusión dirigida del polipéptido H ciego al receptor dirigido a CD38. Células CHO-CD38 en placas de 12 pocillos se cotransfectaron con plásmido CDV F controlado por CMV y CDV H-CD38 de tipo salvaje controlado por CMV o CDV H-CD38 ciego controlado por receptor controlado por CMV, y las células se fijaron, tiñeron y tomaron imágenes 24 horas después. (C)
- 10 La fusión de células dirigidas mediada por construcciones de CDV H fue resistente al suero humano inmune al sarampión combinado. Las células CHO-CD38 se cotransfectaron con plásmidos H y F controlados por CMV junto con un plásmido GFP controlado por CMV para su visualización y se incubaron con las diluciones indicadas. Las células se fotografiaron 24 horas después de la transfección. (D) Los virus del sarampión quiméricos que llevan polipéptidos CDV
- 15 H dirigidos conservan la especificidad en un panel de células CHO que expresan los receptores deseados o líneas de células tumorales humanas con el receptor deseado. Las líneas celulares se infectaron con los respectivos virus a una MOI de 0.5 y se tomaron fotografías 48 horas más tarde. (E) Diseño esquemático del experimento para probar la eficacia oncolítica y la especificidad in vivo de los virus del sarampión quiméricos con envoltura de CDV redirigida. A
- 20 los ratones desnudos se les implantaron 5×10^6 células SKOV3ip-fluc por vía subcutánea (SQ) o intraperitoneal (IP) seguidas de 6 dosis de 1×10^6 TCID₅₀/mL por vía intratumoral (IT) para tumores subcutáneos o 2×10^6 TCID₅₀/mL IP para tumores IP cada dos días a partir del día 10. (F) Volúmenes de tumores individuales de tumores SKOV3ip subcutáneos tratados con los respectivos virus (arriba) y supervivencia de animales con tumores intraperitoneales tratados con
- 25 los respectivos virus (abajo).

La figura 12 es una alineación de un número representativo de polipéptidos CDV H. La secuencia superior (designada como AF378705.1_America1) es ID SEC N.º:5 y se usa con fines de numeración donde se indica. La figura 12 describe las ID SEC N.º 5, 31-109, 105, 110-145 y 227-228, respectivamente, en orden de aparición.

- 30 La Figura 13 es una alineación de un número representativo de polipéptidos CDV F. La secuencia del péptido señal se extiende desde la posición de aminoácido 1 hasta la posición de aminoácido 135. La secuencia superior (designada como AF378705.1_America1) es ID SEC N.º:7 y se usa con fines de numeración cuando se indica. La figura 13 describe las ID SEC N.º 7 y 146-226,

respectivamente, en orden de aparición.

Figura 14. CDV OL puede infectar células que carecen de receptores SLAMF1 y NECTIN4. (A) Evaluación de la infección de células Vero por aislamientos de CDV en comparación con la cepa OL. Las células se infectaron a una MOI de 0.1 (determinada en células Vero-dogSLAMF1) y se tiñeron con Hema-Quick 48 horas más tarde para su visualización. (B) Un panel de células CHO que expresan diferentes receptores relevantes se infectó con un indicador MeV de eGFP que comprende las glicoproteínas CDV H/F OL. La infectividad se informó usando un microscopio de fluorescencia. Aumento 40X.

Figura 15. La combinación heteróloga de CDV H/F de tipo salvaje con un péptido señal acortado da como resultado una fusión dependiente del receptor mejorada debido a una interacción H-F más débil. (A) Formación de sincitios en células cotransfectadas con CDV-F, CDV-H y eGFP. Los péptidos señal de CDV-F se reemplazaron con el homólogo de MeV-F, como indican los recuadros negros en el esquema. Veinticuatro horas después de la cotransfección, se evaluó la puntuación de fusión bajo el canal GFP. (B) Ensayo de fusión cuantitativa. Las células efectoras BHK se transfectaron con la combinación indicada de proteínas de unión (CDV-H o Nipah-G) y de fusión (F) más uno de los plásmidos indicadores de doble división. Las células CHO diana y las células CHO que expresan CD38 (CHO-CD38) se transfectaron con los otros plásmidos indicadores de doble división. 16 horas después de la transfección, se superpusieron células y se determinó la actividad de luciferasa de Renilla (RLU) 8 horas más tarde. Los valores representan la media $\pm$ desviación estándar (SD) de un experimento representativo realizado por triplicado. La significación estadística se determinó mediante ANOVA de una vía con la prueba de comparación múltiple de Holm-Sidak (ns, no significativa *, $p < 0.05$; **, $p < 0.002$; ***, $p < 0.0001$). (C) Coinmunoprecipitación de CDV-H/F. Las células HEK293T que expresan transitoriamente proteínas CDV-H etiquetadas con HIS wt o mutantes junto con proteínas CDV-F etiquetadas con FLAG se lisaron e inmunoprecipitaron (IP) con un anticuerpo anti-FLAG. La intensidad de la señal se determinó utilizando un anticuerpo anti-HIS. (D) Ensayo de fusión cuantitativa de proteínas CDV-H y MeV-H totalmente redirigidas en células CHO y derivados de células CHO. Los complejos MeV-H/F y CDV-H/F marcados con HIS o marcados con HIS y redirigidos con CD38 se transfectaron en células efectoras y se determinó la señal de luminiscencia a lo largo del tiempo. MeV-Haals = MeV-H enmascarado para CD46, NECTIN-4 y SLAMF1 mediante mutaciones Y481A, R533A, S548L y F549S.

Figura 16. Conservación del residuo de aminoácido M437 en la proteína CDV-H entre diferentes grupos genéticos. La alineación de secuencias se realizó con secuencias de CDV-H recuperadas de GenBank, incluida la secuencia de CDV-H determinada aquí para el aislado SPA.Madrid/22458/16. Se indican los números de acceso.

Figura 17. Integridad y expresión de proteínas de unión al receptor que presentan ligandos quiméricos. (A) Análisis de transferencia Western de células HEK293T transfectadas con las proteínas indicadas fusionadas con un scFv anti-CD38 o no. Las proteínas se transfirieron con un anticuerpo anti-HIS o un anticuerpo anti- β -actina (control de carga). (B) Expresión proteica de las proteínas de unión y mutantes en células HEK293T fijadas con o sin permeabilización analizadas por citometría de flujo. Los histogramas son de un experimento representativo de dos réplicas biológicas. La intensidad media geométrica $\pm$ DE de dos réplicas biológicas se muestra en la esquina superior derecha de cada histograma. Las curvas rellenas indican células transfectadas con plásmidos vacíos.

Figura 18. Inserción de la etiqueta FLAG en el ectodominio F y su efecto sobre la biorreactividad de la proteína. (A) Dibujos esquemáticos de MeV-F y CDV-F sin escindir. Se indican los extremos NH₂ y COOH, el péptido señal (SP), el péptido de fusión (FP) y las regiones transmembrana (TM) y citoplásmica. Se muestran la secuencia que rodea el sitio de escisión (en negrita) y la del péptido de fusión. La numeración considera los péptidos señal homotípicos. (B) Formación de sincitios en células Vero después de la cotransfección de plásmidos de expresión homólogos de H y F con inserciones de FLAG en diferentes posiciones. Las células se tiñeron 16 horas después de la transfección y se adquirieron microfotografías para la cuantificación. (C) Cuantificación de la formación de sincitios. Los datos se muestran como la media $\pm$ DE (n=20). La significación se determinó mediante ANOVA unidireccional con la prueba de comparación múltiple de Holm-Sidak (ns, no significativa; ***, $p \leq 0.001$). (D) Ensayo de fusión de proteína de doble división para la cotransfección de CDV-H/F SPA con o sin inserción de etiqueta FLAG en el aminoácido 216. La señal de luciferasa se midió a las 8 horas. El experimento se realizó en duplicados técnicos.

Figura 19. Especificidad CD46 de scFvs. (A) Análisis SDS-PAGE de proteínas diana. PM: escalera de pesos moleculares, C: tinción de Coomassie; WB: análisis de transferencia Western utilizando un anticuerpo anti-CD46.

(B) Traza de cromatografía de exclusión por tamaño para el CD46 utilizado en los experimentos. Se indica el MW estimado a partir de una curva de calibración. (C) Unión de proteínas de fusión marcadas con scFv-Fc a CD46 o NECTIN4 según lo determinado por ELISA. La detección se realizó con la porción Fc utilizada como control de la cantidad de proteína. Los experimentos se realizaron en duplicados técnicos. Los datos se muestran como la media $\pm$ DE (n=2). La significación se determinó mediante ANOVA unidireccional con la prueba de comparación múltiple de Holm-Sidak. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.005$.

Figura 20. La afinidad de unión a CD46 del scFv mostrado determina la fusión de célula a célula dependiente de CD46 del complejo CDV H/F redirigido. (A) Sensograma representativo (en unidades de resonancia, RU) para la unión de CD46 a las superficies del biosensor que contienen (línea continua) o carecen (línea discontinua) de fragmentos de anticuerpos monocatenarios (scFv). Los datos experimentales representan la inyección durante 300 s de scFv K2 seguida de una inyección de tampón. Posteriormente, se hizo volar 1 μ M de CD46 sobre ambas superficies del biosensor y se registró la señal durante (asociación) y después de la inyección (disociación). Las superficies finalmente se regeneraron al final del ciclo como se describe en este documento. (B) Unión de CD46 a scFv evaluada por resonancia de plasmón superficial. Sensogramas que muestran las unidades de respuesta (líneas negras) de varias concentraciones de CD46 a los scFvs. El modelo de encuadernación 1:1 de mejor ajuste se muestra como líneas rojas discontinuas. La afinidad de unión (K_d) se determinó a partir de las tasas de asociación y disociación (Tabla 1). (C) Ensayo de fusión cuantitativa para las variantes MeV-H y CDV-H en células CHO. El experimento se realizó por duplicado y se repitió dos veces con resultados similares (ver Figura 21). Los datos se muestran como la media $\pm$ SD.

Figura 21. La afinidad de unión del scFv mostrado en el complejo CDV-H/F impulsa la fusión célula-célula mejorada. (A) Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas celulares (CELISA) para la cantidad de proteína celular utilizada en el ensayo de fusión cuantitativo en la Figura 20C. Se realizó un CELISA en células CHO transfectadas con la proteína de unión indicada usando un anticuerpo monoclonal anti-6x HIS-tag (n=5). (B) Ensayo de fusión cuantitativa para el complejo CDV-H/F redirigido a CD46 utilizando scFv sintonizados por afinidad (los mismos datos que se presentan en la Figura 20C). Y539A indica la sustitución en CDV-H para suprimir el tropismo natural por NECTIN4.

Figura 22. Las glicoproteínas de la cubierta del CDV redirigidas a CD46 determinan el tropismo del virus. (A) Representación esquemática de Stealth: un virus del sarampión derivado de la vacuna seudotipado con proteínas de envoltura CDV H/F redirigidas a CD46. Creado con BioRender.com. (B) Papel de la afinidad de unión a CD46 en la entrada del virus. Las células se infectaron a la MOI indicada con virus Stealth que mostraban scFv con diferente afinidad por CD46. La expresión de eGFP se controló 48 h después de la infección. (C) Las células CHO y los derivados que expresan el pseudorreceptor HIS o CD46 se infectaron con virus Stealth que expresan Fluc (K1 y A09) a una MOI de 0.5. La expresión de luciferasa se midió 48 horas después de la infección. $n = 2$ excepto para CHO-CD46, *, valor de $p < 0.05$ (prueba t de dos colas), (D) Cinética de crecimiento de varios pasos de Stealth-A09 en células Vero o Vero- α HIS. En el momento indicado, se recogieron tanto el sobrenadante como el sedimento celular y se determinaron los títulos de virus en células Vero- α HIS. Se determinaron los valores y las barras de error (SD) para un experimento representativo realizado por triplicado. (E) Composición proteica de los virus. El análisis de transferencia Western se determinó con cantidades similares de partículas de virus y se probó con los anticuerpos relevantes. Se indica el peso molecular del patrón. (F) Tropismo viral. Los derivados de células CHO se infectaron con los virus que expresan eGFP como se indica. La autofluorescencia de eGFP se determinó 48 horas después. Barra de escala, 200 μ m. (G) Estabilidad genética de Stealth. Las células Vero-hSLAMF1 se infectaron con Stealth y se pasaron varias veces. Después de 8 pases, el virus recuperado se usó para infectar células Vero que expresaban SLAMF1 humano o canino. Se muestran microfotografías representativas después de la infección durante tres o seis días.

Figura 23. Evaluación de las interacciones del receptor para el complejo del aparato de fusión de CDV diseñado. Las células se cotransfectaron con MeV-F y MeV-H o variantes redirigidas de CDV-F y CDV-H con un scFv específico de CD46. Con fines de visualización, se cotransfectó un plásmido de expresión que codifica eGFP y se visualizó la autofluorescencia de eGFP 24 horas después de la transfección. Y539A indica la sustitución en CDV-H para suprimir el tropismo natural por NECTIN4. Se utilizaron los símbolos “+” y “-” para la semicuantificación (igual que se presenta en la Figura 15A). “No mostrar” indica que no hay scFv.

Figura 24. La alta afinidad de unión a CD46 gobierna la actividad oncolítica del virus Stealth dirigido a CD46 en un modelo de ratón de cáncer de ovario. (A) Esquema de estudio del diseño experimental. Las células tumorales SKOV3ip.1 que codifican el gen de la luciferasa de luciérnaga (SKOV3ip.Fluc) se implantaron por vía intraperitoneal en ratones atímicos.

En el día 10, se administraron 1×10^6 partículas de TCID₅₀ de Stealth siguiendo la misma ruta. A continuación, se controló la carga tumoral a intervalos de 7 días mediante formación de imágenes por bioluminiscencia (BLI). (B) Curvas de supervivencia de Kaplan de ratones portadores de SKOV3ip.Fluc tratados con los virus Stealth-N1E y Stealth-A09 (n=5). Significación estadística definida por la prueba de rango largo. (C) Representante BLI que muestra la vista dorsal de los animales tratados. El resplandor (fotones por segundo por cm por estereorradián, p/s/cm²/sr) se tradujo a colores para indicar la carga tumoral en los ratones, según la leyenda que se muestra a la derecha. (D) Cuantificación de la luminiscencia total del cuerpo en fotones por segundo por cm por estereorradián (p/s/cm²/sr) n=5. Ns, no significativo; *, valor p <0.05; **, p<0.005.

Figura 25. El virus Stealth-A09 logra una oncólisis indistinguible del MeV parental en un modelo de ratón con mieloma múltiple. (A) Se trataron por vía intravenosa ratones SCID que portaban tumores de células U266.B1 subcutáneos con una dosis subóptima de virus. El crecimiento tumoral se midió con un calibrador (n=5) y los animales se sacrificaron cuando los tumores se ulceraron o cuando el tamaño del tumor alcanzó el 20% del peso corporal. (B) Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier (n=5). Las diferencias significativas entre los grupos se determinaron mediante la prueba de rango largo (*, p<0.05). (C) Tráfico de virus a células tumorales subcutáneas después de la administración sistémica. La expresión de eGFP se evaluó mediante inmunohistoquímica de dos muestras representativas de cada grupo recolectadas en la eutanasia. Escala, 200 nm.

Figura 26. El aumento de la afinidad de unión a CD46 mejora la entrada del virus específico de CD46. Se utilizaron virus Stealth que expresan fluc para infectar las células indicadas con una MOI decreciente. La expresión de luciferasa se midió 48 horas después de la infección. n=2 para todos excepto CHO-CD46 y Stealth-A09 (n=3).

Figura 27. Stealth virus permanece oncolítico en presencia de suero inmune MeV. (A) Se inyectaron células SKOV3ip.Fluc en ratones desnudos atímicos y se dejaron establecer durante 10 días. A continuación, los ratones de los grupos relevantes recibieron 600 mUI de anticuerpo IgG anti-MeV por vía intraperitoneal tres horas antes del tratamiento con el virus por la misma vía. (B) Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier (n = 5 ratones por grupo). Las diferencias significativas entre los grupos se determinaron mediante la prueba de rango largo (ns, no significativo; *, p<0.05; **, p<0.002) (C) BLI representativo que muestra la vista dorsal de los animales tratados. El resplandor (fotones por segundo por cm por estereorradián, p/s/cm²/sr) se tradujo a colores para indicar la carga tumoral en los ratones, según la leyenda que se muestra

a la derecha. (D) Cuantificación de la luminiscencia total del cuerpo en fotones por segundo por cm por estereorradián (p/s/cm²/sr). n=5. La significación estadística se determinó mediante ANOVA unidireccional con la prueba de comparación múltiple de Dunnetts. Ns, no significativo.

Figura 28. Falta de neutralización cruzada entre el virus del sarampión y Stealth. (A) Ensayo de neutralización de virus para MeV y Stealth. Se usó suero combinado AB humano (panel izquierdo) o suero anti-CDV de hurón (panel derecho). La infección relativa se refiere a la cantidad de infección en presencia de suero en comparación con la ausencia de suero. Los valores se calcularon a partir de dos o tres réplicas biológicas realizadas en cuadruplicados técnicos. (B) También se usaron antisueros de ratones HuCD46Ge-IFNARKO infectados para determinar la neutralización cruzada entre los virus, n = 8 (tenga en cuenta que algunos puntos de datos se superponen). Los títulos de ND₅₀ se convirtieron a mIU/mL en función del ND₅₀ obtenido para MeV cuando se evaluó con el tercer estándar de suero internacional de la OMS (3 IU/mL).

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Este documento proporciona polipéptidos CDV F. Como se describe en el presente documento, un polipéptido CDV F puede diseñarse de manera que las partículas de virus que contienen el polipéptido CDV F junto con un polipéptido CDV H muestren una actividad fusogénica potenciada. Por ejemplo, se puede diseñar un polipéptido CDV F para que contenga una secuencia de péptido señal que no tenga más de 75 aminoácidos de longitud. Típicamente, los polipéptidos CDV F de tipo salvaje contienen una secuencia de péptido señal que tiene una longitud de aproximadamente 135 aminoácidos. Un ejemplo de una secuencia de péptido señal de 135 aminoácidos de un polipéptido CDV F de tipo salvaje se establece en la ID SEC N.º: 6 (MHKEIPEKSRTRTHHTQQLPQQKSTEYTEIKTSRARHGITPAQRSTHYGPRTLDRVLVCYIMNR AMSCKQASYRSDNIPAHGDHEGVVHHTPESVSQGARSQKRRTSNAINSGFQYIWLVLWCIGI ASLFLCSKA). Como se describe en este documento, truncar la secuencia del péptido señal de los polipéptidos CDV F de modo que no tenga más de 75 aminoácidos de longitud puede dar como resultado polipéptidos CDV F que, cuando forman parte de virus junto con polipéptidos CDV H, permiten una mayor actividad fusogénica del virus en comparación con el nivel de actividad fusogénica exhibido por virus de control comparables que contienen un polipéptido CDV

F que tiene una secuencia de péptido señal de tipo salvaje de longitud completa (por ejemplo, ID SEC N.º: 6).

Un polipéptido CDV F proporcionado en el presente documento puede contener una secuencia de péptido señal que tiene una longitud de 7 a 75 aminoácidos. Por ejemplo, un polipéptido CDV F proporcionado en este documento puede contener una secuencia de péptido señal que es de 7 a 75 (por ejemplo, de 7 a 70, de 7 a 65, de 7 a 60, de 7 a 55, de 7 a 50, de 7 a 45, de 7 a 40, de 7 a 35, de 7 a 30, de 7 a 25, de 10 a 75, de 15 a 75, de 20 a 75, de 25 a 75, de 35 a 75, de 45 a 75, de 50 a 75, de 55 a 75, de 65 a 75, de 20 a 60, de 25 a 50, de 30 a 60 o de 30 a 40) aminoácidos de longitud. Un polipéptido CDV F proporcionado en el presente documento se puede producir truncando una secuencia de péptido señal de tipo salvaje desde su extremo N-terminal, desde su extremo C-terminal o desde su extremo N-terminal y su extremo C-terminal o eliminando aminoácidos entre los Regiones N-terminal y C-terminal de una secuencia de péptido señal de tipo salvaje. En algunos casos, se puede usar una secuencia de péptido señal del virus del sarampión para un péptido señal de un polipéptido CDV F descrito en este documento. Los ejemplos de secuencias de péptidos señal de polipéptidos CDV F proporcionados en este documento incluyen, sin limitación, los establecidos en la Tabla 1.

Tabla 1. Ejemplos de secuencias de péptidos señal.

N.º de ejemplo	Secuencia	ID SEC N.º
1	MNRAMSCKQASYRSDNIPAHGDHEGVVHHTPESVSQG ARSQLKRRTSNAINSGFQYIWLVLWCIGIASLFLCSKA	8
2	MTSNAINSGFQYIWLVLWCIGIASLFLCSKA	9
3	MSIMGLKVNVSIFMAVLLTLQTPTG	10
4	MAINSGSQCTWLVLWCLGIASLFLCSKA	11
5	MAINSGSQCTWLVLWCLGMASLFLCSKA	12
6	MAINSGSQCTWLVLWCFGTASLFLCSKA	13
7	MATSPGPQCTWLVLWCIGIASLFLCSEA	14
8	MAVKSGSQCTWLVLWCIGVASLFLCSKA	15
9	MASNPGSQCTWLVLWCIGIASLFLCSKA	16

10	MATNAGSQYTWLVLWCIGIASLFLCSKA	17
11	MATSSGSQCTWLVLWCIGVASLFLCSKA	18
12	MAINSQSCTWLVLWCIGVASLFLCSKA	19
13	MAINSGFQYIWLVLWCIGIASLFLCSKA	20

En algunos casos, un polipéptido CDV F proporcionado en este documento puede diseñarse para que carezca de la secuencia completa del péptido señal. Por ejemplo, un polipéptido CDV F proporcionado en este documento puede tener una de las secuencias de aminoácidos establecidas en la Figura 13 que comienza con el aminoácido en la posición 140.

Un polipéptido CDV F proporcionado en el presente documento puede tener cualquier secuencia de aminoácidos apropiada siempre que el polipéptido CDV F no contenga una secuencia de péptido señal de más de 75 residuos de aminoácidos de longitud. Los ejemplos de secuencias de aminoácidos de polipéptidos CDV F que se pueden usar como se describe en este documento incluyen, sin limitación, las secuencias de aminoácidos expuestas en la Figura 13.

Este documento también proporciona polipéptidos CDV H. Como se describe en este documento, un polipéptido CDV H puede diseñarse de manera que los virus que contienen el polipéptido CDV H junto con un polipéptido CDV F muestren un tropismo reducido o eliminado por los polipéptidos SLAMF1 y/o los polipéptidos Nectin-4 en comparación con los virus que contienen el polipéptido CDV H de tipo salvaje. polipéptidos. Por ejemplo, un polipéptido CDV H puede diseñarse para contener una mutación en uno o más (por ejemplo, uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, 11, 12, 13, 14 o 15) de las posiciones de aminoácidos 454, 460, 479, 494, 510, 520, 525, 526, 527, 528, 529, 537, 539, 547 y 548. Por lo general, los virus que contienen polipéptidos CDV H de tipo salvaje (junto con polipéptidos CDV F) presentan tropismo por los polipéptidos SLAMF1 y los polipéptidos Nectin-4, de modo que los virus infectan células positivas para SLAMF1 y células positivas para Nectin-4. Como se describe en este documento, la mutación de una o más posiciones de aminoácidos P/S454, V/L/F460, L/F/W479, I494, I/L/V510, Y520, Y/N525, D/G526, I/V527, S/T528, R529, Y/D537, Y539, Y/F547 e Y/M548 de un polipéptido CDV H a un aminoácido diferente (p. ej., alanina) pueden reducir o eliminar la capacidad de los virus que contienen ese polipéptido CDV H (junto con un polipéptido CDV F) para infectar células positivas para SLAMF1 y/o células positivas para Nectin-4.

Los ejemplos de polipéptidos CDV H proporcionados en el presente documento que tienen tropismo reducido o eliminado por los polipéptidos SLAMF1 y/o los polipéptidos Nectin-4 incluyen, sin limitación, los polipéptidos CDV H expuestos en la Figura 12, siempre que el polipéptido CDV H contenga una mutación de uno o más (por ejemplo, uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, 11, 12, 13, 14 o 15) de P/S454, V/L/F460, L/F/W479, I494, I/L/V510, Y520, Y/N525, D/G526, I/V527, S/T528, R529, Y/D537, Y539, Y/F547 e Y/M548. Los ejemplos de mutaciones que se pueden usar para producir un polipéptido CDV H que tenga un tropismo reducido o eliminado por los polipéptidos SLAMF1 y/o los polipéptidos Nectin-4 incluyen, entre otros, los que se exponen en la Tabla 2. Los ejemplos de combinaciones de las mutaciones que se exponen en la Tabla 2 que se pueden usar para producir un polipéptido CDV H que tenga un tropismo reducido o eliminado por los polipéptidos SLAMF1 y/o los polipéptidos Nectin-4 incluyen, entre otros, los establecidos en la Tabla 3.

Tabla 2. Ejemplos de mutaciones que se pueden introducir en un polipéptido CDV H (p. ej., un polipéptido CDV H expuesto en la Figura 12).

N.º de ejemplo	Posición	Cambio amino ácido	Ejemplos específicos
1	P454	Cualquier aminoácido que no sea P y S	A, I, L, M, F, W, Y, V, R, H, K, D, E, S, T, N, Q, C, G, or P
2	V/L/F460	Cualquier aminoácido que no sea V, L y F	A, I, M, F, W, Y, S, T, N, Q, C, G, P, R, H, K, D, or E
3	L/F/W479	Cualquier aminoácido que no sea L, F y W	A, I, M, Y, V, S, T, N, Q, C, G, P, R, H, K, D, E
4	I494	Cualquier aminoácido que no sea I	A, L M, F, W, Y, V, S, T, N, Q, C, G, P, R, H, K, D, or E
5	I/L/V510	Cualquier aminoácido que no sea I, L y V	A, M, F, W, Y, S, T, N, Q, C, G, P, R, H, K, D, or E
6	Y520	Cualquier aminoácido que no sea Y	A, I, L M, F, W, V, S, T, N, Q, C, G, P, R, H, K, D, or E
7	Y/N525	Cualquier aminoácido que no sea Y y N	A, I, L M, F, W, V, S, T, Q, C, G, P, R, H, K, D, or E

8	D/G526	Cualquier aminoácido que no sea D y G	A, I, L M, F, W, Y, V, S, T, N, Q, C, P, R, H, K, or E
9	I/V527	Cualquier aminoácido que no sea I y V	A, L M, F, W, Y, S, T, N, Q, C, G, P, R, H, K, D, or E
10	S/T528	Cualquier aminoácido que no sea S y T	A, I, L M, F, W, Y, V, N, Q, C, G, P, R, H, K, D, or E
11	R529	Cualquier aminoácido que no sea R	A, I, L M, F, W, Y, V, S, T, N, Q, C, G, P, H, K, D, or E
12	Y/D537	Cualquier aminoácido que no sea Y y D	A, S, T, N, Q, G, C, P, D, R, H, K, or E
13	Y539	Cualquier aminoácido que no sea Y	A, S, T, N, Q, G, C, P, D, E, R, H, K, or E
14	Y/F547	Cualquier aminoácido que no sea Y y F	A, S, T, N, Q, G, C, P, D, E, R, H, K, or E
15	Y/M548	Cualquier aminoácido que no sea Y y M	A, S, T, N, Q, G, C, P, D, E, R, H, K, or E

Tabla 3. Ejemplos de combinaciones de mutaciones de la Tabla 2 que pueden incluirse dentro de un polipéptido CDV H.

N.º de combinación	Combinación de mutaciones de la Tabla 2
1	Todo del 1 al 15
2	8, 9, 10, 11, 14 y 15
3	7, 8 y 11
4	7 y 8
5	7 y 11
6	8 y 11

Este documento también proporciona virus recombinantes (por ejemplo, VSV) que contienen un polipéptido CDV H proporcionado en este documento y/o un polipéptido CDV F proporcionado en este documento, así como métodos para producir virus recombinantes (por ejemplo, VSV) que contienen un polipéptido CDV H proporcionado en este documento y/o un polipéptido CDV F proporcionado en el presente documento. Por ejemplo, un virus recombinante (p. ej., VSV) puede diseñarse para incluir (a) un polipéptido CDV H proporcionado en este documento y un polipéptido CDV F de tipo salvaje, (b) un polipéptido CDV H de tipo salvaje y un polipéptido CDV F proporcionado en este documento, o (c) un polipéptido CDV H proporcionado en este documento y un polipéptido CDV F proporcionado en este documento. En algunos casos, se puede diseñar un virus recombinante (por ejemplo, VSV) para incluir un polipéptido CDV H que tiene CDV H 5804 y un polipéptido CDV F que tiene CDV F 22458/16.

Este documento también proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido CDV H proporcionado aquí y/o moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido CDV F proporcionado aquí. Por ejemplo, se puede diseñar una molécula de ácido nucleico (p. ej., un vector) para codificar un polipéptido CDV H proporcionado en este documento y/o un polipéptido CDV F proporcionado en este documento.

Este documento proporciona métodos y materiales relacionados con las VSV. Por ejemplo, este documento proporciona VSV con capacidad de replicación, moléculas de ácido nucleico que codifican VSV con capacidad de replicación, métodos para fabricar VSV con capacidad de replicación y métodos para usar VSV con capacidad de replicación para tratar el cáncer o enfermedades infecciosas.

Como se describe en el presente documento, un VSV se puede diseñar para que tenga una molécula de ácido nucleico que codifique un polipéptido VSV N, un polipéptido VSV P, un polipéptido VSV M, un polipéptido CDV F (por ejemplo, un polipéptido CDV F proporcionado en este documento), un polipéptido CDV H polipéptido (por ejemplo, un polipéptido CDV H proporcionado en este documento), y un polipéptido VSV L, y no codifica un polipéptido VSV G funcional. Se apreciará que las secuencias descritas en el presente documento con respecto a un VSV se incorporan en un plásmido que codifica el ADNc de sentido positivo del genoma vírico que permite la generación del genoma de sentido negativo de los VSV. Por lo tanto, se apreciará que una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido VSV, por ejemplo, puede referirse a una secuencia de ARN que es la plantilla para el transcrito de sentido positivo que codifica (por ejemplo, mediante traducción directa) ese polipéptido.

El ácido nucleico que codifica el polipéptido CDV F y el polipéptido CDV H se pueden colocar en cualquier ubicación dentro del genoma de VSV. En algunos casos, el ácido nucleico que codifica el polipéptido CDV F y el polipéptido CDV H se pueden colocar cadena abajo del ácido nucleico que codifica el polipéptido VSV M. Por ejemplo, el ácido nucleico que codifica un polipéptido CDV F y el ácido nucleico que codifica un polipéptido CDV H se pueden colocar entre el ácido nucleico que codifica un polipéptido VSV M y el ácido nucleico que codifica un polipéptido VSV L.

Cualquier ácido nucleico apropiado que codifique un polipéptido CDV F puede insertarse en el genoma de un VSV. Por ejemplo, el ácido nucleico que codifica un polipéptido CDV F de tipo salvaje o un polipéptido CDV F proporcionado en el presente documento puede insertarse en el genoma de un VSV.

Cualquier ácido nucleico apropiado que codifique un polipéptido H de CDV puede insertarse en el genoma de un VSV. Por ejemplo, el ácido nucleico que codifica un polipéptido H de tipo salvaje o un polipéptido H proporcionado en el presente documento puede insertarse en el genoma de un VSV. En algunos casos, el ácido nucleico que codifica un polipéptido CDV H que carece de especificidad por SLAMF1 y/o Nectin-4 puede insertarse en el genoma de un VSV. Por ejemplo, el ácido nucleico que codifica un polipéptido CDV H que tiene una o más mutaciones expuestas en la Tabla 2 puede insertarse en el genoma de un VSV. En algunos casos, un híbrido VSV/CDV proporcionado en este documento puede diseñarse para tener un tropismo preseleccionado. Por ejemplo, los polipéptidos F y/o H de CDV que tienen especificidad anulada para SLAMF1 y/o Nectin-4 se pueden usar de tal manera que un scFv o ligando polipeptídico se puede unir, por ejemplo, al extremo C del polipéptido H de CDV. En tales casos, el scFv o el ligando polipeptídico pueden determinar el tropismo de un híbrido VSV/CDV. Los ejemplos de scFv que pueden usarse para dirigir híbridos VSV/CDV a receptores celulares (p. ej., receptores celulares asociados a tumores) incluyen, entre otros, anti-EGFR, anti-CD46, anti- α FR, anti-PSMA, anti-HER-2, scFv anti-CD19, anti-CD20 o anti-CD38. Los ejemplos de ligandos polipeptídicos que se pueden usar para dirigir híbridos VSV/CDV incluyen, entre otros, polipéptidos uPA del activador del plasminógeno de urocinasa, citocinas como IL-13, receptores de células T de cadena única (scTCR), polipéptidos de equistatina y polipéptidos de unión a integrinas.

En algunos casos, la molécula de ácido nucleico de VSV proporcionada en este documento puede codificar un polipéptido de IFN, un polipéptido fluorescente (p. ej., un polipéptido de GFP), un polipéptido de NIS, un polipéptido terapéutico, un polipéptido que antagoniza la inmunidad innata, un antígeno tumoral o una combinación del mismo. El ácido nucleico que codifica un polipéptido de IFN se puede colocar cadena abajo del ácido nucleico que codifica un polipéptido M de VSV. Por ejemplo, el ácido nucleico que codifica un polipéptido IFN se puede colocar entre el ácido nucleico que codifica un polipéptido VSV M y el ácido nucleico que codifica un polipéptido CDV F o un ácido nucleico que codifica un polipéptido CDV H. Tal posición puede permitir que los virus expresen una cantidad de polipéptido IFN que es eficaz para activar respuestas inmunitarias innatas antivirales en tejidos no cancerosos y, por lo tanto, aliviar la toxicidad viral potencial, sin impedir la replicación viral eficiente en células cancerosas.

Cualquier ácido nucleico apropiado que codifique un polipéptido de IFN puede insertarse en el genoma de un VSV. Por ejemplo, el ácido nucleico que codifica un polipéptido de IFN beta puede insertarse en el genoma de un VSV. Ejemplos de ácidos nucleicos que codifican polipéptidos de IFN beta que se pueden insertar en el genoma de un VSV incluyen, entre otros, ácidos nucleicos que codifican un polipéptido de IFN beta humano de la secuencia de ácido nucleico establecida en GenBank® N.º de acceso NM_002176.2 (GI N.º 50593016), ácido nucleico que codifica un polipéptido de IFN beta de ratón de la secuencia de ácido nucleico establecida en los números de acceso de GenBank® NM_010510.1 (N.º GI 6754303), BC119395.1 (N.º GI 111601321) o BC119397.1 (N.º GI 111601034), y ácido nucleico que codifica un polipéptido de IFN beta de rata de la secuencia de ácido nucleico expuesta en GenBank® Acceso No. NM_019127.1 (N.º GI 9506800).

El ácido nucleico que codifica un polipéptido NIS se puede colocar cadena abajo del ácido nucleico que codifica un polipéptido CDV F o un ácido nucleico que codifica un polipéptido CDV H. Por ejemplo, el ácido nucleico que codifica un polipéptido NIS se puede colocar entre el ácido nucleico que codifica un polipéptido CDV F o H y el ácido nucleico que codifica un polipéptido VSV L. Tal posición puede permitir que los virus expresen una cantidad de polipéptido NIS que (a) es eficaz para permitir la acumulación selectiva de yoduro en las células infectadas, lo que permite obtener imágenes de la distribución viral utilizando radioisótopos y radioterapia dirigida a las células cancerosas infectadas, y (b) no es tan alto como para ser tóxico para las células infectadas.

Cualquier ácido nucleico apropiado que codifique un polipéptido NIS puede insertarse en el genoma de un VSV. Por ejemplo, el ácido nucleico que codifica un polipéptido NIS humano puede insertarse en el genoma de un VSV.

Ejemplos de ácidos nucleicos que codifican polipéptidos NIS que se pueden insertar en el genoma de un VSV incluyen, sin limitación, ácidos nucleicos que codifican un polipéptido NIS humano de la secuencia de ácido nucleico establecida en los números de acceso de GenBank® NM_000453.2 (N.º GI164663746), BC105049.1 (N.º GI 85397913), o BC105047.1 (N.º GI 85397519), ácido nucleico que codifica un polipéptido NIS de ratón de la secuencia de ácido nucleico establecida en los números de acceso de GenBank® NM_053248.2 (N.º GI 162138896), AF380353.1 (N.º GI 14290144), o AF235001.1 (N.º GI 12642413), ácido nucleico que codifica un polipéptido NIS de chimpancé de la secuencia de ácido nucleico establecida en GenBank® Acceso No. XM_524154 (N.º GI 114676080), ácido nucleico que codifica un polipéptido NIS de perro de la secuencia de ácido nucleico establecida en el número de acceso de GenBank® XM_541946 (N.º GI 73986161), ácido nucleico que codifica un polipéptido NIS de vaca de la secuencia de ácido nucleico establecida en el número de acceso de GenBank® XM_581578 (N.º GI 297466916), ácido nucleico que codifica un polipéptido NIS de cerdo de la secuencia de ácido nucleico establecida en GenBank® Número de acceso NM_214410 (N.º GI 47523871), y ácido nucleico que codifica un polipéptido NIS de rata de la secuencia de ácido nucleico establecida en GenBank® Número de acceso NM_052983 (N.º GI 158138504).

Las secuencias de ácido nucleico de un VSV proporcionadas en el presente documento que codifican un polipéptido VSV N, un polipéptido VSV P, un polipéptido VSV M y un polipéptido VSV L pueden ser de una cepa de VSV Indiana como se establece en los números de acceso de GenBank® NC_001560 (N.º GI 9627229) o puede ser de una cepa VSV New Jersey.

En un aspecto, este documento proporciona VSV que contienen una molécula de ácido nucleico (por ejemplo, una molécula de ARN) que tiene (por ejemplo, en una dirección de 3' a 5') una secuencia de ácido nucleico que es una plantilla para una transcripción de sentido positivo que codifica un VSV N polipéptido, una secuencia de ácido nucleico que es un molde para un transcrito de sentido positivo que codifica un VSV P polipéptido, una secuencia de ácido nucleico que es un molde para un transcrito de sentido positivo que codifica un VSV M polipéptido, una secuencia de ácido nucleico que es un molde para un transcrito de sentido positivo que codifica un polipéptido CDV F, una secuencia de ácido nucleico que es un molde para un transcrito de sentido positivo que codifica un polipéptido CDV H, y una secuencia de ácido nucleico que es un molde para un transcrito de sentido positivo que codifica un polipéptido VSV L mientras carece de una secuencia de ácido nucleico que es una plantilla para un transcrito de sentido positivo que codifica un polipéptido G de VSV funcional. Dichos VSV pueden infectar células (por ejemplo, células cancerosas) y ser competentes para la replicación.

Puede usarse cualquier método apropiado para insertar ácido nucleico (p. ej., ácido nucleico que codifica un polipéptido CDV F, ácido nucleico que codifica un polipéptido CDV H, ácido nucleico que codifica un polipéptido IFN y/o ácido nucleico que codifica un polipéptido NIS) en el genoma de una VSV. Por ejemplo, los métodos descritos en otros lugares (Schnell *et al.*, *PNAS*, 93:11359-11365 (1996), Obuchi *et al.*, *J. Virol.*, 77(16):8843-56 (2003)); Goel *et al.*, *Blood*, 110(7):2342-50 (2007)); y Kelly *et al.*, *J. Virol.*, 84(3):1550-62 (2010)) para insertar ácido nucleico en el genoma de un VSV. Se puede usar cualquier método apropiado para identificar los VSV que contienen una molécula de ácido nucleico descrita en este documento. Dichos métodos incluyen, sin limitación, PCR y técnicas de hibridación de ácidos nucleicos tales como análisis Northern y Southern. En algunos casos, se pueden usar técnicas inmunohistoquímicas y bioquímicas para determinar si un VSV contiene una molécula de ácido nucleico en particular al detectar la expresión de un polipéptido codificado por esa molécula de ácido nucleico en particular.

En otro aspecto, este documento proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido VSV N, un polipéptido VSV P, un polipéptido VSV M, un polipéptido CDV F, un polipéptido CDV H y un polipéptido VSV L, mientras que carecen de la capacidad de codificar un polipéptido VSV G funcional. Por ejemplo, una molécula de ácido nucleico proporcionada en este documento puede ser una sola molécula de ácido nucleico que incluye una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido VSV N, una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido VSV P, una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido VSV M, una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido CDV F, una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido CDV H y una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido VSV L, mientras que carece de una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido VSV G funcional.

En otro aspecto, este documento proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido VSV N, un polipéptido VSV P, un polipéptido VSV M, un polipéptido IFN, un polipéptido CDV F, un polipéptido CDV H, un polipéptido NIS y un polipéptido VSV L, mientras que carece de la capacidad de codificar un polipéptido VSV G funcional. Por ejemplo, una molécula de ácido nucleico proporcionada en este documento puede ser una sola molécula de ácido nucleico que incluye una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido VSV N, una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido VSV P, una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido VSV M, una secuencia de ácido nucleico que codifica un

polipéptido IFN, una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido CDV F, una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido CDV H, una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido NIS y una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido VSV L, aunque carece de la capacidad de codificar un polipéptido VSV G funcional.

5 El término "ácido nucleico", como se usa en el presente documento, abarca tanto el ARN (por ejemplo, el ARN viral) como el ADN, incluidos el ADNc, el ADN genómico y el 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.

10 Este documento también proporciona un método para tratar el cáncer (p. ej., para reducir el tamaño del tumor, inhibir el crecimiento del tumor o reducir la cantidad de células tumorales viables), métodos para inducir la inmunidad del huésped contra el cáncer y métodos para tratar una enfermedad infecciosa como el VIH o el sarampión. Por ejemplo, un virus recombinante (por ejemplo, un VSV) proporcionado en el presente documento se puede administrar a un mamífero
15 que tiene cáncer para reducir el tamaño del tumor, para inhibir el crecimiento de células cancerosas o tumores, para reducir el número de células cancerosas viables dentro del mamífero, y/o para inducir respuestas inmunogénicas del huésped contra un tumor. Un virus recombinante (p. ej., un VSV) que se proporciona en el presente documento se puede propagar en células huésped para aumentar el número disponible de copias de ese virus, normalmente al
20 menos 2 veces (p. ej., de 5 a 10 veces, de 50 - hasta 100 veces, entre 500 y 1000 veces, o incluso entre 5000 y 10 000 veces). En algunos casos, un virus recombinante (p. ej., un VSV) que se proporciona en el presente documento se puede expandir hasta obtener la concentración deseada en medios de cultivo celular estándar (p. ej., DMEM o RPMI-1640 suplementado con suero bovino fetal al 5-10 % a 37 °C). en 5% CO₂). Un título viral generalmente se analiza
25 mediante la inoculación de células (p. ej., células Vero) en cultivo.

Los virus recombinantes (p. ej., VSV) proporcionados en el presente documento se pueden administrar a un paciente con cáncer, por ejemplo, mediante inyección directa en un grupo de células cancerosas (p. ej., un tumor) o suministro intravenoso a células cancerosas. Un virus recombinante (p. ej., un VSV) proporcionado en el presente documento se puede usar para
30 tratar diferentes tipos de cáncer que incluyen, entre otros, mieloma (p. ej., mieloma múltiple), melanoma, glioma, linfoma, mesotelioma y cánceres de pulmón, cerebro, estómago, colon, recto, riñón, próstata, ovario, mama, páncreas, hígado y cabeza y cuello.

Los virus recombinantes (p. ej., VSV) proporcionados en el presente documento se pueden administrar a un paciente en una solución biológicamente compatible o en un vehículo de administración farmacéuticamente aceptable, ya sea directamente en un grupo de células cancerosas (p. ej., intratumoralmente) o sistémicamente (p. ej., por vía intravenosa). Las formulaciones farmacéuticas adecuadas dependen en parte del uso y la vía de entrada, por ejemplo, transdérmica o por inyección. Dichas formas no deben impedir que la composición o formulación alcance una célula diana (es decir, una célula a la que se desea administrar el virus) o que ejerza su efecto. Por ejemplo, las composiciones farmacológicas inyectadas en el torrente sanguíneo deberían ser solubles.

Si bien las dosis administradas variarán de un paciente a otro (p. ej., según el tamaño de un tumor), se puede determinar una dosis efectiva estableciendo como límite inferior la concentración de virus que se ha comprobado que es segura y escalando a dosis más altas de hasta 10^{12} pfu, mientras se monitorea la reducción en el crecimiento de células cancerosas junto con la presencia de efectos secundarios nocivos. Una dosis terapéuticamente eficaz normalmente proporciona al menos una reducción del 10 % en el número de células cancerosas o en el tamaño del tumor. Los estudios de dosis crecientes se pueden usar para obtener el efecto deseado para un tratamiento viral dado (ver, por ejemplo, Nies y Spielberg, "Principles of Therapeutics", en Goodman & Gilman's *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, eds. Hardman, et al., McGraw-Hill, NY, 1996, págs. 43-62).

Los virus recombinantes (p. ej., VSV) proporcionados en el presente documento pueden administrarse en una dosis que oscila entre, por ejemplo, alrededor de 10^3 pfu a alrededor de 10^{12} pfu (p. ej., alrededor de 10^5 pfu a alrededor de 10^{12} pfu, alrededor de 10^6 pfu a alrededor de 10^{11} pfu, o alrededor de 10^6 ufp hasta alrededor de 10^{10} ufp). Se puede proporcionar una dosis terapéuticamente eficaz en dosis repetidas. La dosificación repetida es apropiada en los casos en los que las observaciones de los síntomas clínicos o el tamaño del tumor o los ensayos de seguimiento indican que un grupo de células cancerosas o el tumor han dejado de reducirse o que el grado de actividad viral está disminuyendo mientras el tumor aún está presente. Las dosis repetidas se pueden administrar por la misma vía que se usó inicialmente o por otra vía. Una dosis terapéuticamente eficaz se puede administrar en varias dosis discretas (p. ej., con días o semanas de diferencia) y, en una realización, se proporcionan de una a aproximadamente doce dosis. Alternativamente, una dosis terapéuticamente eficaz de virus recombinantes (p. ej., VSV) proporcionada en el presente documento puede administrarse mediante una formulación de liberación sostenida. En algunos casos, un virus recombinante (por ejemplo, un VSV)

proporcionado en este documento puede administrarse en combinación con agentes farmacológicos que facilitan la replicación viral y la propagación dentro de las células cancerosas o agentes que protegen a las células no cancerosas de la toxicidad viral. Los ejemplos de dichos agentes se describen en otros lugares (Alvarez-Breckenridge *et al.*, *Chem. Rev.*, 109(7):3125-40 (2009)).

Los virus recombinantes (p. ej., VSV) proporcionados en el presente documento se pueden administrar utilizando un dispositivo para proporcionar una liberación sostenida. Una formulación para la liberación sostenida de virus recombinantes (p. ej., VSV) proporcionada en el presente documento puede incluir, por ejemplo, un excipiente polimérico (p. ej., un gel hinchable o no hinchable, o colágeno). Una dosis terapéuticamente eficaz de virus recombinantes (p. ej., VSV) proporcionada en el presente documento se puede proporcionar dentro de un excipiente polimérico, en el que la composición de excipiente/virus se implanta en un sitio de células cancerosas (p. ej., en las proximidades o dentro de un tumor). La acción de los fluidos corporales disuelve gradualmente el excipiente y libera continuamente la dosis efectiva de virus durante un período de tiempo. Alternativamente, un dispositivo de liberación sostenida puede contener una serie de capas activas y espaciadoras alternas. Cada capa activa de dicho dispositivo normalmente contiene una dosis de virus incrustada en el excipiente, mientras que cada capa espaciadora contiene solo excipiente o bajas concentraciones de virus (es decir, más bajas que la dosis efectiva). A medida que se disuelve cada capa sucesiva del dispositivo, se administran dosis pulsadas de virus. El tamaño/formulación de las capas espaciadoras determina el intervalo de tiempo entre dosis y se optimiza según el régimen terapéutico que se utilice.

En algunos casos, los virus recombinantes (p. ej., VSV) proporcionados en este documento pueden administrarse directamente. Por ejemplo, se puede inyectar un virus directamente en un tumor (p. ej., un tumor de cáncer de mama) que es palpable a través de la piel. La guía por ultrasonido también se puede usar en dicho método. Alternativamente, la administración directa de un virus puede lograrse a través de una línea de catéter u otro dispositivo de acceso médico y puede usarse junto con un sistema de formación de imágenes para localizar un grupo de células cancerosas. Mediante este método, un dispositivo de dosificación implantable normalmente se coloca cerca de un grupo de células cancerosas utilizando un cable guía insertado en el dispositivo de acceso médico. Una dosis eficaz de un virus recombinante (p. ej., un VSV) proporcionado en el presente documento se puede administrar directamente a un grupo de células cancerosas que es visible en un campo quirúrgico expuesto.

En algunos casos, los virus recombinantes (p. ej., VSV) proporcionados en este documento pueden administrarse sistémicamente. Por ejemplo, el suministro sistémico puede lograrse por vía intravenosa mediante inyección o mediante un dispositivo de suministro intravenoso diseñado para la administración de múltiples dosis de un medicamento.

Tales dispositivos incluyen, pero no se limitan a, agujas de infusión con alas, catéteres intravenosos periféricos, catéteres de línea media, catéteres centrales insertados periféricamente y catéteres o puertos colocados quirúrgicamente.

El curso de la terapia con un virus recombinante (p. ej., un VSV) proporcionado en el presente documento puede controlarse mediante la evaluación de los cambios en los síntomas clínicos o mediante el control directo del número de células cancerosas o el tamaño de un tumor. Para un tumor sólido, la eficacia del tratamiento con virus se puede evaluar midiendo el tamaño o el peso del tumor antes y después del tratamiento. El tamaño del tumor se puede medir directamente (p. ej., con calibradores), o mediante el uso de técnicas de imagen (p. ej., rayos X, imágenes por resonancia magnética o tomografía computarizada) o a partir de la evaluación de datos ópticos que no son de imagen (p. ej., datos espectrales). Para un grupo de células cancerosas (p. ej., células de leucemia), la eficacia del tratamiento viral se puede determinar midiendo el número absoluto de células de leucemia en la circulación de un paciente antes y después del tratamiento. La eficacia del tratamiento viral también se puede evaluar mediante el control 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, alfafetoproteína (AFP), antígeno carbohidrato 15-3 y antígeno carbohidrato 19-4.

La invención se describirá adicionalmente en los siguientes ejemplos, que no limitan el alcance de la invención descrita en las reivindicaciones.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: polipéptidos CDV F y H y virus recombinantes

Líneas celulares

Células de riñón de mono verde africano Vero (Vero; American type culture collection [ATCC], N.º de catálogo CCL-81) y sus derivados (ya sea que expresen Nectin-4 (Noyce *et al.*, *Virology*, 436(1):210-20 (2013)), SLAMF1 (Tatsuo *et al.*, *Nature*, 406(6798):893-7 (2000)), perro SLAMF1 (von Messling *et al.*, *J. Virol.*, 77(23):12579-91 (2003)), o un anticuerpo monocatenario anclado a la membrana específico para un péptido de hexahistidina (ID SEC N.º: 21) (Nakamura *et al.*, *Nat. Biotechnol.*, 23(2):209-14 (2005)) se mantuvieron en Medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (GE Healthcare Life Sciences, N.º de catálogo SH30022.01) complementado con 5 % (vol./vol.) de suero fetal bovino inactivado por calor (FBS, Gibco) y 0.5 mg/mL de Geneticina (G418; Corning) para Vero/NECTIN-4 y Vero/SLAMF1 o 1 mg/ml de zeocina (ThermoFisher) para

Vero/dogSLAMF1. Células epiteliales de riñón humano (HEK293T), obtenidas del Dr. Cosset (Universidad de Lyon), células de riñón de hámster bebé (BHK, ATCC, N.º de catálogo CCL-10), células de glioblastoma humano U-87 MG ((ATCC, N.º de catálogo HTB-14) y células de tumor de ovario humano SKOV3ip.1 se mantuvieron en DMEM más FBS al 10 %, células de ovario de hámster chino (CHO), CHO-CD46 y CHO-EGFR (Nakamura *et al.*, *Nat. Biotechnol.*, 22(3):331-6 (2004)), CHO-SLAMF1 (Tatsuo *et al.*, *Nature*, 406(6798):893-7 (2000)), CHO-dogSLAMF1 (Seki *et al.*, *J. Virol.*, 77(18):9943-50 (2003)), CHO-NECTIN4 (Liu *et al.*, *J. Virol.*, 88(4):2195-204 (2014)), CHO-CD38 (Peng *et al.*, *Blood*, 101:2557-62 (2003), CHO-HER2/neu (Hasegawa *et al.*, *J. Virol.*, 81(23): 13149-57 (2007), Linfoma de células B de Burkitt Ramos (ATCC, N.º de catálogo CRL-1596) y células Raji (ATCC, N.º de catálogo CCL-86) se cultivaron en medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 (Corning Inc., N.º de catálogo 10-040-CV, Corning, NY, Estados Unidos). Unidos) como se describe en otra parte.

Plásmidos y construcción de rMeV de genoma completo

Para generar plásmidos de expresión de CDV 22458/16, se extrajo el ARN total de células Vero/perro SLAMF1 infectadas con aislado de CDV 22458/16 (pasaje 1) utilizando el kit RNeasy Mini (Qiagen, Hilden, Alemania). Los genes CDV-H y CDV-F se transcribieron inversamente con SuperScript III Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific, N.º de catálogo 11752050) y se amplificaron mediante PCR con los siguientes cebadores:

CDVH7050(+):AGAAACTTAGGGCTCAGGTAGTCC (SEC ID N.º: 22)
 CDVH8949(-): TCGTCTGTAAGGGATTTCTCACC (SEC ID N.º: 23)
 CDVF4857(+): AGGACATAGCAAGCCAACAGG (ID SEC N.º: 24)
 CDVH7050(-): GGACTACCTGAGCCCCTAAGTTTTCT (SEC ID N.º: 25)

Los productos de PCR fueron secuenciados directamente por Sanger (Genewiz, Plainfield NJ, EE. UU.) y clonados en el vector pJET1.2 (Thermo Fisher). El marco de lectura abierto de CDV H (Figura 8) se amplificó luego por PCR con un cebador directo (5'-CCG GTA GTT AAT TAA AAC TTA GGG TGC AAG ATC ATC GAT AAT GCT CTC CTA CCA AGA TAA GGT G-3' (ID SEC N.º : 26)) y un cebador inverso (5'-CTA TTT CAC ACT AGT GGG TAT GCC TGA TGT CTG GGT GAC ATC ATG TGA TTG GTT CAC TAG CAG CCT CAA GGT TTT GAA CGG TTA CAG GAG-3' (ID SEC N.º: 27)) y clonado en el vector pCG restringido PacI y SpeI (New England Biolabs, Ipswich MA, EE. UU.) (Cathomen *et al.*, *J. Virol.*, 72(2):1224-34 (1998))

utilizando el kit InFusion HD (Takara, Shinagawa, Tokio, Japón). Los cebadores proporcionaron los sitios de restricción PacI y SpeI (subrayados, respectivamente), así como la región no traducida MeV-H de MeV-H (cursiva). De manera similar, se clonó un marco de lectura abierto de CDV F (Figura 9; residuos de aminoácidos 136-662 de la ID SEC N.º: 4) en el plásmido pCG-CDV-F restringido por HpaI/SpeI (von Messling *et al.*, *J. Virol.*, 75(14):6418-27 (2001)). El plásmido resultante pCG-CDV F 22458/16 posee la región no traducida MeV-F y el péptido señal MeV-F.

Los plásmidos de expresión para la vacuna CDV H/F Onderstepoort y el aislado 5804 (von Messling *et al.*, *J. Virol.*, 75(14):6418-27 (2001)), así como MeV Nse se describen en otro lugar (Cathomen *et al.*, *J. Virol.*, 72(2):1224-34 (1998)). Se generaron versiones redirigidas de la proteína H insertando el producto de PCR digerido con PacI/SfiI homólogo en los vectores pTNH6 (Nakamura *et al.*, *Nat. Biotechnol.*, 23(2):209-14 (2005); y Nakamura *et al.*, *Nat. Biotechnol.*, 22(3):331-6 (2004)). Se usó mutagénesis dirigida al sitio (QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit, Agilent Technologies, Santa Clara CA, EE. UU.) para eliminar el tropismo en H, así como para eliminar un sitio SpeI en CDV-F e introducir truncamientos en las colas citoplásmicas.

Los rMeV de intercambio de envoltura se produjeron transfiriendo la región PacI/SpeI y NarI/PacI de los plásmidos de expresión correspondientes. El rescate de los rMeV se llevó a cabo empleando el sistema START (Nakamura *et al.*, *Nat. Biotechnol.*, 23(2):209-14 (2005)).

Expresión de proteínas

Las células se transfectaron usando Eugene HD (PROMEGA, Fitchburg WI, EE. UU.) o el reactivo de transfección TransIT-LT1 (Mirus Bio LLC, Madison WI, EE. UU.). Para el ensayo de fusión cuantitativa, el sistema indicador dual-split (Kondo *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 285(19):14681-8 (2010); e Ishikawa *et al.*, *Protein Eng. Des. Sel.*, 25(12):813-20 (2012)) como se describe en otro lugar (Muñoz-Alía *et al.*, *Viruses*, 11(8), pii: E688, doi: 0.3390/v11080688 (2019)), utilizando células BHK como células efectoras. Para la evaluación semicuantitativa de la fusión, las células Vero y sus derivados se transfectaron con 1 µg de cada uno de los plásmidos de expresión H y F y se tiñeron 1 día después con Hema-Quik (Thermo Fisher Scientific, N.º de catálogo 123-745).

Las imágenes se obtuvieron con un microscopio (Eclipse Ti-S; Nikon) con un aumento de 4x. Como alternativa, se incluyó un plásmido de expresión de GFP para una visualización adicional de la formación de sincitios. Para la evaluación del nivel de polipéptido H, las células transfectadas se analizaron mediante citometría de flujo o CELISA usando un anticuerpo monoclonal 6xHis tag (Miltenyi Biotec, N.º de catálogo 130-120-787 o Thermo Fisher Scientific, N.º de catálogo MA1-135), como se describe en otro lugar (Muñoz-Alía *et al.*, *Viruses*, 11(8), pii: E688, doi: 10.3390/v11080688 (2019); and Saw *et al.*, *Methods*, 90:68-75 (2015)). Para la expresión de proteína total mediante citometría de flujo, las células se trataron con tampón de fijación y permeabilización intracelular eBioscience (ThermoFisher, n° de catálogo 88-8823-88).

Contenido de proteína viral

Las preparaciones de virus se calentaron en presencia de ditiotreitól, se fraccionaron en gel de poliacrilamida Bis-Tris al 4-12% y se transfirieron a membranas de fluoruro de polivinilideno. Las transferencias se analizaron con anti-MeV-Hcyt (Cathomen *et al.*, *J. Virol.*, 72(2):1224-34 (1998)), anti-MeV-N (Toth *et al.*, *J. Virol.*, 83 (2):961-8 (2009)), o anti-His tag (Genscript, Piscataway NJ, EE. UU., N.º de catálogo A01857-40) y sondeado con un anticuerpo de conejo secundario conjugado (ThermoFisher, N.º de catálogo 31642). Las transferencias se incubaron con sustrato quimioluminiscente SuperSignal Wester Pico (ThermoFisher) y se analizaron con un ChemiDoc Imaging System (Bio-Rad).

Ensayos de neutralización

Se usó un ensayo de neutralización por reducción del foco de fluorescencia como se describe en otra parte (Munoz-Alia *et al.*, *J. Virol.*, 91(11): e00209-17 (2017)). El virus policlonal Anti-Moquillo Canino, Lederle Avirulent (antisuero, Hurón), se obtuvo a través de recursos BEI (NR-4025). Los sueros humanos usados se agruparon de 60 a 80 donantes que eran específicamente del tipo de sangre AB (Valley Biomedical Products & Services, Inc, N.º de catálogo HS1017, N.º de lote C80553).

Resultados

Ingeniería de un complejo fusogénico CDV H/F

Las glicoproteínas de la cubierta del CDV comparten una homología de aminoácidos del 36% (polipéptido H) y del 66% (polipéptido F) con las de MeV. El marco de lectura abierto para los polipéptidos H y F se obtuvo de un aislado de CDV de tipo salvaje de primer pase SPA.Madrid/22458/16 (CDV 22458/16) de tejidos post-mortem de perro moribundo (SPA.Madrid/22458/ dieciséis). El análisis filogenético de máxima probabilidad de los genes de hemaglutinina de longitud completa mostró que el polipéptido CDV H de 22458/16 se agrupó dentro del clado ártico (Figura 1). La cotransfección de complejos H/F de 22458/16 reveló actividad de fusión solo cuando estaba presente el receptor SLAMF1 (Figura 2A). Se observó una falta de actividad de fusión en las células que expresan Nectin-4. La coexpresión de un polipéptido CDV H de tipo salvaje heterotípico de 5804 con el polipéptido CDV F de 22458/16 dio como resultado una notable formación de sincitios en células Vero que expresan Nectin-4. Por otra parte, los complejos H/F de la variante formadora de placas grandes de la cepa vacunal de Onderstepoort dieron como resultado la formación de grandes sincitios independientemente de la expresión de Nectin-4 y SLAMF1.

Utilizando un gen informador para identificar con mayor precisión la formación de sincitios, se confirmó el fenotipo fusogénico anterior para la combinación heterotípica de tipo salvaje del polipéptido CDV H₅₈₀₄ y el polipéptido CDV F_{22458/16} (Figura 2B). Aunque la falta de formación de sincitios para el homotípico H/F₅₈₀₄ podría atribuirse a la presencia del péptido señal nativo de 135 aminoácidos de longitud, el fenotipo fusogénico distintivo observado para CDV H/F_{22458/16}, que indujo la fusión de célula a célula exclusivamente de una manera dependiente de SLAMF1, se estudió más a fondo. Se encontró que el clon usado para el polipéptido CDV H_{22458/16} contenía un cambio de aminoácido con respecto a la secuencia consenso (M437L). Este clon se usó para crear un clon que codifica un polipéptido CDV H_{22458/16} con la posición 437 cambiada de leucina a metionina.

Expansión de tropismo del aparato de fusión CDV.

Dado que la cotransfección de complejos H/F de CDV de tipo salvaje, pero no los H/F derivados de la vacuna de Ondertepoort, dieron como resultado la formación de sincitios de una manera específica dependiente del receptor, se realizó lo siguiente para determinar si el uso del receptor podría expandirse a receptores alternativos. Como receptor diana, se eligió CD38 y, para este propósito, se mostró un scFv específico de CD38 en el dominio carboxi-terminal de la proteína de unión (Figura 2C).

Con fines comparativos, el análisis incluyó el polipéptido MeV H así como el polipéptido Nipah G. Los resultados presentados en la Figura 2D demuestran que las diferentes construcciones se expresaron en la superficie a niveles comparables. Es de destacar que la sustitución L437M de CDV H_{22458/16} no pareció afectar la expresión de la superficie celular. A continuación, se comparó la capacidad de fusión de manera cuantitativa usando el ensayo de luciferasa dividida autoasociada descrito en otro lugar (Kondo *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 285: 14681-14688 (2010); e Ishikawa *et al.*, *Protein Eng Des. Sel.*, 25:813-820 (2012)). En este ensayo (Figura 2E), las células efectoras se transfectaron con plásmidos de expresión para el complejo H/F y la mitad de la proteína luciferasa GFP/Renilla de doble división (DSP1-7). De forma similar, las células diana que expresaban el receptor relevante se transfectaron con la otra mitad (DSP8-12). Al mezclar el contenido, las mitades que de otro modo no serían funcionales de la proteína GFP/Renilla luciferasa se asocian y se mide la actividad. Los resultados de este experimento con células efectoras que expresan diferentes complejos H o G/F se muestran en la Figura 2F. Mientras que no se observó actividad de fusión cuando se usó la línea celular CHO parental, la actividad de fusión fue evidente en células CHO diseñadas para expresar de manera estable una molécula scFv específica de HIS (CHO-HIS) o CD38. En general, los niveles de actividad fueron más evidentes cuando se utilizó el direccionamiento de CD38 frente al sistema pseudorreceptor 6xHis-anti-6xHIS scFv. Estas diferencias fueron más notables cuando se utilizó Nipah G^{αCD38}. La capacidad de fusión del primero se redujo significativamente en comparación con el polipéptido heterotípico CDV H₅₈₀₄^{αCD38}/polipéptido CDV F_{22458/16} o el homotípico H/F de la cepa Onderstepoort. Sorprendentemente, la sustitución de L437M en el polipéptido CDV H_{22458/16} cambió drásticamente el fenotipo fusogénico del polipéptido, incluso cuando no se observaron diferencias en los niveles de expresión (Figura 2G). Esta nueva capacidad fusogénica era ahora equivalente a la obtenida con el CDV H/F homotípico de 5804, solo cuando el péptido señal del polipéptido CDV F₅₈₀₄ se reemplazaba por un péptido señal MeV F más corto. No obstante, los niveles de fusión para la combinación heterotípica de polipéptido CDV H₅₈₀₄^{αCD38}/polipéptido CDV F_{22458/16} fueron superiores y similares a los obtenidos por la variante formadora de placa grande de Onderstepoort. Estos resultados demuestran no solo que el aparato de fusión de CDV se puede diseñar para usar receptores alternativos, sino también que se puede obtener un fenotipo hiperfusogénico a partir de una combinación heterotípica de complejos H/F de diferentes cepas de CDV de manera dependiente del receptor.

Esta capacidad fusogénica mejorada para el complejo H/F de CDV se logró acortando el péptido señal del polipéptido F de CDV y usando un polipéptido de CDV que tenía M437.

Orientación del receptor

5 Los polipéptidos de CDV H descritos en el párrafo anterior todavía podrían usar la Nectina-4 humana como receptor. Para interrumpir una interacción de Nectin-4, se produjo un ácido nucleico que codifica un polipéptido CDV H que contiene una mutación Y539A. La Figura 2H muestra que el polipéptido CDV H^{αCD38} que incluye la mutación puntual Y539A (CDVH_{Y539A}^{αCD38}) perdió la actividad de fusión en las células Nectin-4 humanas, pero aún pudo
10 inducir la fusión en CHO-HIS (CDV H_{Y539A}^{αCD38} y CDV H_{Y539A}) y CHO-CD38. (CDV H_{Y539A}^{αCD38}) células. Esta actividad de fusión fue comparable a la obtenida por un polipéptido MeV H totalmente redirigido (MeV Haals^{αCD38} y MeV Haals^{αCD38}). Estos resultados demuestran que el complejo CDV H/F se puede redirigir de forma eficaz a receptores específicos.

15 *Impacto de la afinidad de unión al ligando en la fusión de célula a célula impulsada por CDV H/F*

Para evaluar si las diferencias en la afinidad de unión del ligando mostrado al ectodominio del polipéptido CDV H influyeron en la fusogenicidad, los aglutinantes de scFv específicos de Her2/neu, así como las moléculas de anticuerpos (Hasegawa *et al.*, *J. Virol.*, 81(23): 13149-57 (2007), Wikman *et al.*, *Protein Eng. Des. Sel.*, 17(5):455-62 (2004) y Orlova *et al.*,
20 *Cancer Res.*, 66(8):4339- 48 (2006)). La Figura 2I muestra que fueron necesarias afinidades de unión superiores a 1 nM para desencadenar la fusión en células CHO diseñadas para expresar de manera estable moléculas Her2/neu, pero no en la línea celular parental. Esto era cierto independientemente de la naturaleza del aglutinante, ya fuera en forma de scFv o de molécula de anticuerpo. Para investigar la relación entre la densidad del receptor y la afinidad del
25 aglutinante, se repitió el ensayo de fusión cuantitativo con una serie de líneas de células cancerosas que expresaban diferentes niveles de moléculas Her2/neu en la superficie: HT1080 (1.2 x 10⁴), Sko3pi (1.5 x 10⁵) y TET67L (4.3 x 10³). Mientras que la visualización del anticuerpo con la mayor afinidad de unión (Z342, 0.022 nM) permitió que CDV H desencadenara la fusión en todas las líneas celulares probadas independientemente de la densidad del receptor, Z4 (50
30 nM) permitió la fusión intercelular solo en células Skov3pi, que expresaron la mayor densidad de receptores. Estos resultados demuestran que existe una interacción entre la afinidad por el aglutinante y la densidad del receptor en la célula diana: las densidades de receptor más bajas

tienen efecto con afinidades por el aglutinante más altas.

Los complejos CDV H/F dirigidos a CD46 pueden superar la sensibilidad a la neutralización del virus del sarampión oncolítico

Se desplegaron diferentes aglutinantes de scFv específicos de CD46 en polipéptidos de CDV H en un intento de obtener polipéptidos de scFv-CDV H que soportaran un nivel de fusión similar al de una cepa MeV H Nse. Se compararon los niveles de expresión de la superficie celular (Figura 3A). Un ensayo celular de inmunoabsorción ligado a enzimas (CELISA) mostró que tanto los polipéptidos MeV H no dirigidos como los polipéptidos CDV H, así como los polipéptidos CDV H dirigidos a CD46, se expresaban de manera similar en la superficie celular. A continuación, los ensayos de fusión cuantitativos revelaron que mientras que solo los polipéptidos MeV H dieron como resultado actividad de fusión en células CHO-Nectin-4, todos menos los polipéptidos CDV H no dirigidos produjeron fusión en células CHO-CD46 (Figura 3B). Los aglutinantes de scFv A10, A09, G09 y K2 mostrados en los polipéptidos CDV H indujeron niveles de fusión similares a los observados en los polipéptidos MeV H, mientras que scFv G101469 y K01 fueron comparativamente más bajos. Se eligió el polipéptido CDV H-scFv A09/CDV F para reemplazar la capa de MeV existente. Este virus, denominado en este documento Stealth 2.0, se rescató y se confirmó que los polipéptidos H/F se mostraban con éxito en los viriones. El análisis de Western Blot confirmó que el polipéptido MeV H se detectó solo en el caso de MeV cuando se usó un anticuerpo anti-polipéptido MeV H contra la cola citoplásmica. Por el contrario, el polipéptido CDV H-scFv A09 solo se detectó cuando la membrana se sondeó con un anticuerpo anti 6xHIS-tag (Figura 3C). Este mismo sistema de etiqueta HIS permitió la replicación del virus Stealth 2.0 en células Vero que expresan de forma estable el scFv anti-HIS pero no en la línea celular Vero parental (Figura 3D). La cinética de replicación fue comparable a la obtenida por MeV en Vero/hSLAM. Juntos, estos resultados demuestran que los polipéptidos H y F de la cubierta del virus del sarampión pueden reemplazarse por polipéptidos H y F del CDV sin un impacto negativo en la replicación del virus.

La sensibilidad de neutralización de Stealth 2.0 se estudió utilizando suero combinado de 20 a 30 donantes estadounidenses. Como control, se usaron antisueros de CDV. La Figura 3E muestra que Stealth 2.0 fue insensible a la actividad de neutralización de los antisueros MeV.

Por el contrario, el patrón de neutralización de MeV fue esencialmente el opuesto, siendo

neutralizado por anticuerpos anti-sarampión, pero no por anticuerpos anti-CDV.

Se realizó lo siguiente para confirmar el tropismo del virus dotado por la nueva envoltura ya que la entrada del virus podría ocurrir en ausencia de una fusión evidente. Se observó autofluorescencia de GFP derivada de virus cuando las células CHO expresaron los receptores CD46, Nectin-4 y SLAMF1 canino o humano (Figura 3F). Por el contrario, la autofluorescencia de GFP impulsada por Stealth 2.0 solo se observó en el caso de la expresión de scFv anti-6xHIS (CHO-HIS), CD46 y SLAMF1 canino. Estos resultados demuestran que se puede generar un virus del sarampión humano con tropismo por CD46 resistente a la neutralización de anticuerpos contra el virus del sarampión mediante el uso de una envoltura CDV H/F dirigida a CD46.

Stealth 2.0 induce un efecto antitumoral similar al MeV parental

Se realizó lo siguiente para evaluar el uso de Stealth 2.0 como agente oncolítico. Los ratones SCID que portaban tumores U266.B1 se trataron con una dosis intravenosa única de MeV o Stealth 2.0 (Figura 4A). Los tumores implantados en el grupo tratado con PBS continuaron creciendo exponencialmente (Figura 4B), y todos tuvieron que ser sacrificados debido a la carga tumoral el día 12 (Figura 4C). Por el contrario, ambos grupos de tratamiento tuvieron una progresión tumoral más lenta que resultó en una mediana de supervivencia significativamente mayor. Debido a que se observó una actividad oncolítica similar para Stealth 2.0 y MeV, siendo este último capaz de usar además de CD46, los receptores Nectin-4 y SLAMF1, estos resultados demuestran que la orientación de CD46 es suficiente para la regresión tumoral en un modelo de mieloma múltiple. Además, Stealth 2.0 demostró que podría sustituir a la actual vacuna oncolítica MeV cuando los pacientes presentan altos niveles de anticuerpos neutralizantes contra el virus del sarampión.

Los complejos CDV H/F pueden reorientar otros mononegavirales

Se realizó lo siguiente para investigar la idoneidad de los complejos CDV H/F para regular el tropismo de los VSV, que son miembros del género Lysavirus, familia Rhadoviridae. Un VSV diseñado para expresar interferón-beta (IFN- β) y el simportador de yoduro de sodio (NIS), VSV-hIFN β -NIS, (Naik *et al.*, *Mol. Cancer Ther.*, 17(1):316-326 (2018)) se obtuvo y modificó reemplazando el polipéptido VSV-G con CDV H y polipéptidos F usando las

polipéptidos utilizando las técnicas descritas en otro lugar (Ayala-Breton *et al.*, *Hum. Gene Ther.*, 23(5):484-91 (2012)). Se usaron el polipéptido CDV F_{22458/16} y el polipéptido CDV H₅₈₀₄ original (VSV-CDVFH-GFP) o el polipéptido CDV H redirigido contra los receptores EGFR (VSV-CDVFHaal- α EGFR-GFP) o CD38 (VSV-CDVFHaal- α CD38-GFP) (Figura 5). Además, cada uno de los polipéptidos CDV H contenía una mutación R529A (CDV Haa) dentro del fondo CDV H_{Y539A} existente para anular la interacción con SLAMF1 canino.

Para confirmar que el nuevo complejo de la cubierta gobernaba el tropismo del virus, se infectó un panel de células CHO que expresaban receptores específicos. Como se muestra en la Figura 6, cuando el virus mostró el complejo CDV F/H parental, se observó autofluorescencia de GFP en aquellas células que expresaban Nectin-4 o receptores SLAMF1 caninos. Por el contrario, cuando estaba presente el scFv CDV H específico de EGFR, solo se observó infección y autofluorescencia de GFP en aquellas células que expresaban el receptor de EGFR. Asimismo, cuando estaba presente el scFv CDV H específico de CD38, solo se observó infección y autofluorescencia de GFP en aquellas células que expresaban el receptor CD38. En este caso, se observó la formación de sincitios y el efecto de destrucción de células en las células que expresaban CD38, pero no en las células CHO que expresaban los receptores EGFR; mientras que se observó un patrón opuesto con el virus específico de EGFR (VSV-CDVFHaal- α EGFR-GFP) (Figura 7). Estos resultados demuestran en el contexto de los rabdovirus que los complejos CDV F/H se pueden usar para controlar la entrada celular y la formación de sincitios de manera específica del receptor a través de la presentación de scFv usando un receptor de elección para redirigir el tropismo del virus.

El uso de este sistema como vector oncolítico también se evaluó in vivo (Figura 8). Se trató a ratones desnudos atímicos con tumores SKOV3ip.1 con una dosis única de VSV dirigido a EGFR o VSV-hIFN β -NIS que actualmente se está probando en la clínica. Mientras que VSV-hIFN β -NIS no mejoró la supervivencia frente a los controles tratados con PBS, el VSV dirigido a EGFR resultó en una mejora significativa de la supervivencia ($p < 0.005$). Estos resultados demuestran que los VSV dirigidos descritos en este documento se pueden usar con fines oncológicos.

30 CD38 y EGFR dirigidos a MeV

Se realizó lo siguiente para confirmar que el direccionamiento de CD38 y EGFR en el contexto de MeV puede lograrse usando polipéptidos CDV F y H (Figura 11).

Para aumentar la seguridad, se insertaron mutaciones adicionales en el polipéptido CDV H para dificultar una posible reversión al uso de receptores naturales (Sawatsky *et al.*, *J. Virol.*, 92(15):e0069-18 (2018)). Además de la sustitución de aminoácido R529A, también se incluyeron las sustituciones D526A, I527A, S528A, R529A, Y539A, Y547A y T548 (Figura 11A). La Figura 11B muestra que la introducción de estas mutaciones en el contexto del polipéptido CDV H dirigido a CD38 no influyó en la capacidad de fusogenicidad. De manera similar, la Figura 11C demuestra que las diferentes mutaciones puntuales no influyeron en la sensibilidad de neutralización de los polipéptidos al suero humano inmune al sarampión. Aunque la actividad de fusión del polipéptido MeV H dirigido a CD38 fue inhibida por antisueros de sarampión agrupados hasta una dilución de 1:80, el polipéptido CDV H homólogo dirigido a CD38 no estaba en la concentración más alta probada de una dilución 1:10. Similar al caso de los rabdovirus, el virus del sarampión que incorpora los complejos CDV H/F dirigidos podría infectar y fusionar células de una manera específica de CD38 o EGFR (Figura 11D). Esta especificidad de infección también se observó con una serie de líneas de células tumorales. Las células Skov3pi y U87 (EGFR-positivas) fueron infectadas por virus dirigidos a EGFR, pero no por virus dirigidos a CD38. Por el contrario, las líneas celulares Raji y Ramos (CD38 positivas) fueron infectadas exclusivamente por los virus dirigidos a CD38. Como control, las células que expresaban el pseudorreceptor 6xHIS ("6xHIS" divulgado como ID SEC N.º: 21) se infectaron con todos los virus redirigidos. Estos resultados demuestran que los complejos CDV F/H pueden usarse para evitar la inmunidad contra el sarampión e impulsar la entrada dirigida a las células y la formación de sincitios.

También se investigó la actividad oncolítica in vivo de CD38 y MeV dirigido a EGFR. Los tumores SKOV3ip.1 se implantaron por vía subcutánea o intraperitoneal en ratones desnudos atímicos, seguido de tratamiento con virus utilizando la misma vía (Figura 11E). Aunque los virus dirigidos a CD38 mostraron cierta potencia terapéutica, la potencia exhibida por los virus dirigidos a EGFR fue superior (Figura 11F). Por el contrario, los virus dirigidos a CD38 no exhibieron potencia antitumoral después de la inyección intraperitoneal, mientras que los virus dirigidos a EGFR dieron como resultado una regresión tumoral completa según se observó en un porcentaje de supervivencia del 100 %. Cabe destacar que no se observaron diferencias entre los MeV redirigidos con los complejos MeV H/F o CDV H/F. Estos resultados demuestran que los complejos CDV H/F pueden potenciar las propiedades antitumorales del virus oncolítico del sarampión sin el problema de ser neutralizados por los anticuerpos neutralizantes inducidos por

el sarampión.

Ejemplo 2: análisis adicional de virus del sarampión oncolíticos específicos de CD46 resistentes a la neutralización por suero humano inmune al sarampión

Este ejemplo repite parte de la información y los resultados del Ejemplo 1 además de proporcionar resultados adicionales.

Las combinaciones heterólogas de glicoproteínas de CDV de tipo salvaje dan como resultado una fusión mejorada de la membrana celular

La cubierta de MeV se reemplazó con una cubierta viral alternativa que permitiría que el virus evadiera la neutralización por parte de los anticuerpos contra el sarampión. Para hacer esto, se seleccionó CDV de tipo salvaje. Si bien existe una cepa de CDV aprobada para uso en vacunas (la cepa Onderstepoort), esta cepa puede usar un receptor actualmente no identificado además de SLAMF1 y Nectin-4 (Figura 14), lo que habría dificultado la modificación del tropismo viral. Por lo tanto, se centró la atención en las cepas de tipo salvaje, ya que se sabe que interactúan exclusivamente con SLAM y nectina-4.

Se realizó lo siguiente para identificar el par de glicoproteínas CDV H/F más fusogénicas. Se expresaron transitoriamente diferentes combinaciones H/F de los aislados 5804P y SPA.Madrid/16 (en lo sucesivo denominados 5804 y SPA, respectivamente) en células Vero que expresan SLAMF1 o NECTIN4 y evaluaron cualitativamente el grado de fusión celular (formación de sincitios) inducido por las proteínas virales. No se observó actividad de fusión para los pares CDV-H/F cuando se mantuvo el péptido señal de 135 aa en CDV-F (Figura 15A). Cuando se intercambió por el homólogo de MeV F, la coexpresión de las proteínas H/F de 5804P dio como resultado la fusión celular en células que expresaban SLAMF1 y NECTIN4, mientras que la coexpresión de las de SPA promovió la fusión celular exclusivamente en células Vero que expresaban SLAMF1. Por otro lado, la coexpresión de la combinación heteróloga CDV-H 5804 y CDV-F SPA, pero no de CDV-H SPA y CDV-F 5804, dio como resultado la formación de sincitios en células Vero que expresan SLAMF1 y NECTIN4.

Los datos resumidos anteriormente proporcionaron evidencia en apoyo de un defecto de fusión en CDV-H SPA. Comenzar a abordar si la falta de fusión de CDV-H SPA en las células que expresan NECTIN4 se debió a una menor afinidad por el receptor, los fenotipos de fusión se compararon cuantitativamente a través de receptores no naturales, nivelando así el campo de

juego para la afinidad de unión al receptor. Este enfoque consistía en fusionar un scFv específico de CD38 etiquetado con His al dominio C-terminal de las proteínas de unión al receptor y determinar los niveles de fusión en células CHO que codifican CD38 o el pseudorreceptor para la etiqueta HIS (CHO- α HIS). Se incluyó una sustitución L437M en CDV-H SPA ya que L437 correspondía a una mutación específica de clon no presente en ningún otro grupo genético de CDV (Figura 16). Con fines comparativos, se incluyeron además proteínas de unión a receptores redirigidos de otros virus: MeV-H- y Nipah-G (Bender *et al.*, *PLoS Pathog.*, 12(6):e1005641 (2016); y Nakamura *et al.*, *Nat Biotechnol.*, 22(3):331-6 (2004)). Para añadir rigor a las comparaciones, la expresión de las proteínas de unión al receptor se analizó inicialmente mediante análisis de transferencia Western y citometría de flujo, que no demostraron un impacto significativo en el plegamiento de proteínas o la expresión superficial (Figuras 17A y 17B). Cuando los pares CDV-H/F de las proteínas SPA se expresaron en CHO-CD38, solo CDV-H SPA con M437L promovió la fusión (Figura 15B). En particular, no se observaron diferencias significativas en la capacidad de fusión entre los dos pares homotípicos de CDV-H/F de los aislamientos SPA o 5804P. Sorprendentemente, la actividad de fusión provocada por la combinación heteróloga de H/F CDV-H 5804/F SPA superó la conseguida por las combinaciones homólogas de CDV-H/F 5804 y CDV-H/F SPA. Para el par Nipah G/F redirigido, aunque se observaron niveles de fusión significativos en células CHO-CD38 ($p < 0.0001$), fueron insignificantes en comparación con los obtenidos por el par CDV H/F OL no redirigido.

Sobre la base de este conjunto de experimentos, se seleccionó el par hiperfusogénico CDV-H 5804/F SPA para una mayor investigación y modificación.

La fuerza de la interacción CDV H/F se correlaciona inversamente con la eficiencia de fusión de célula a célula.

La fusión mejorada de la membrana celular observada para el par CDV-H 5804/F SPA podría estar relacionada con una menor avidéz de unión en la interfaz H/F. Esto se basó en la observación de que la disociación H/F es esencial para el proceso de fusión (Plempner *et al.*, *J. Virol.*, 76(10):5051-61 (2002); y Bradel-Tretheway *et al.*, *J. Virol.*, 93(13) (2019)). Para probar la hipótesis, se evaluaron las fuerzas relativas de asociación de diferentes combinaciones de proteínas CDV-H y F mediante ensayos de coinmunoprecipitación (co-IP). Para facilitar la detección, CDV-F SPA se fusionó con una etiqueta FLAG, que no tuvo efecto sobre la

bioactividad de la proteína (Figura 18). Los resultados, presentados en la Figura 15C, mostraron que la presencia de la mutación M437L en CDV-H SPA debilitó su afinidad por CDV-F SPA. Además, la afinidad de CDV-F SPA por CDV-H 5804 fue ligeramente menor que la de CDV-F SPA por CDV-H SPA (Figura 15C). En conjunto, estos datos indican que existe una correlación inversa entre los niveles de fusogenicidad y la fuerza de la interacción CDV-H/F.

Las glicoproteínas de la cubierta del CDV completamente redirigidas muestran una actividad de fusión comparable a las glicoproteínas MeV

Las proteínas CDV-H descritas anteriormente todavía podrían usar NECTIN4 como receptor (Figura 15A). Para maximizar la eficiencia de la reorientación, la proteína CDV-H necesitaba ser desviada de esta interacción indeseable con las células humanas. Para determinar si la ablación de este tropismo natural afectaría la fusión celular inducida por la unión de CDV-H/F a un receptor no natural, se introdujo una mutación Y539A en CDV-H, que corresponde a Y543A en MeV-H, mutación que fue previamente demostrado que anula la fusión dependiente de NECTIN4 (Mateo *et al.*, *J. Virol.*, 87(16):9208-16 (2013)) sin afectar la expresión de la superficie celular (Sawatsky *et al.*, *J. Virol.*, 86 (7):3658-66 (2012)). A continuación, se comparó la capacidad de fusión de CDV-H 5804 (Y539A) 5804/F SPA con la de un par MeV-H/F completamente redirigido (Nakamura *et al.*, *Nat. Biotechnol.*, 23(2):209-14 (2005)). Para ello, se utilizó el ensayo de fusión cuantitativo y cinético basado en una proteína reportera GFP/luciferasa de doble división. Los datos, presentados en la Figura 15D, indican que el CDV-H 5804 (Y539A) dirigido a CD38 no tuvo actividad de fusión en células CHO-NECTIN-4 pero indujo la fusión en células CHO- α HIS (construcción CDV H 5804 (Y539A)/F SPA y CDV H 5804 (Y539A) α CD38/F SPA) y células CHO-CD38 (CDV H 5804 (Y539A) α CD38/F SPA). Debido a que la actividad de fusión del par NECTIN-4 ciego CDV-H 5804/F SPA fue comparable a la obtenida con la proteína MeV-H totalmente redirigida, se concluyó que CDV-H 5804 (Y539A) puede redirigir eficientemente la proteína CDV-H /F a receptores específicos, y esta proteína se seleccionó para su incorporación en el virus completamente redirigido.

La afinidad de unión determina la reorientación eficiente de los complejos CDV H/F a CD46

Dado que la proteína CDV-H seleccionada como se describió anteriormente podría redirigirse eficientemente a CD38 mediante la fusión de un scFv específico de CD38, esta proteína se redirigió a continuación a CD46 mediante la presentación de un scFv específico de CD46. Se postuló que la presentación C-terminal en CDV-H de un scFv que reconocía CD46 con

una afinidad de unión suficientemente alta daría como resultado una actividad de fusión de célula a célula mediada por CD46 similar a la inducida por el complejo MeV H/F. Para probar esto, se identificó un scFv anti-CD46 con alta afinidad por CD46 evaluando la unión a CD46 purificado de varias variantes de scFv diferentes aisladas de una biblioteca de expresión de anticuerpos en fagos (Figura 19). La tecnología de resonancia de plasmones superficiales se aplicó utilizando chips sensores con anticuerpos anti-Fc inmovilizados covalentemente. Las proteínas de fusión quiméricas Fc-scFv se capturaron en la superficie del sensor que posteriormente se interrogó con CD46 soluble que comprende SCR1-4 (Figura 20A). En estas condiciones de ensayo, los resultados mostraron que las constantes de afinidad (K_d) de las proteínas de fusión quiméricas Fc-scFv que mostraban los fragmentos A09 y K2 eran significativamente más fuertes que las de los fragmentos K01 y N1E ($A09 > K2 > N1E > K2$), principalmente debido a una mayor asociación (A09) o menores tasas de disociación (K2) (Tabla 4, Figura 20B).

Tabla 4. Constantes de velocidad cinética y de afinidad para la unión de fragmentos variables monocatenarios a CD46.

Interacción	$K_{on} \times 10^4$ (M ⁻¹ s ⁻¹)	$K_{off} \times 10^{-3}$ (s ⁻¹)	K_D (nM)
scFv A09-CD46	3.34 ± 1.68	0.606 ± 0.07	21.4 ± 7.82
scFv K2-CD46	24.0 ± 3.79	10.8 ± 1.81	44.8 ± 13.3
scFv N1E-CD46	3.69 ± 1.28	5.16 ± 2.21	139 ± 22.6
scFv K1-CD46	4.13 ± 0.77	11.5 ± 2.58	287 ± 97.5

Las reacciones de asociación (K_{on}) y disociación (K_{off}) se determinaron con un instrumento BIACORE T100 utilizando un modelo de unión Langmuir 1:1.

Se realizó lo siguiente para determinar si la fusión de un scFv con la proteína CDV-H puede soportar la fusión dependiente de CD46 y, de ser así, cómo afectaría la afinidad de unión

a CD46 a la fusión celular. El enfoque principal fue realizar ensayos de fusión cuantitativos para los pares de CDV H [5804 (Y539)] y CDV-H [5804 (Y539)-scFv]/F desorientados y compararlos con el complejo MeV/F no modificado en CHO células y células CHO que expresan NECTIN4 o CD46. Todas las proteínas se expresaron a niveles comparables (Figura 21). Con la excepción de scFv K01, todos los demás scFv anti-CD46 permitieron que el complejo CDV-H/F indujera la fusión de célula a célula en células CHO-CD46 (Figura 20C) y en una línea celular HeLa con alta expresión de CD46 (Figura 21). Sólo el complejo MeV-H/F indujo la fusión de célula a célula en células CHO-NECTIN-4.

Se concluyó a partir de este conjunto de experimentos que existe un umbral de afinidad de unión para la fusión célula-célula mediada por CD46 a través de los complejos CDV H/F redirigidos y por encima de este umbral existe una correlación positiva entre la afinidad de unión y la fusión intercelular.

Las glicoproteínas de la cubierta del CDV dirigidas a CD46 se incorporan de manera eficiente en los viriones MeV y median la entrada del virus de acuerdo con su afinidad de unión.

Se realizó lo siguiente para investigar si una mayor afinidad por el receptor se traducía en una mayor infectividad del virus. Para comenzar a abordar esta pregunta, se generó un panel de MeV isogénicos donde la capa de MeV se reemplazó con CDV-F SPA junto con CDV-H 5804 (Y539A) que muestra una afinidad baja (K1), intermedia (N1E) y alta (A09). scFv específico para CD46 (Figura 22A). Estos virus "Stealth" se diseñaron aún más para expresar eGFP o luciferasa de luciérnaga como genes informadores y se rescataron en células Vero- α HIS. A continuación, se evaluó la capacidad de los virus Stealth para infectar células CHO-CD46 o la línea celular productora (Vero- α HIS). Los datos, presentados en la Figura 22B, mostraron que los tres virus Stealth inducían eficazmente la formación de sincitios en células Vero- α HIS, pero solo Stealth-A09 formaba sincitios en células CHO-CD46. Stealth-N1E dio lugar a pequeños grupos de células CHO-CD46 positivas para GFP no fusionadas, mientras que Stealth-K1 aparentemente no logró infectarlos (Figura 22B). Cuando se usó luciferasa como indicador de infección, se detectó infección dependiente de CD46 con Stealth-K1, pero los niveles de luciferasa fueron significativamente más bajos que los obtenidos cuando las células se infectaron con Stealth-A09 (Figuras 22C y 23), lo que indica que la unión a CD46 determina la eficiencia de la entrada del virus.

En base a su entrada superior de virus dependiente de CD46, Stealth-A09 (este virus se denominó Stealth 2.0 en el Ejemplo 1) se seleccionó para una caracterización adicional. Stealth-A09 se replicó en células Vero- α HIS pero no en la línea celular Vero parental, lo que indica una replicación eficiente del virus a través del pseudorreceptor HIS y una falta de interacción con CD46 del mono verde africano (Figura 22D). Para estimar la proporción relativa de partículas a infectividad de Stealth-A09 en relación con el MeV original, se realizó un análisis de transferencia Western en preparaciones de virus para detectar la proteína estructural principal (N), y no se observaron diferencias significativas en los niveles de expresión (Figura 22E). Dado que se analizaron números equivalentes de partículas de virus, los datos sugieren proporciones similares de partículas a unidades formadoras de placa (PFU) para los dos virus, lo que indica una incorporación eficiente en los viriones de la envoltura extraña. A continuación, se examinó completamente el tropismo específico del receptor de los virus infectando un panel de células CHO que expresaban de manera estable α HIS, CD46, NECTIN-4 o SLAMF1 humano o canino. Los resultados, presentados en la Figura 22F, mostraron que MeV infectó células CHO que expresaban los receptores CD46 y NECTIN-4 y SLAMF1 canino o humano, mientras que Stealth-A09 solo infectó células CHO- α HIS, CHO-CD46 y CHO-dogSLAM, lo que indica que Stealth-A09 se vuelve a dirigir de manera eficiente contra el CD46 humano.

De acuerdo con un informe reciente que muestra que CDV-H no se une a SLAMF1 humano (Fukuhara *et al.*, *Viruses*, 11(8) (2019)), no se observó la entrada de MeV-Stealth-A09 en CHO-hSLAMF1 (Figura 22F). Sin embargo, se ha observado la adaptación al SLAMF1 humano a través de una cepa de CDV diferente (Bieringer *et al.*, *PLoS One*, 8(3):e57488 (2013)). Por lo tanto, para evaluar la probabilidad de que MeV-Stealth se adapte a SLAMF1 humano, el virus se pasó consecutivamente en células Vero-hSLAMF1 y se analizó el tropismo viral. Las células infectadas se sometieron a pases ciegos ocho veces a intervalos de 5 días antes de probar el tropismo. Se ha demostrado previamente que este número de pases es suficiente para inducir la adaptación cíclica de las cuasiespecies del virus del sarampión (Donohue *et al.*, *PLoS Pathog.*, 15(2):e1007605 (2019)). Como se muestra en la Figura 22G, al final de esta presión selectiva, MeV-Stealth-A09 aún podía inducir la formación de sincitios solo en células Vero-dogSLAMF1, no en células Vero o Vero-hSLAMF1, donde solo se detectaron células GPF-positivas discretas. observado. Por lo tanto, los datos argumentan en contra de una adaptación potencial para permitir el uso del receptor patógeno humano SLAMF1.

En conjunto, estos resultados indican que las glicoproteínas MeV H/F pueden intercambiarse con las glicoproteínas CDV-H/F redirigidas a CD46 y que la entrada en la célula depende de la afinidad del receptor.

5 *La actividad oncolítica de MeV-Stealth depende de su afinidad de unión a CD46*

Se realizó lo siguiente para determinar el potencial antitumoral de los virus Stealth y el papel de la afinidad de unión a CD46 in vivo. Para ello, ratones atímicos portadores de tumores SKOV3ip.1 diseminados peritonealmente que expresan el gen de la luciferasa de luciérnaga (SKOV3ip.Fluc) fueron tratados con una única dosis intraperitoneal de solución salina o 10^6 TCID₅₀ de Stealth-N1E y Stealth-A09 (n=5). A continuación, se controló la carga tumoral utilizando imágenes de bioluminiscencia in vivo (Figura 24A). Para el día 7, se observó una reducción comparable en la carga tumoral en los animales que recibieron Stealth-N1E o Stealth-A09 en comparación con el grupo de control (Figura 24B). Sin embargo, la significación estadística en la reducción de la carga tumoral se perdió para el grupo Stealth-N1E el día 21, mientras que este no fue el caso para el grupo Stealth-A09. La comparación de las curvas de supervivencia mostró que solo MeV Stealth-A09 aumentó la supervivencia de los ratones en comparación con el grupo de control. Por lo tanto, Stealth-A09 muestra una potencia oncolítica que parece depender de su mayor afinidad por CD46.

20 *MeV-Stealth logra oncólisis y prolonga la supervivencia de ratones con mieloma y tumores de ovario*

Se realizó lo siguiente para evaluar la utilidad de MeV-Stealth-A09 sobre MeV como agente oncolítico. Para esto, inicialmente dejamos ratones sin tratar (grupo tratado con PBS) o tratados con inmunodeficiencia combinada severa (SCID) que portaban xenoinjertos subcutáneos de mieloma humano (derivados de células U266.B1) con una dosis intravenosa subóptima de MeV-Stealth o MeV. Los tumores en el grupo tratado con PBS continuaron creciendo exponencialmente y todos los ratones tuvieron que ser sacrificados debido a la carga tumoral el día 12 (Figura 25A). El tratamiento con MeV o MeV-Stealth-A09 ralentizó la progresión del tumor, dando como resultado un tiempo de supervivencia medio significativamente mayor de 7 y 5 días, respectivamente (Figura 25B). Para evaluar si el efecto oncolítico se debía a la replicación del virus, se realizó un análisis histológico de los tumores explantados. Los resultados, presentados en la Figura 25C, indicaron claramente que ambos virus podían alojarse

en el tejido tumoral. Estos resultados sugirieron fuertemente que Stealth dirigido a CD46 induce oncolisis a niveles similares en comparación con MeV, que se dirige tanto a CD46 como a SLAMF1, lo que induce la regresión del tumor en este modelo de mieloma múltiple.

A continuación, se evaluó el efecto terapéutico de MeV-Stealth-A09 en la prolongación de la supervivencia en presencia de suero inmune al sarampión. Antes de embarcarse en este estudio in vivo, primero se evaluó in vitro la sensibilidad a la neutralización de los virus recombinantes. Los resultados, presentados en la Figura 26, mostraron que MeV-Stealth-A09 era insensible a la actividad neutralizante del suero humano inmune al sarampión, mientras que estaba completamente neutralizado por el suero de hurón o ratón inmune al CDV. El patrón opuesto se observó esencialmente para MeV (Figura 23). A continuación, se implantaron células SKOV3ip.Fluc en las cavidades peritoneales de ratones desnudos atímicos, que recibieron PBS o suero humano inmune al sarampión antes de una única inyección intraperitoneal de MeV o MeV-Stealth (Figura 27A). Los animales que no recibieron ninguna inyección de virus, así como los tratados con MeV en presencia de suero inmune, exhibieron una alta actividad de bioluminiscencia que siguió aumentando con el tiempo (Figura 27B), lo que indica que MeV no podía ejercer oncolisis en presencia de suero preexistente. inmunidad. Por el contrario, las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier indicaron que, en ausencia de suero inmune, ambos tratamientos con virus oncolíticos (OV) prolongaron significativamente la supervivencia de los ratones, con una mediana de supervivencia de 37 días para los ratones tratados con MeV y de 53 días para los tratados con MeV. Ratones tratados con sigilo frente a una mediana de supervivencia de 18 días para los ratones de control (Figura 27C). Sin embargo, la supervivencia prolongada después del tratamiento con MeV se anuló por completo cuando los ratones recibieron suero inmune contra el sarampión, mientras que el tratamiento con MeV-Stealth todavía pudo prolongar significativamente la supervivencia (tiempo de supervivencia medio de 28 días) sin diferencia estadística sobre el tratamiento en ausencia de suero inmune..

Estos resultados demuestran que la orientación de CD46 impulsa la oncolia tanto en un modelo de mieloma de xenoinjerto como en un modelo ortotrópico de cáncer de ovario, y que el intercambio de la cubierta de MeV por el aparato de fusión CDV-H/F homólogo protege a MeV del suero humano inmune a MeV.

Métodos y materiales

Líneas celulares

Células de riñón de hámster bebé (BHK, N.º de catálogo CCL-10, ATCC, Manassas, VA, EE. UU.), Células epiteliales de riñón humano (HEK293T) obtenidas del Dr. François-Loïc Cosset (Universidad de Lyon) y células de cáncer de ovario humano línea SKOV3ip.1-Fluc (*Mader et al., Clin. Cancer Res.*, 15(23):7246-55 (2009)) se mantuvieron en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM; N.º de catálogo SH30022.01, GE Healthcare Life, Pittsburg, PA, EE. UU.) suplementado con suero fetal bovino al 5 % (FBS; Cat. n.º 10437-028; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.). Células de riñón de mono verde africano Vero (Vero, ATCC, N.º de catálogo CCL-81) y sus derivados (que expresan NECTIN-4 humana (Noyce *et al., Virology*, 436(1):210-20 (2013)), SLAMF1 humana (Ono *et al., J. Virol.*, 75(9):4399-401 (2001)) o un fragmento variable monocatenario anclado a la membrana (scFv) específico para un péptido de hexahistidina (etiqueta 6x HIS (ID SEC N.º: 21)) (Nakamura *et al., Nat. Biotechnol.*, 23(2):209-14 (2005)) se cultivaron en DMEM (N.º de catálogo SH30022.01, GE Healthcare Life Sciences) como se describe en otra parte (Munoz -Alia *et al., Viruses*, 11(8) (2019)). Se generaron células Vero que expresan constitutivamente la molécula canina SLAMF1 (Vero-dogSLAMF1) mediante transducción y selección con puromicina de un vector lentiviral de segunda generación (amablemente proporcionado por el Dr. Lukkana Suksanpaisan [Imanis Life Science, Rochester, MN, EE. UU.]) que codifica, bajo el control del promotor del virus formador de focos del bazo, una molécula SLAMF1 con codones optimizados de *Canis lupus familiaris* (GenBank NP_001003084.1) con un N-terminal FLAG -etiqueta s secuencia (DYKDDDD (ID SEC N.º: 28)). Las células se mantuvieron en DMEM suplementado con FBS al 5%. La línea celular de ovario de hámster chino (CHO), las células CHO-CD46, las células CHO-hSLAMF1, las células CHO-dogSLAMF1, las células CHO-NECTIN4, las células CHO-αHIS, las células CHO-CD38 y la línea celular de mieloma humano U266.B1 (amablemente proporcionados por el Dr. David Dingli [Mayo Clinic, Rochester, MN]) se cultivaron en medio RPMI 1640 complementado con 10% de FBS. Las células se incubaron a 37 °C en CO2 al 5 % con humedad saturada.

Plásmidos y construcción del virus del sarampión recombinante de genoma completo (MeV)

Para generar plásmidos de expresión del virus del moquillo canino (CDV) SPA.Madrid/22458/16, se extrajo el ARN total de células Vero/perro SLAMF1 infectadas con aislamiento de CDV SPA.Madrid/22458/16 (pasaje 1) usando el RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden,

Alemania). Tanto el gen CDV-hemaglutinina (H) como el CDV-fusión (F) se transcribieron inversamente con SuperScript III Reverse Transcriptase (N.º de catálogo 11752050, Thermo Fisher Scientific) y se amplificaron mediante PCR con los siguientes cebadores: CDVH7050(+): 5' -AGAAACTTAGGGCTCAGGTAGTCC;-3' (ID SEC N.º: 22) CDVH8949(-): 5'-TCGTCTGTAAGGGATTCTCACC-3' (ID SEC N.º: 23); CDVF4857(+): 5'-AGGACATAGCAAGCCAACAGG-3' (ID SEC N.º: 24) y CDVH7050(-): 5'-GGACTACCTGAGCCCCTAAGTTTTCT-3' (ID SEC N.º: 25). Los productos de PCR se secuenciaron directamente mediante secuenciación de Sanger (Genewiz, Plainfield NJ, EE. UU.) y se clonaron en el vector pJET1.2 (Thermo Fisher Scientific). A continuación, el marco de lectura abierto de CDV-H se amplificó por PCR con un cebador directo (5'-CCG GTA GTT AAT TAA AAC TTA GGG TGC AAG ATC ATC GAT AAT GCT CTC CTA CCA AGA TAA GGT G-3' (ID SEC N.º: 26)) y un cebador inverso (5'-CTA TTT CAC ACT AGT GGG TAT GCC TGA TGT CTG GGT GAC ATC ATG TGA TTG GTT CAC TAG CAG CCT CAA GGT TTT GAA CGG TTA CAG GAG-3' (ID SEC N.º: 27)) y clonado en un vector pCG restringido a PacI y SpeI (New England Biolabs, Ipswich, MA, EE. UU.) (Cathomen *et al.*, *J. Virol.*, 72(2):1224-34 (1998)) usando un InFusion Kit HD (Takara, Shinagawa, Tokio, Japón). Los cebadores contenían los sitios de restricción PacI y SpeI (subrayados), así como la secuencia codificante de la región no traducida de MeV-H (cursiva). De manera similar, el marco de lectura abierto de CDV-F (residuos de aminoácidos 136-662) se clonó en el plásmido pCG-CDV-F restringido por HpaI/SpeI (von Messling *et al.*, *J. Virol.*, 75(14):6418 -27 (2001)). El plásmido resultante pCG-CDV-F SPA.Madrid/22458/16 contenía secuencias codificantes para la región no traducida de MeV-F y el péptido señal.

Los plásmidos de expresión para la vacuna CDV-H/F Onderstepoort y el aislado 5804P (von Messling *et al.*, *J. Virol.*, 75(14):6418-27 (2001)), así como la cepa MeV Nse, se describieron en otro lugar (Cathomen *et al.*, *J. Virol.*, 72(2):1224-34 (1998)). El péptido señal para CDV-F 5804 se reemplazó con MeV-F heterólogo como se describe anteriormente para CDV-F SPA.Madrid/22458/16. Los marcos de lectura abiertos de los genes de la glicoproteína Nipah-G y Nipah-F se amplificaron a partir de plantillas de ARN compradas (N.º de catálogo NR-37391, BEI Resources), y el gen Nipah-F (GenBank AF212302.2) se insertó en el pCG vector usando los sitios NarI y PacI. Se generaron versiones redirigidas de las proteínas H/G insertando el producto PCR digerido con PacI/SfiI homólogo en pCGHX α -CD38 (Peng *et al.*, *Blood*, 101(7):2557-62

(2003)). La inserción de la secuencia codificante para un scFv que reconoce CD46 se realizó intercambiando el scFv anti-CD38 a través de los sitios de restricción SfiI y NotI. Se usó mutagénesis dirigida al sitio (QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit, Agilent Technologies, Santa Clara CA, EE. UU.) para eliminar el tropismo de H y eliminar el sitio SpeI en CDV-F.

5 Los virus usados en este ejemplo se derivaron del clon de ADNc molecular de la cepa pB(+)/MVvac2(ATU)P de la vacuna Moraten/Schwart, con una unidad transcripcional adicional cadena abajo del gen de la fosfoproteína (Cathomen *et al.*, *J. Virol.*, 72(2):1224-34 (1998) y Munoz-Alia *et al.*, *Viruses*, 11(8) (2019)). Para evitar la inestabilidad del plásmido tras la propagación en bacterias y aumentar la eficacia del rescate del virus, la columna vertebral del
10 plásmido se reemplazó con el vector pSMART LCKan (N.º de cat. 40821-1; Lucigen, Middleton, WI, EE. UU.), con un promotor T7 optimizado seguido de un propio ribozima de cabeza de martillo escindible (Hrbz) (Beaty *et al.*, *mSphere*, 2(2) (2017); y Muñoz-Alia *et al.*, *Viruses*, 11(8) (2019)). Se clonaron eGFP o luciferasa de luciérnaga en el clon infeccioso usando los sitios de restricción únicos MluI/AatII. El rescate de los rMeV se llevó a cabo empleando el sistema START
15 (Nakamura *et al.*, *Nat. Biotechnol.*, 23(2):209-14 (2005)).

Expresión de proteínas recombinantes

Se produjo un plásmido que codifica la proteína de fusión CD46-Fc fusionando el ectodominio CD46 (residuos 35-328) con el dominio Fc de IgG1 (pfc1-hg1e3; InvivoGen, San
20 Diego, CA, EE. UU.). Los scFvs K1, K2 y A09 se diseñaron con las secuencias VL y VH separadas por un enlazador flexible GSSGGSSSG (ID SEC N.º: 29), con codones optimizados, sintetizados y clonados en pUC57-Kan (GenScript). Se diseñó un cuarto scFv (N1E) con las secuencias VH y VL separadas por un enlazador SSGGGGS (ID SEC N.º: 30), optimizado por codones, sintetizado por Creative Biolabs (Shirley, NY) y clonado en pCDNA3.1+ (Invitrogen).
25 Para las construcciones de IgG, los scFv se clonaron en los sitios únicos AgeI y KpnI de pHL-FcHIS (N.º de catálogo 99846, Addgene, Cambridge, MA, EE. UU.), que albergan la secuencia de codificación para una señal de secreción y una región Fc humana C-terminal. seguido de una etiqueta HIS de 6x (ID SEC N.º: 21). Las proteínas recombinantes se expresaron mediante la transfección de células en suspensión Expi293F (Thermo Fisher) en medio de expresión Expi293
30 sin suero (Thermo Fisher) en matraces agitadores siguiendo las instrucciones del fabricante. Los

sobrenadantes de cultivo que contenían las proteínas recombinantes se recogieron y se pasaron a través de un cartucho de cromatografía de Proteína G (N.º de catálogo 89926, ThermoFisher). Las proteínas recombinantes unidas se eluyeron con glicina 0.1 M (pH 2,0), seguidas de una neutralización inmediata con Tris 1 M (pH 8,0), y las proteínas aisladas se concentraron con un concentrador centrífugo Amicon Ultra (Millipore Sigma, Burlington, MA, EE. UU.). CD46 y NECTIN4 se liberaron de la región Fc mediante incubación con proteasa HRV 3C (Thermo Fisher) en una proporción de 1:200. Se realizó un paso de purificación final usando una columna de filtración de gel Superdex 75 10/300 (GE Healthcare) equilibrada en solución salina tamponada con fosfato (PBS). Las concentraciones de proteínas se calcularon a partir del coeficiente de extinción de proteínas determinado a partir de la composición de aminoácidos.

Ensayos de fusión

Las células se transfectaron usando Eugene HD (PROMEGA, Fitchburg WI, EE. UU.) o el reactivo de transfección TransIT-LT1 (Mirus Bio LLC, Madison WI, EE. UU.). Para un ensayo de fusión cuantitativa, se utilizó un sistema informador de doble división (Kondo *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 285(19):14681-8 (2010); e Ishikawa *et al.*, *Protein Eng. Des. Sel.*, 25(12):813-20 (2012)) como se describe en otra parte (Munoz-Alia *et al.*, *Viruses*, 11(8) (2019)), usando células BHK como células efectoras. Para la evaluación semicuantitativa de la fusión, se transfectaron células Vero y líneas celulares derivadas con un total de 0.1 µg de ADN (proporción 1:1 de plásmidos de expresión de H y F), incluido un plásmido de expresión de GFP para visualización adicional de la formación de sincitios. Las imágenes se obtuvieron con un microscopio (Eclipse Ti-S; Nikon) con un aumento de 40x o 100x.

Análisis de expresión de proteínas de unión de Morbillivirus

Para la evaluación del nivel del polipéptido H, las células transfectadas se analizaron mediante citometría de flujo o ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas celulares (CELISA) utilizando un anticuerpo monoclonal anti-6x HIS-tag (N.º de catálogo 130-120-787, Miltenyi Biotec o N.º de catálogo MA1-135, Thermo Fisher Scientific), como se describe en otro lugar (Munoz-Alia *et al.*, *Viruses*, 11(8) (2019); y Saw *et al.*, *Methods*, 90:68-75 (2015)). Para el análisis de la expresión de proteínas totales mediante citometría de flujo (FACSCanbt, BD Biosciences, San José, CA, EE. UU.), las células se trataron con el tampón de fijación y permeabilización

intracelular eBioscience (N.º de catálogo 88-8823-88, Thermo Fisher Scientific).

Coinmunoprecipitación de glicoproteína de envoltura (co-IP)

Se transfectaron tres microgramos (1 µg de H y 2 µg de F) de ADN total en células
 5 HEK293T (células 4e5). Después de 24 horas, las células se lavaron dos veces con PBS y se
 trataron con el reticulante 3-3'-diotibis (propionato de sulfosuccinimidilo) (DTSSP; N.º de
 catálogo 21578, Thermo Fisher Scientific) a 1 mM, seguido de inactivación con 20 mM Tris/HCl
 (pH 7.4) y lisis con 0.4 ml de reactivo de extracción de proteína de mamífero M-PER (Thermo
 Fisher Scientific) que contiene un cóctel de inhibidor de fosfatasa y proteasa Halt 1x (N.º de
 10 catálogo 1861281, Thermo Fisher Scientific). Las fracciones solubles se recogieron después de
 la centrifugación a 10 000 x g durante 10 minutos a 4 °C, y se reservó una trigésima parte del
 volumen como entrada de lisado celular. El resto se incubó con 0.5 µg de anticuerpo monoclonal
 M2 anti-FLAG (Sigma-Aldrich) y gel de afinidad de proteína G roja EZview (Sigma-Aldrich, St.
 Louis, MO, EE. UU.). El material precipitado se lavó (Tris-HCl 20 mM, pH 7.4, cloruro sódico 140
 15 mM) y se desnaturalizó hirviéndolo en tampón laemmli que contenía β-mercaptoetanol.

SDS-PAGE e inmunotransferencia

Las muestras se fraccionaron mediante electroforesis en gel en un gel NuPAGE Bis-tris
 del 4 al 12 % (Thermo Fisher) y se transfirieron a membranas de difluoruro de polivinilideno
 20 (PVDF) utilizando un sistema de transferencia en seco iBLOT 2 (N.º de catálogo IB21001,
 Thermo Fisher Scientific). El material proteico se detectó mediante incubación con los
 anticuerpos anti-MeV-H606 (Hudacek *et al.*, *Cancer Gene Therapy*, 20(2):109-16 (2013)), anti-
 MeV-F431 (von Messling *et al.*, *J. Virol.*, 78(15):7894-903 (2004)), anti-Fcγt (von Messling *et al.*,
J. Virol., 75(14):6418-27 (2001)), anti-MeV- N (Toth *et al.*, *J. Virol.*, 83(2):961-8 (2009)), anti-HIS
 25 (N.º de catálogo A01857-40, GenScript, Piscataway NJ, EE. UU.), anti-β-actina (N.º de catálogo
 A3854, Sigma-Aldrich) y anti-CD46 (N.º de catálogo sc-7056, Santa Cruz, Dallas TX, EE. UU.).
 Las inmunotransferencias se visualizaron utilizando un anticuerpo secundario conjugado con
 peroxidasa de rábano picante de conejo (HRP) y KwikQuant Imager (Kindle Bioscience LLC,
 Greenwich CT, EE. UU.). Se muestran los resultados representativos de dos repeticiones
 30 independientes. La cuantificación de bandas se llevó a cabo utilizando KwikQuant Image

Analyzer 1.4. (N.º de cat. D1016, Kindle Biosciences, LLC)

Ensayo de unión de anticuerpos

Se usó un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) para medir la unión de scFvs a CD46. Se recubrieron placas sólidas de 96 pocillos Nunc-Immuno MicroWell durante la noche a 4 °C con 1 µg de CD46 purificado o N4 en tampón carbonato-bicarbonato 0.05 M, pH 9.6. (N.º de catálogo E107, Bethyl Laboratories, Montgomery TX, EE. UU.). A continuación, las proteínas de fusión scFv-Fc purificadas se diluyeron en PBS y se añadieron a una concentración de 12.5 µg/ml. Los anticuerpos unidos se detectaron con un anticuerpo secundario conjugado con HRP anti-IgG humana (específica de Fc) (1:70,000; N.º de catálogo A0170, Sigma-Aldrich). Paralelamente, primero se unieron a los pocillos 125 ng de la proteína de fusión scFv-Fc y se controlaron los niveles de proteína midiendo la densidad óptica (OD490 nm) después de la incubación con el anticuerpo secundario solo.

Resonancia de plasmón superficial (SPR)

La interacción entre scFv A09, 2B10, K1, K2 y CD46 se midió utilizando chips sensores CM5 de la serie S en un sistema Biacore T-100 (GE Healthcare, Waukesha, WI, EE. UU.). Para A09, N1E, K1 y K2, se inmovilizaron 50 µg/ml de un anticuerpo anti-FC (MAB1302, EMD Millipore, Burlington, MA, EE. UU.) diluido en acetato de sodio 10 mM, pH 4.5, en el canal activo y de referencia. del chip CM5 utilizando reactivos del kit de acoplamiento de aminas (EDC (1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida), NHS (N-hidroxisuccinimida) y etanolamina). La inmovilización del anticuerpo resultó en ~12000 unidades de respuesta. Las interacciones entre CD46 y el scFv capturado con anticuerpo anti-FC se midieron a 25 °C con una velocidad de datos de 10 Hz utilizando tampón HBS EP (0.01 M HEPES pH 7.4, 0.15 M NaCl, 3 mM EDTA, 0.005 % v/v de surfactante P20). Cada ciclo de unión comenzó con la carga de 15 µg/mL del scFv en el canal activo durante 300 s a una velocidad de flujo de 10 µL/min. Después de 100 s de lavado con tampón y un período de estabilización de 120 s, se voló CD46 (rango de concentración 50 nM-1000 nM para A09, 37.5 nM-100 nM para K2 y 50-1000 nM para N1E y K1) sobre el canal activo y el de referencia durante 100 s a una velocidad de flujo de 40 l/min. La fase de asociación fue seguida por un período de disociación de 200 s seguido de una inyección de 60 s de glicina 10

mM pH 2.0 a una velocidad de flujo de 30 μ L/min, para regenerar el anticuerpo anti-FC inmovilizado en la superficie. Todos los sensogramas se ajustaron con un modelo de unión 1:1 utilizando el software de evaluación Biacore T100 v2.04.

5 *Infecciones y análisis cinético de crecimiento de virus.*

Para las infecciones por virus, las células se infectaron a las MOI indicadas durante 90 min a 37 °C en medio de suero reducido Opti-MEM I. Después de la fase de absorción, retiramos el inóculo, lavamos y añadimos medio de crecimiento viral (DMEM+5% FBS). Cuando se utilizaron virus que expresan eGFP, se tomaron fotografías de microscopía de fluorescencia 48 horas después de la infección. Para las infecciones con virus que expresan Fluc, la expresión de luciferasa se midió utilizando un lector de microplacas multimodo Infinite M200 Pro (Tecan Trading AG) después de añadir 0.5 mM de D-Luciferina a las células infectadas.

Para el análisis cinético del crecimiento del virus, las células Vero y las líneas celulares derivadas sembradas en placas de 6 pocillos 16-18 horas antes de la infección se infectaron a una multiplicidad de infección (MOI) de 0.03 durante 90 min en Opti-MEM (N.º de catálogo 31985070, Thermo Fisher Scientific). A continuación, se retiró el inóculo y las monocapas celulares se lavaron tres veces con solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (DPBS; N.º de catálogo MT-21-031-CVRF, Mediatech, Inc., Manassas, VA, EE. UU.), y el medio se reemplazado con 1 mL de DMEM suplementado con 5% FBS. En los puntos de tiempo indicados, se recogieron los sobrenadantes celulares y las células se rasparon en 1 ml de Opti-MEM, seguido de 3 ciclos de congelación/descongelación. Los restos celulares se eliminaron por centrifugación (2000 x g durante 5 min) y se determinaron los títulos de virus en células Vero- α HIS.

25 *Estudios de inmunización*

Ratones HuCD46Ge-IFNARKO machos y hembras de cuatro a seis semanas de edad (Mrkic *et al.*, *J. Virol.*, 74(3):1364-72 (2000)), deficientes para el receptor de IFN tipo I y que expresan transgénicamente CD46 humano, fueron inoculados por vía intraperitoneal (i.p.) con 1×10^5 TCID₅₀ partículas de MeV o Stealth-A09. El día 28, las muestras de suero se recolectaron y almacenaron a -20 °C hasta que se evaluaron los anticuerpos neutralizantes.

Ensayos de neutralización

Se llevó a cabo un ensayo de microneutralización por reducción de placa basado en fluorescencia (PRMN) como se describe en otra parte (Munoz-Alia *et al.*, *J. Virol.*, 91(11) (2017)). Brevemente, se sembraron células Vero- α HIS en una placa de 96 pocillos y se mezclaron previamente diluciones en serie de muestras de suero durante 1 hora a 37 °C con inóculo de virus antes de añadirlas a las células. Los datos se representaron como log (dilución de suero) frente a la respuesta normalizada (pendiente variable) presente con el software GraphPad (Prism 8), y se calculó la dosis de neutralización del 50 % (ND₅₀). La inclusión del tercer estándar de suero internacional de la Organización Mundial de la Salud (3UI/ml) permitió la conversión de títulos de anticuerpos a mUI/ml mediante el cálculo de la constante unitaria (Haralambieva *et al.*, *Vaccine*, 29(27):4485-91 (2011)). Se utilizó suero humano agrupado de 60-80 donantes que tenían el tipo de sangre AB (N.º de catálogo HS1017; N.º de lote C80553, Valley Biomedical Inc., Winchester, VA, EE. UU.). Los siguientes reactivos se obtuvieron del depósito de recursos de investigación de infecciones emergentes y defensa de NIH, NIAID, NIH: anticuerpo policlonal anti-MeV, Edmonston, (antisuero, cobaya), NR-4024 y policlonal anti-CDV Lederle Avirulent (antisuero, hurón), NR-4025.

Se evaluó la falta de neutralización cruzada entre el virus del sarampión y Stealth (Figuras 28A-B).

Terapia oncolítica experimental

Para establecer tumores subcutáneos, se inyectaron ratones hembra con inmunodeficiencia combinada grave (SCID) de 6 semanas de edad en el flanco derecho con 1×10^7 células tumorales U266.B1. Cuando el tumor alcanzó 0.5 cm de diámetro, los ratones recibieron una dosis intravenosa única de MeV (n=5) o Stealth (n=5) a 1×10^5 dosis infecciosa de cultivo de tejido al 50 % (TCID₅₀). A los ratones de control (n=5) se les inyectó un volumen igual de PBS. Los animales fueron sacrificados cuando los tumores se ulceraron o cuando la carga alcanzó el 20% del peso corporal. El diámetro del tumor se midió cada dos días y el volumen del tumor se calculó con la fórmula largo x largo x ancho x 0.5.

Para establecer un modelo ortotópico de cáncer de ovario, se inyectaron 5×10^6 células SKOV3ip.1 que expresan luciferasa de luciérnaga (SKOV3ip.1-Fluc) en la cavidad peritoneal de ratones desnudos atímicos. Diez días después, los animales recibieron 600 mUI de suero inmune contra el sarampión (N.º de catálogo HS1017; N.º de lote C80553, Valley Biomedical Inc.) o un

volumen igual de solución salina, y tres horas más tarde, fueron tratados con una sola dosis intraperitoneal (1×10^6 TCID₅₀) de MeV (n=5) o Stealth (n=5). Los ratones del grupo de control recibieron un volumen similar de lisados de células Vero (n=5). Para el experimento de terapia, en su lugar se implantaron 5×10^6 células SKOV3ip.1-Fluc. La carga tumoral se controló

5 semanalmente a través de imágenes de bioluminiscencia in vivo utilizando un instrumento IVIS Spectrum (Perkin Elmer, Waltham, MA, EE.UU.). Los ratones fueron sacrificados al final del estudio (80 días), cuando desarrollaron ascitis o habían perdido el 20% de su peso corporal. Las comparaciones estadísticas entre grupos se realizaron con la prueba de rango logarítmico (Mantel-Cox), y $p < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo.

10

Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron con la versión GraphPad Prism 8.3.1 para Mac OS X. Las diferencias significativas entre los grupos se determinaron mediante el análisis de varianza unidireccional (ANOVA) con la prueba de comparación múltiple de Holm-Sidak. Los datos de

15 supervivencia se analizaron mediante el método de Kaplan-Meier y se utilizó la prueba de rangos logarítmicos para identificar diferencias significativas entre los grupos.

OTRAS REALIZACIONES

Debe entenderse que aunque la invención se ha descrito junto con la descripción detallada de la misma, la descripción anterior pretende ilustrar y no limitar el alcance de la invención, que está definido por el alcance de las reivindicaciones adjuntas. Otros aspectos,

5 ventajas y modificaciones están dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.