

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 874 584**

51 Int. Cl.:

C12N 7/00 (2006.01)

C12N 15/869 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

C12N 15/09 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.02.2016 PCT/EP2016/052879**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.08.2016 WO16128497**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.02.2016 E 16704589 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.03.2021 EP 3256570**

54 Título: **Virus del herpes redirigido con una fusión de glicoproteína H**

30 Prioridad:

11.02.2015 EP 15425012

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

05.11.2021

73 Titular/es:

**ALMA MATER STUDIORUM -UNIVERSITA' DI BOLOGNA (100.0%)
Via Zamboni, 33
40126 Bologna, IT**

72 Inventor/es:

**CAMPADELLI, MARIA GABRIELLA y
GATTA, VALENTINA**

74 Agente/Representante:

DURAN-CORRETJER, S.L.P

ES 2 874 584 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Virus del herpes redirigido con una fusión de glicoproteína H

5 SECTOR DE LA INVENCION

La presente invención se refiere al sector de la terapia de enfermedades. Más específicamente, se refiere a un virus del herpes redirigido que tiene un polipéptido heterólogo fusionado con la glicoproteína H, en el que el polipéptido selecciona como diana células específicas, en particular células enfermas. También se refiere a un ácido nucleico que comprende el genoma del virus del herpes de la presente invención, a un vector que comprende este ácido nucleico y a una célula que comprende el ácido nucleico o el vector. Además, se refiere a la destrucción de células utilizando el virus del herpes de la presente invención y a procedimientos para hacerlo crecer *in vitro*.

15 ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

La carga de las enfermedades y patologías que no se pueden tratar, y menos curar, sigue siendo elevada, a pesar del gran número de descubrimientos que, en las últimas décadas, se trasladaron a terapias o curas y que tuvo como resultado mejoras para la salud y la calidad de vida de los seres humanos. Entre ellas destacan numerosas formas de cánceres, en particular formas metastásicas de cánceres, que se tratan con quimio-radioterapia o medicamentos biológicos, o combinaciones de los mismos, con un éxito muy limitado.

En las últimas dos décadas, se han realizado numerosos esfuerzos para emplear los virus del herpes simple (HSV) como agentes oncolíticos (o-HSV) para tratar cánceres y metástasis. Ejemplos son HSV modificados por ingeniería genética, que portan delecciones de algunos de los genes virales para atenuar los virus y otorgan cierto grado de especificidad por el cáncer. Estos virus, ejemplificados por el virus denominado HSV-1716, portan la delección de una o ambas copias del gen $\gamma_134.5$, cuyo producto contrasta la defensa del anfitrión ejercida por la activación de PKR (proteína cinasa R). Los HSV que portan la delección del gen $\gamma_134.5$ obtienen su especificidad parcial del cáncer por el hecho de que las células no cancerosas crean una respuesta innata contra los mismos, de tal manera que se dificulta la replicación viral; por el contrario, algunas de las células cancerosas muestran defectos en la respuesta innata y, por tanto, permiten la replicación del HSV con $\Delta \gamma_134.5$ y, en consecuencia, la destrucción de las células cancerosas. Una debilidad de estos o-HSV es que las células cancerosas son heterogéneas, y el HSV con $\Delta \gamma_134.5$ sólo puede destruir la fracción de células cancerosas defectuosas en cuanto a la respuesta de PKR. Por motivos de seguridad y para conseguir una especificidad por el cáncer mejorada, en algunos casos, los HSV con $\Delta \gamma_134.5$ se han modificado por ingeniería para portar delecciones adicionales, ejemplificadas por la delección del gen UL 39 que codifica la subunidad grande de la ribonucleótido reductasa, la delección de ICP 47, etc. Estas delecciones adicionales dan como resultado una atenuación adicional de los o-HSV.

Para superar el efecto oncolítico limitado resultante de la atenuación, los o-HSV que portan la delección del gen $\gamma_134.5$, o una combinación de delecciones, se han modificado adicionalmente para codificar una quimiocina o citocina. Los dos ejemplos pertinentes son T-VEC y M032. El o-HSV, denominado inicialmente Onco-Vex y renombrado posteriormente como T-Vec, codifica GM-CSF, que favorece el reclutamiento y la maduración de monocitos y células dendríticas y, por tanto, aumenta la respuesta del paciente tratado a su propio tumor. El efecto es una potenciación del aclaramiento de tumores por el sistema inmunitario del paciente tratado. En un ensayo clínico de fase III, mejoró el desenlace de pacientes que portaban melanoma metastásico. El segundo ejemplo es M032, un HSV con $\Delta \gamma_134.5$ modificado por ingeniería para codificar la secuencia de IL12. Se predice que este virus favorecerá una respuesta Th1. Está abierto el reclutamiento de pacientes afectados por glioblastoma para el tratamiento con M032 en un ensayo de fase I. Las principales limitaciones de los virus atenuados son dobles, (i) su replicación global disminuida, lo que representa un obstáculo tanto *in vivo* como con respecto a la producción de reservas de virus lo suficientemente grandes como para producir inóculos eficaces; y (ii) su especificidad por el cáncer limitada debido a su capacidad para entrar y ser secuestrados por células normales. Se espera que estas dos limitaciones sean perjudiciales para la eficacia clínica del tratamiento.

Un enfoque para superar estas limitaciones ha sido la modificación por ingeniería genética de o-HSV que muestran un tropismo altamente específico para las células cancerosas y que, por lo demás, no se atenúan. Este enfoque se ha definido como redirección del tropismo de HSV a receptores específicos de los cánceres. El HSV entra en las células mediante la fusión de su envoltura con las membranas celulares; estas son la membrana plasmática o la membrana que limita las vesículas endocitóticas. En el último caso, la unión del virus a la superficie celular está seguida por la captación del virus por parte de la célula en las vesículas endocitóticas y, posteriormente, por la fusión de la envoltura del virión con la membrana de la vesícula endocitótica. La envoltura del virión es la estructura más externa de la partícula de HSV; consiste en una membrana que porta varias glicoproteínas codificadas por virus que se activan en forma de cascada para fomentar la fusión de la envoltura del HSV con las membranas celulares. Estas glicoproteínas son gC y gB, que median una primera unión de la partícula de HSV al sulfato de heparano de la superficie celular. Después de eso, la gD interacciona con, como mínimo, dos receptores de superficie celular alternativos independientes, denominados Nectina 1 y HVEM o HVEA. El sitio de unión de Nectina 1 o de HVEM en gD difiere. La interacción de gD con uno de los dos receptores alternativos induce cambios conformacionales en gD,

que se cree que activan las glicoproteínas gH/gL aguas abajo (que forman un heterodímero) y gB, en forma de cascada. La gB ejecuta la fusión de la envoltura del virión con la membrana celular.

La redirección de HSV a receptores específicos del cáncer conlleva modificaciones genéticas de gD, de tal manera que alberga secuencias heterólogas que codifican un ligando específico. Tras la infección con el virus recombinante que codifica la glicoproteína quimérica gD-ligando, se forman viriones descendientes que portan en su envoltura la glicoproteína quimérica gD-ligando, en lugar de wt-gD. El ligando interacciona con una molécula expresada específicamente en la célula cancerosa seleccionada, o en un grupo de cánceres, y permite la entrada del o-HSV recombinante en la célula cancerosa seleccionada. Ejemplos de ligandos que se han utilizado con éxito para la redirección de HSV son IL13 α , uPaR, un anticuerpo monocatenario contra HER2 y un anticuerpo monocatenario contra EGFR.

Estudios previos han dado a conocer la construcción de dos recombinantes denominados R-LM113 y R-LM249, ambos redirigidos al receptor de cáncer HER2. Para conseguir un alto grado de especificidad por el cáncer, la interacción de gD con sus receptores naturales Nectina 1 y HVEM fue abolida a través de delecciones de porciones específicas de la molécula de gD. R-LM113 porta la delección de la secuencia de gD madura correspondiente a los AA 6-38. R-LM249 porta la delección de la región central de la gD madura, correspondiente a los AA 61-218. En ambos virus, las secuencias delecionadas se reemplazaron por la secuencia que codifica un anticuerpo monocatenario (scFv) derivado de trastuzumab, un anticuerpo monoclonal contra HER2.

La redirección a través de la modificación de glicoproteínas distintas de gD se ha intentado con gC. Los ligandos insertados fueron EPO e IL13. El virus que porta la quimera gC-EPO se unió a las células que expresan los receptores de EPO; sin embargo, esta unión no condujo a una entrada infecciosa; más bien, el virus se degradó, posiblemente porque fue absorbido y acabó en los lisosomas; en general, esta estrategia no tuvo como resultado un virus redirigido viable. La quimera gC-IL13 estaba presente en un virus que portaba una segunda copia de IL13 en el gen gD. El virus fue redirigido. Dado que todos los HSV redirigidos viables portan el ligando de redirección en gD, a partir de esos estudios no se puede deducir si la gC-IL13 contribuía o no a la redirección al receptor α 2 de IL13.

Según el conocimiento de los inventores, nunca se ha descrito la redirección a través de modificaciones genéticas de gB de HSV. La gH ha sido modificada por una fusión de scFv en la Patente WO 2009/013448.

Pertinentes para la presente invención son los hallazgos previos de Cairns et al. (Journal of Virology, junio de 2003, vol. 77, n.º 12, pág. 6731-6742), resumidos en lo siguiente. En un intento de entender qué papel desempeña gL en el heterodímero gH/gL, se introdujo la delección del gen gL en el virus del herpes denominado virus de la pseudorrabia (PrV), un virus del herpes porcino con alta homología con el HSV humano. El PrV con Δ gL no era viable, puesto que no podía infectar, por lo que no se podía replicar. Los pasajes ciegos en serie de este virus dieron lugar a un mutante espontáneo, denominado PrV- Δ gLPass, que portaba una glicoproteína quimérica compuesta por la secuencia de gD fusionada con el extremo N-terminal de gH. Posteriormente también se modificó por ingeniería una quimera esencialmente similar con los genes de HSV correspondientes. Porta la secuencia que codifica el péptido señal de gD y el ectodominio de gD madura (aa 1-308) fusionado con el extremo N-terminal de la gH madura. Los ejemplos en los que gH estaba delecionada parcialmente no dieron lugar a ninguna molécula funcional. La propiedad de la glicoproteína gD-gH, en la que todo el ectodominio de gD estaba fusionado con el extremo N-terminal de gH (denominada quimera 22 en Cairns et al., anteriormente), es pertinente en este caso. Cabe señalar que, en el virus wt (wild-type, de tipo natural), la activación ejercida por la gD unida al receptor en gH/gL se produce necesariamente a través de señalización intermolecular. Los inventores se refieren a la misma como señalización *trans*, en oposición a una señalización que se produce de manera intramolecular, denominada en el presente documento señalización *cis*. Un descubrimiento sorprendente de los inventores de la presente invención es que la activación de gH se puede producir en *cis*. Este es el caso para las construcciones R-VG803 y R-VG809, en las que el scFv activa el resto gH en la propia quimera. La quimera 22 de Cairns et al., anteriormente, se empleó en ensayos de complementación. Específicamente, la quimera 22 redujo la infección de un virus gD^{-/-}gH^{+/+}, o de un virus gH^{-/-}gD⁺. No se sometió a prueba la complementación de un virus gD^{-/-}gH^{-/-} con doble delección. Existen dos diferencias clave entre el informe previo y el hallazgo de la presente invención. En primer lugar, en los ensayos de complementación (Cairns et al., anteriormente), wt-gD en el virus gH^{-/-}gD⁺ puede haber activado en *trans* al resto gH que forma parte de la quimera gD-gH. Por el contrario, el resto gD, que forma parte de la quimera, puede haber activado en *trans* a wt-gH presente en los viriones gD^{-/-}gH⁺. En cualquier caso, la activación solo puede haber tenido lugar en *trans*, tal como concluyeron Cairns et al., anteriormente. No se proporcionan evidencias de la activación en *cis* de la quimera gD-gH y el experto en la materia no la habría considerado posible. En segundo lugar, independientemente del mecanismo de activación, en el sistema del complemento la activación de gH estaba mediada por gD, que tiene un sitio de unión para gH, y no por un ligando heterólogo. Estos resultados no establecieron ni sugirieron que se pudieran introducir secuencias heterólogas (secuencias distintas de secuencias virales), denominadas en el presente documento ligando, en el extremo N-terminal de gH, y menos si un ligando heterólogo introducido en el extremo N-terminal de gH puede ejercer la función de redirigir el tropismo de HSV a un receptor celular capaz de unirse al ligando modificado por ingeniería.

Los inventores de la presente invención han demostrado que, de hecho, esto se puede realizar y que la gH se puede modificar para redirigir el virus del herpes.

CARACTERÍSTICAS DE LA INVENCION

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un virus del herpes infeccioso recombinante, que comprende

- (a) un ligando polipeptídico heterólogo, en el que el ligando polipeptídico heterólogo está fusionado con el extremo N-terminal de la glicoproteína H (gH) madura o de una gH truncada hasta el aminoácido 48 de SEQ ID NO: 1, o insertado en la gH dentro de la región N-terminal comenzando en cualquiera de los aminoácidos 19 a 23 y acabando en el aminoácido 48, y en el que el ligando polipeptídico heterólogo no es la glicoproteína D (gD) del virus del herpes, ni un fragmento de la misma, que se une específicamente a un ligando celular de gD, y
- (b) una gD alterada que tiene unión reducida o inespecífica a ligandos celulares de gD,

en el que la gD comprende un ligando polipeptídico heterólogo fusionado con el extremo N-terminal de la gD madura o de una gD truncada, o insertado en la gD.

En un segundo aspecto, la presente invención se refiere al virus del herpes infeccioso recombinante del primer aspecto, para su utilización en el tratamiento de una enfermedad.

En un tercer aspecto, la presente invención se refiere a un ácido nucleico que comprende el genoma del virus del herpes infeccioso recombinante del primer aspecto, en el que el genoma codifica el ligando polipeptídico heterólogo fusionado con o insertado en la gH, tal como se define en (a), y la gD alterada que comprende el ligando polipeptídico heterólogo, tal como se define en (b).

En un cuarto aspecto, la presente invención se refiere a un vector que comprende el ácido nucleico del tercer aspecto.

En un quinto aspecto, la presente invención se refiere a una célula que comprende el virus del herpes infeccioso recombinante del primer aspecto, el ácido nucleico del tercer aspecto o el vector del cuarto aspecto.

En un sexto aspecto, la presente invención se refiere al virus del herpes infeccioso recombinante del primer aspecto, para su utilización médica.

En un séptimo aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento *in vitro* para destruir una célula utilizando el virus del herpes infeccioso recombinante del primer aspecto.

En un octavo aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento *in vitro* para hacer crecer el virus del herpes infeccioso recombinante del primer aspecto, en células.

LEYENDAS DE LAS FIGURAS

Figura 1: disposiciones del genoma de los recombinantes R-VG803, R-VG811, R-VG809, R-VG805 y R-VG807. El genoma de HSV-1 está representado como una línea enmarcada por repeticiones internas (IR). La secuencia de BAC enmarcada por Lox-P está insertada en la región intergénica UL3-UL4. El marcador fluorescente rojo m-Cherry está insertado en la región intergénica UL37 y UL38. R-VG803 porta la inserción de scFv-HER2, enmarcado por ligadores de Ser-Gly, entre los AA 23-24 de gH. R-VG811 porta la inserción de scFv-HER2, enmarcado por ligadores de Ser-Gly, entre los AA 23-48 de gH. R-VG809 es por lo demás idéntica a R-VG803. Además, porta la delección de los AA 6-38 de la gD madura. R-VG805 es por lo demás idéntica a R-VG809; además, porta la inserción de scFv-EGFR en lugar de los AA 6-38 de la gD madura. R-VG807 es por lo demás idéntica a R-VG809; además, porta la inserción de scFv-HER2 en lugar de los AA 6-38 de la gD madura.

Figura 2: R-VG803 y R-VG 809 expresan la glicoproteína scFv-gH quimérica. Se sometieron lisados de células Vero infectadas con R-VG803, R-VG809 o R-LM5 a PAGE. Se detectó gH mediante inmunotransferencia. Los números a la izquierda representan la posición de migración de los marcadores de PM de 130K y 95K.

Figura 3: R-VG803 infecta células que expresan HER2 como único receptor (células J-HER2), así como células positivas para los receptores de gD naturales, y el virus descendiente se extiende de célula a célula en células J-HER2. Las células J no expresan ningún receptor para wt-HSV. J-HER2, J-Nectina1, J-HVEM sólo expresan el receptor indicado. (A) Las células indicadas se infectaron con R-VG803 (1 UFP/célula tal como se titula en células J-HER2) y se monitorizaron mediante microscopía de fluorescencia roja. (B) Las células J-HER2 se infectaron con R-VG803 (0,01 UFP/célula), se mantuvieron en medio que contenía MAb 52S y se monitorizaron diariamente mediante fluorescencia roja. El aumento del tamaño de placas indica extensión de célula a célula.

Figura 4: caracterización de las rutas de entrada de R-VG803 en células J-HER2 (A-B) y de las rutas de entrada de R-VG803 y R-VG809 en células SK-OV-3 (C). (A, B) El trastuzumab inhibe la infección por R-VG803 de células

J-HER2. Las células J-HER2 se infectaron con R-VG803 en presencia de trastuzumab (trastuz) (28 µg/ml) o IgG de control. La infección se monitorizó mediante microscopía de fluorescencia (A) o citometría de flujo (B). (C) Efectos de trastuzumab y MAb contra HD1 sobre la infección de células SK-OV-3 con R-VG803 o R-VG809. Se incubó previamente R-VG803 con HD1 (concentración final de 1 µg/ml) y, a continuación, se dejó que infectaran a las células SK-OV-3, en triplicados. Cuando se indicó, se trataron previamente las células con trastuzumab (concentración final de 28 µg/ml). El grado de infección se cuantificó 24 horas después por medio de citometría de flujo (BD Accuri C6) y se expresó como porcentaje en relación con las células infectadas con virus sin tratar. Cada valor representa el promedio de triplicados.

Figura 5: R-VG809 infecta células que expresan HER2 como único receptor (J-HER2, CHO-HER2), así como a células SK-OV-3, y no puede infectar J-HVEM, J-Nectina ni células humanas y animales negativas para la expresión de HER2 y positivas para los receptores de gD naturales. Las células se infectaron a 3 UFP/célula y se monitorizó la infección 24 horas después.

Figura 6: R-VG805 infecta células J-HER2, J-EGFR, CHO-EGFR, U251-EGFR-vIII, y no puede infectar células J-Nectina1 y J-HVEM, así como células wt-CHO-KI negativas para el receptor.

Figura 7: infección con R-VG811 de células J-HER2, SK-OV-3, así como J-Nectina1 y J-HVEM (A), y determinación del grado de infección por el virus (B-D). (A) R-VG811 infecta células J-HER2, SK-OV-3, así como J-Nectina1 y J-HVEM. (B) Comparación de la cantidad de células infectadas obtenida tras la transfección de R-VG811, o ADN-BAC de R-VG803, en células J-HER2 o SK-OV-3. (C-D) Cuantificación de la infección en células transfectadas con ADN_BAC por medio de detección con m-Cherry.

Figura 8: curva de replicación de R-VG803 y R-VG809, en comparación con R-LM113, R-LM249 y R-LM5 en células J-HER2 o SK-OV-3. (A) Curvas de crecimiento de R-VG803 y de R-LM113 en J-HER2, (B) curvas de crecimiento de R-VG803, R-VG809 y R-LM5 en J-HER2. R-VG803, R-VG809, R-LM113, R-LM249 y R-LM5 en células SK-OV-3 (C). Las células se infectaron a 0,1 UFP/célula (A, C) o 0,01 UFP/célula (B) de virus titulado en la misma línea celular, recogido en los tiempos indicados. El virus descendiente se tituló en células J-HER2 (A, B) o SK-OV-3 (C). Los resultados son el promedio de, como mínimo, dos experimentos independientes.

Figura 9: capacidad de destrucción por parte de R-VG803 y R-VG809 de células SK-OV-3, en comparación con la capacidad de destrucción por parte de R-LM113, R-LM249 y R-LM5. Los resultados se muestran como viabilidad de células SK-OV-3, infectadas con los virus indicados a 2 UFP/célula, tal como se determina mediante AlamarBlue, en monocapas por triplicado. La figura representa el promedio de triplicados.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Antes de que la presente invención se describa con detalle a continuación, se debe entender que la presente invención no se limita a la metodología, los protocolos y reactivos particulares descritos en el presente documento, ya que estos pueden variar. También se debe entender que la terminología utilizada en el presente documento tiene el fin de describir realizaciones particulares únicamente, y no pretende limitar el alcance de la presente invención que estará limitado únicamente por las reivindicaciones adjuntas. A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen los mismos significados que entiende habitualmente un experto habitual en la materia.

Preferentemente, los términos utilizados en el presente documento se definen tal como se describe en "A multilingual glossary of biotechnological terms: (IUPAC Recommendations)", Leuenberger, H.G.W, Nagel, B. and Kölbl, H. eds. (1995), Helvetica Chimica Acta, CH-4010 Basilea, Suiza).

En lo siguiente, se describirán los elementos de la presente invención. Estos elementos se enumeran con realizaciones específicas, sin embargo, se debe entender que se pueden combinar de cualquier manera y en cualquier número para crear realizaciones adicionales. Los ejemplos y las realizaciones preferentes descritos de manera diversa no se deben interpretar como que limitan la presente invención únicamente a las realizaciones descritas explícitamente. Esta descripción se debe entender como que respalda y engloba realizaciones que combinan las realizaciones descritas explícitamente con cualquier número de los elementos dados a conocer y/o preferentes. Además, cualquier permutación y combinación de todos los elementos descritos en esta solicitud se debe considerar dada a conocer por la descripción de la presente solicitud, a menos que el contexto indique lo contrario.

A lo largo de esta memoria descriptiva y las reivindicaciones que siguen, a menos que el contexto requiera lo contrario, la palabra "comprender", y variaciones tales como "comprende" y "que comprende", se deben entender como que implican la inclusión de un número entero o una etapa, o un grupo de números enteros o etapas, indicado pero no la exclusión de cualquier otro número entero o etapa, o grupo de números enteros o etapas. Tal como se utiliza en esta memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un/o", "una" y "el/la" incluyen los referentes en plural, a menos que el contenido indique claramente lo contrario.

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un virus del herpes infeccioso recombinante, que comprende

- (a) un ligando polipeptídico heterólogo, en el que el ligando polipeptídico heterólogo está fusionado con el extremo N-terminal de la glicoproteína H (gH) madura o de una gH truncada hasta el aminoácido 48 de la SEQ ID NO: 1, o insertado en la gH dentro de la región N-terminal comenzando en cualquiera de los aminoácidos 19 a 23 y acabando en el aminoácido 48, y en el que el ligando polipeptídico heterólogo no es la glicoproteína D (gD) del virus del herpes, ni un fragmento de la misma, que se une específicamente a un ligando celular de gD, y
- (b) una gD alterada que tiene unión reducida o inespecífica a ligandos celulares de gD, en el que la gD comprende un ligando polipeptídico heterólogo fusionado con el extremo N-terminal de la gD madura o de una gD truncada, o insertado en la gD.

El término virus del herpes “recombinante”, tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un virus del herpes que ha sido modificado por ingeniería genética para expresar una proteína heteróloga. En la técnica se conocen bien procedimientos para crear virus del herpes recombinantes, véase, por ejemplo, Sandri-Goldin et al., Alpha Herpesviruses: Molecular and Cellular Biology, Caister Academic Press, 2006.

El término virus del herpes “infeccioso”, tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un virus del herpes que es capaz de entrar en una célula diana y de producir proteínas codificadas por el genoma viral, incluyendo las proteínas heterólogas comprendidas en el mismo. En un significado preferente, el virus del herpes también es capaz de producir virus descendientes en la célula diana en la que entra.

El término “virus del herpes”, tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un miembro de la familia *Herpesviridae* de virus de ADN bicatenario, que provocan infecciones latentes o líticas. Los virus del herpes comparten todos una estructura común: todos los virus del herpes están compuestos por genomas de ADN lineal bicatenario relativamente grande que codifica 100-200 genes atrapados dentro de una cubierta proteica icosaédrica, denominada cápside, que a su vez está envuelta en una capa proteica, denominada tegumento, que contiene tanto proteínas virales como ARNm virales, y una membrana bicapa lipídica, denominada envoltura. Esta partícula completa también se denomina virión.

El término polipéptido “heterólogo”, tal como se utiliza en el presente documento, con respecto al virus del herpes se refiere a un polipéptido que no es nativo del virus del herpes. Como mínimo, no es nativo de la cepa del virus del herpes particular utilizada, sin embargo, en un significado preferente, tampoco es nativo de ningún otro virus del herpes. El término también excluye proteínas derivadas de un virus del herpes, que están alteradas genéticamente, es decir, tales proteínas del virus del herpes alteradas genéticamente no son polipéptidos heterólogos dentro del significado definido del término. En una realización particular, el ligando polipeptídico heterólogo no es la glicoproteína D (gD) del virus del herpes, ni un fragmento de la misma, que se une específicamente a un ligando celular de gD.

El término “fusionado” o “fusión”, tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a la unión de dos polipéptidos diferentes mediante enlaces peptídicos, ya sea directa o indirectamente a través de uno o varios ligadores peptídicos. En una realización preferente relacionada con gH, el ligando polipeptídico heterólogo está fusionado con el extremo N-terminal de la gH madura o de una gH madura truncada. En una realización preferente relacionada con gD, el ligando polipeptídico heterólogo está fusionado con el extremo N-terminal de la gD madura o de una gD madura truncada.

Un ligador peptídico tiene una longitud entre 1 y 30 aminoácidos, preferentemente de 5 a 15 aminoácidos, más preferentemente de 8-12 aminoácidos, y puede consistir en cualquier aminoácido. Preferentemente, comprende el/los aminoácido(s) Gly y/o Ser, más preferentemente comprende, como mínimo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 aminoácidos seleccionados entre el grupo que consiste en Gly y Ser. De la manera más preferente, consiste en los aminoácidos Gly y/o Ser. Los ligadores basados en Gly y Ser son preferentes porque proporcionan flexibilidad, buena solubilidad y resistencia a la proteólisis.

El término glicoproteína “madura”, tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a una glicoproteína que carece del péptido señal N-terminal. Con respecto a gH, se refiere preferentemente a gH que carece de los aminoácidos 1-18 de la gH, según la SEQ ID NO: 1, o una región correspondiente de una gH homóloga. Con respecto a gD, se refiere, preferentemente, a gD que carece de los aminoácidos 1-25 de la gD, según la SEQ ID NO: 4, o una región correspondiente de una gD homóloga.

El término glicoproteína “truncada”, tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a una glicoproteína del virus del herpes, preferentemente una glicoproteína del virus del herpes madura que carece de una porción N-terminal. En una realización particular, la gH está truncada hasta (es decir, el truncamiento incluye) cualquiera de los aminoácidos 18 a 48 (es decir 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47 o 48), en particular, el aminoácido 23, 24 o 48 de la gH, según la SEQ ID NO: 1 (un truncamiento hasta el aminoácido 18 da como resultado la gH madura). En otra realización particular, la gD está

truncada hasta (es decir, el truncamiento incluye) cualquiera de los aminoácidos 25 a 64 (es decir 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63 o 64), en particular, el aminoácido 64 de la gD, según la SEQ ID NO: 4 (un truncamiento hasta el aminoácido 25 da como resultado la gD madura).

El término "glicoproteína H" o "gH", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a una glicoproteína de la envoltura del virión de 110 kDa que desempeña un papel en la infectividad del virus del herpes. En particular, en forma de un heterodímero con la glicoproteína L del virus del herpes. En el presente documento, está representada por gH de HSV-1, según la SEQ ID NO: 1 (precursor de gH o gH de longitud completa, que incluye la secuencia señal; la gH madura carece de esta secuencia señal, es decir, los residuos 1-18 de la SEQ ID NO: 1). Sin embargo, los homólogos de gH se hallan en todos los miembros de la familia del virus del herpes y, de este modo, las secuencias homólogas pueden variar (véanse también a continuación los homólogos preferentes). Por tanto, los homólogos de gH de HSV-1 también están englobados por la presente invención. En una realización preferente, tales homólogos de gH de HSV-1 tienen una secuencia de aminoácidos que es, como mínimo, el 70 %, el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 % o el 99 % idéntica a la secuencia, según la SEQ ID NO: 1, y conservan, preferentemente como tipo natural (es decir, sin modificar), la capacidad de formar un heterodímero con la glicoproteína L del virus del herpes. Como mínimo, entre los virus del herpes humano y de mono, la gH está conservada. Se conocen las estructuras cristalinas de la porción extracelular de tres proteínas gH: una de la gH de HSV-2 del virus del herpes alfa (Chowdary et al., Nat Struct Mol Biol 2010 17:882-888), una del PrV porcino (Backovic et al., PNAS 2012 107(52) 22635-22640), también un virus del herpes alfa, y una del virus de Epstein-Barr (Matsuura et al., PNAS, 2010 107(52) 22641-22646), un virus del herpes gamma. Son sustancialmente similares, por ejemplo, en todas las estructuras cristalinas está presente una organización en dominios estructuralmente similares.

El término "gD" o "glicoproteína D" se refiere a un componente de la envoltura del virión del virus del herpes que desempeña un papel esencial en la entrada de HSV en las células. La gD se une a moléculas celulares, concretamente HVEM y Nectina-1, tras la interacción inicial de las glicoproteínas gC y gB del virus del herpes con proteoglicanos de sulfato de heparano. En el presente documento está representada por gD de HSV-1, según la SEQ ID NO: 4 (precursor de gD o gD de longitud completa), que incluye la secuencia señal; la gD madura carece de esta secuencia señal, es decir, los residuos 1-25 de la SEQ ID NO: 4). Sin embargo, los homólogos de gD (véanse también a continuación los homólogos preferentes) se hallan en otros miembros de la familia del virus del herpes y, de este modo, las secuencias homólogas pueden variar. Por tanto, los homólogos de gD de HSV-1 también están englobados por la presente invención. En una realización preferente, tales homólogos de gD de HSV-1 tienen una secuencia de aminoácidos que es, como mínimo, el 70 %, el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 % o el 99 % idéntica a la secuencia, según la SEQ ID NO: 4, y conservan, como tipo natural (es decir, sin modificar), la capacidad de unirse a HVEM y Nectina-1 o, más general, a receptores celulares que permiten que el homólogo de gD fomente, en forma de cascada, la fusión de la envoltura vírica con las membranas celulares.

En una realización preferente, el virus del herpes se selecciona entre el grupo que consiste en virus del herpes simple 1 (HSV-1), virus del herpes simple 2 (HSV-2), virus de la varicela-zóster (virus del herpes humano 3 (HHV-3)), virus de la pseudorrabia (PRV) del virus del herpes alfa porcino, virus del herpes alfa1 de chimpancé (ChHV), virus del herpes de *Papiine* 2 (HVP2), virus del herpes de cercopitecino 2 (CeHV2), virus del herpes de macacino 1 (MHV1), virus del herpes de *Saimiriine* 1 (HVS1), virus del herpes de callitricino 3 (CalHV3), virus del herpes de *Saimiriine* 2 (HVS2), virus del herpes bovino 1 (BoHV-1), virus del herpes bovino 5 (BoHV-5), virus del herpes equino 1 (EHV-1), virus del herpes equino 2 (EHV-2), virus del herpes equino 5 (EHV-5), virus del herpes canino 1 (CHV), virus del herpes felino 1 (FHV-1), virus de la enteritis de pato (DEV), virus del herpes alfa del murciélago de la fruta 1 (FBAHV1), virus del herpes bovino 2 (BoHV-2), virus del herpes de lepórido 4 (LHV-4), virus del herpes equino 3 (EHV-3), virus del herpes equino 4 (EHV-4), virus del herpes equino 8 (EHV-8), virus del herpes equino 9 (EHV-9), virus del herpes de cercopitecino 9 (CeHV-9), virus del herpes de suido 1 (SuHV-1), virus de la enfermedad de Marek (MDV), serotipo 2 del virus de la enfermedad de Marek (MDV2), virus del herpes de falcónido de tipo 1 (FaHV-1), virus del herpes aviar 3 (GaHV-3), virus del herpes aviar 2 (GaHV-2), virus del herpes asociado a la enfermedad de pulmones-ojos-tráquea (LETV), virus del herpes aviar 1 (GaHV-1), virus del herpes de psitácido 1 (PsHV-1), virus del herpes humano 8 (HHV-8), virus del herpes humano 4 (HHV-4), virus del herpes de quelónido 5 (CHHV5), virus del herpes de atelino 3 (AtHV3) o virus del herpes de *Meleagridae* 1 (MeHV-1). Estos virus tienen todos, como mínimo, una gH con una homología clara con la gH de HSV-1/-2. En una realización más preferente, el virus del herpes es HSV-1 o HSV-2.

El término "insertado" o "inserción", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a la incorporación de un polipéptido en otro polipéptido, en la que el polipéptido incorporado se une al polipéptido huésped mediante enlaces peptídicos, ya sea directa o indirectamente a través de uno o varios ligadores peptídicos, más específicamente a través de un ligador peptídico N-terminal y/o C-terminal con respecto al inserto. Aunque la fusión de un ligando peptídico con la gH/gD madura también se puede ver como una inserción en el precursor de gH/gD, según las SEQ ID NO 1/4, respectivamente, una inserción de este tipo se denomina en el presente documento fusión N-terminal, puesto que el virión porta la glicoproteína madura. Por tanto, el término "inserción" se refiere, preferentemente, a una inserción en una glicoproteína madura, en particular gH y gD.

El ligando polipeptídico heterólogo está insertado dentro de la región N-terminal de gH comenzando en cualquiera

de los aminoácidos 19 a 23 (preferentemente 19) y acabando en el aminoácido 48 de la gH, según la SEQ ID NO: 1, o una región correspondiente de una gH homóloga. En una realización más preferente, está insertado dentro de la región N-terminal de gH comenzando en el aminoácido 19 y acabando en el aminoácido 48 de la gH, según la SEQ ID NO: 1, o una región correspondiente de una gH homóloga. En otra realización más preferente, está insertado dentro de la región N-terminal de gH comenzando en el aminoácido 23 y acabando en el aminoácido 48 de la gH, según la SEQ ID NO: 1, o una región correspondiente de una gH homóloga. En todas estas realizaciones, los aminoácidos que definen el inicio y el final de una región están incluidos en la región, es decir, la inserción puede ser o bien N-terminal o bien C-terminal respecto al aminoácido inicial o final. En el caso particular de una inserción N-terminal del residuo 19 de la SEQ ID NO: 1, la inserción también se puede ver como una fusión con el extremo N-terminal de la gH madura. Por tanto, para distinguir los términos "inserción" y "fusión" claramente, este caso particular se excluye, preferentemente, de las posibles inserciones y se clasifica como una fusión con el extremo N-terminal de la gH madura tal como se describe.

Además, en todas estas realizaciones, dicha región se puede reemplazar por la inserción. En el caso particular de la inserción que reemplaza una región que comprende el residuo 19 de la SEQ ID NO: 1, la inserción también se puede ver como una fusión con el extremo N-terminal de una gH madura truncada. Por tanto, para distinguir los términos "inserción" y "fusión" claramente, este caso particular se excluye, preferentemente, de las posibles inserciones y se clasifica como una fusión con el extremo N-terminal de una gH madura truncada tal como se describe.

En la realización más preferente, el ligando está insertado entre el aminoácido 23 y el aminoácido 24 de la gH, según la SEQ ID NO: 1, o una región correspondiente (en este caso, correspondiente a dichos aminoácidos 23 y 24) de una gH homóloga.

En una realización particular, uno o varios aminoácidos de gH de la región N-terminal, tal como se especificó anteriormente, están deletados. En una realización relacionada, la gH está truncada, tal como se especificó anteriormente.

El término "región correspondiente de una gH homóloga" se refiere a una región de una gH que se alinea con una región dada de gH de HSV-1 (preferentemente la región de la inserción, tal como se definió anteriormente), según la SEQ ID NO: 1, cuando se utiliza el algoritmo de Smith-Waterman y los siguientes parámetros de alineación: MATRIZ: BLOSUM62, APERTURA DE HUECO: 10, EXTENSIÓN DE HUECO: 0,5. En el caso de que solo una parte o partes de la región dada de gH de HSV-1 se alinee con la secuencia de una gH homóloga utilizando el algoritmo y los parámetros anteriores, el término "región correspondiente de una gH homóloga" se refiere a la región que se alinea con la(s) parte(s) de la región dada de gH de HSV-1. En otras palabras, en este caso, la región en la gH homóloga, en la que el ligando está insertado o que está reemplazada por el ligando, comprende solo los aminoácidos que se alinean con la(s) parte(s) de la región dada de gH de HSV-1. Además, en el mismo caso, el término "región correspondiente de una gH homóloga" puede referirse a una región que está flanqueada por secuencias flanqueantes correspondientes, en la que las secuencias flanqueantes correspondientes son secuencias de la gH homóloga que se alinean, utilizando el algoritmo y los parámetros anteriores, con secuencias que flanquean la región dada anterior (preferentemente la región de la inserción, tal como se definió anteriormente) de gH de HSV-1. Estas secuencias flanqueantes de gH de HSV-1 tienen una longitud de, como mínimo, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40 o 50 aminoácidos (la secuencia flanqueante en el extremo N-terminal de gH, es decir, N-terminal, cualquier residuo de aminoácido 19 a 23, según la SEQ ID NO: 1, puede ser más corta, es decir, tal como se especifica pero hasta una longitud de 18, 19, 20, 21 o 22 residuos de aminoácido) y se alinean con la secuencia de una gH homóloga utilizando el algoritmo y los parámetros anteriores.

La gH homóloga es, preferentemente, gH del virus del herpes simple 2 (HSV-2), virus de la varicela-zóster (virus del herpes humano 3, HHV-3), virus de la pseudorrabia (PRV) del virus del herpes alfa porcino, virus del herpes alfa1 de chimpancé (ChHV), virus del herpes de *Papiine* 2 (HVP2), virus del herpes de cercopitecino 2 (CeHV2), virus del herpes de macacino 1 (MHV1), virus del herpes alfa del murciélago de la fruta 1 (FBAHV1), virus del herpes de *Saimiriine* 1 (HVS1), virus del herpes de callitricino 3 (CalHV3), virus del herpes de *Saimiriine* 2 (HVS2), virus del herpes bovino 1 (BoHV-1), virus del herpes bovino 5 (BoHV-5), virus del herpes equino 1 (EHV-1), virus del herpes equino 2 (EHV-2), virus del herpes equino 5 (EHV-5), virus del herpes canino 1 (CHV), virus del herpes felino 1 (FHV-1), virus del herpes de cercopitecino 9 (CeHV-9), virus de la enteritis de pato (DEV, AnHV-1), virus del herpes bovino 2 (BoHV-2), virus del herpes de lepórido 4 (LHV-4), virus del herpes equino 3 (EHV-3), virus del herpes equino 4 (EHV-4), virus del herpes equino 8 (EHV-8), virus del herpes equino 9 (EHV-9), virus de la enfermedad de Marek (MDV), serotipo 2 del virus de la enfermedad de Marek (MDV2), virus del herpes aviar 3 (GaHV-3), virus del herpes aviar 2 (GaHV-2), virus del herpes asociado a la enfermedad de pulmones-ojos-tráquea (LETV), virus del herpes aviar 1 (GaHV-1), virus del herpes de psitácido 1 (PsHV-1), virus del herpes humano 8 (HHV-8), virus del herpes humano 4 (HHV-4), virus del herpes de falcónido de tipo 1 (FaHV-1), virus del herpes de quelónido 5 (CHHV5), virus del herpes de atelino 3 (AtHV3) o virus del herpes de *Meleagridae* 1 (MeHV-1). Estos virus del herpes y HSV-1 tienen secuencias de gH que son altamente conservadas con respecto a la de HSV-1. Más preferentemente, la gH homóloga es gH del virus del herpes simple 2 (HSV-2), virus del herpes alfa1 de chimpancé (ChHV), virus del herpes de *Papiine* 2 (HVP2), virus del herpes de cercopitecino 2 (CeHV2), virus del herpes de macacino 1 (MHV1), virus del herpes alfa del murciélago de la fruta 1 (FBAHV1), virus del herpes bovino 2 (BoHV-2)

o virus del herpes de lepórido 4 (LHV-4). De la manera más preferente, la gH homóloga es gH del virus del herpes simple 2 (HSV-2).

El ligando polipeptídico heterólogo está insertado de manera N-terminal respecto al dominio H1A de gH. Insertado de manera N-terminal a este respecto no significa adyacente al dominio H1A en el lado N-terminal, sino en cualquier parte en el lado N-terminal del dominio H1A. El dominio H1A de gH es un subdominio del dominio HI de gH. El dominio HI se extiende desde el aminoácido 49 a 327 de la proteína gH, según la SEQ ID NO: 1, y el dominio H1A se extiende desde el aminoácido 49 a 115 de la proteína gH, según la SEQ ID NO: 1 (Chowdary et al., 2010). Muchas proteínas gH tienen un dominio H1A, que se puede identificar por alineación de secuencias con la SEQ ID NO: 1, o por similitud estructural dentro del dominio HI como es el caso para gH del virus de la varicela-zóster (virus del herpes humano 3). No todos los virus del herpes pueden tener una gH con una región correspondiente a los aminoácidos 1 a 48 de la proteína gH, según la SEQ ID NO: 1. Sin embargo, cada gH madura tiene, como mínimo, algún/algunos aminoácido(s), por ejemplo, 1, 2 o 3, de manera N-terminal respecto al dominio H1A. Un ejemplo es el EBV, en el que solo 1 residuo precede al dominio H1A en el péptido maduro (suponiendo que el dominio H1A comienza en el primer residuo visible en la estructura de rayos X, es decir, para la posición 19 del EBV del precursor de gH). En el caso de una gH en la que esta región precedente sea muy corta, por ejemplo, 10 o menos, 5 o menos o 3 o menos aminoácidos, se prevé que la inserción está detrás (es decir, C-terminal) de estos residuos y que, opcionalmente, estos residuos están duplicados detrás de la inserción, es decir, entre la inserción y el dominio H1A.

En una realización del primer aspecto de la presente invención, el virus del herpes tiene una virulencia reducida con respecto a la virulencia del virus de tipo natural o tiene una capacidad de replicación que es diferente en células enfermas frente a células no enfermas. El término "virulencia del virus de tipo natural" se refiere a la capacidad de infectar, en particular de entrar en las células, que tiene el virus del herpes de tipo natural, es decir, no recombinante. En una realización particular, la virulencia reducida es una capacidad reducida o incluso eliminada de unirse a los receptores de superficie celular diana a los que se une el virus de tipo natural. Tales receptores de superficie celular diana incluyen, por ejemplo, HVEM (sinónimos utilizados en la técnica: HveA y TNFRSF14) y Nectina-1 (sinónimos utilizados en la técnica: HveC y PVRL1), a los que se une gD, proteoglicanos de sulfato de heparano a los que se unen gB y gC, glicoproteína asociada a la mielina MAG, receptor alfa de tipo 2 similar a inmunoglobina emparejada (PILRalfa), DC-SIGN y cadena pesada 9 de miosina no muscular MYH9/NMHC-IIA a los que se une gB e integrina ITGB3/ $\alpha v \beta 3$ a la que se une gH-gL, integrina $\alpha f \beta v \beta 6$ e integrina $\alpha f \beta v \beta 8$ a las que se une gH (Gianni T, Salvioli S, Chesnokova LS, Hutt-Fletcher LM, Campadelli-Fiume G. PLoS Pathog. 2013;9(12):e1003806). La unión reducida o eliminada se puede conseguir, por ejemplo, delecionando o alterando las glicoproteínas virales (por ejemplo, gD, gB o gC), o partes de las mismas, que están implicadas en la interacción con receptores de superficie celular diana.

El término "capacidad de replicación" se refiere al número de veces que un virus del herpes se puede copiar a sí mismo en una célula infectada en un momento dado. Preferentemente, cuando la capacidad de replicación es diferente en células enfermas frente a células no enfermas, es mayor en células enfermas que en células no enfermas (es decir, aumentada para células enfermas), o menor en células no enfermas que en células enfermas (es decir, disminuida para células no enfermas).

El virus del herpes infeccioso recombinante comprende una gD alterada que tiene unión reducida o inespecífica a ligandos celulares de gD o carece de gD.

En una realización más preferente, el virus del herpes tiene una gD que tiene una delección de aminoácidos comenzando en cualquiera de los residuos de aminoácido 26 a 33 y acabando en cualquiera de los residuos de aminoácido 31 a 63 (preferentemente comenzando en el residuo 31 y acabando en el residuo 63), y/o comenzando en cualquiera de los residuos de aminoácido 65 a 86 y acabando en cualquiera de los residuos de aminoácido 235 a 243 (preferentemente comenzando en el residuo 86 y acabando en el residuo 243) de la gD, según la SEQ ID NO: 4, o una región correspondiente de una gD homóloga. Con respecto a la gD madura, que carece del péptido señal de 25 aminoácidos N-terminal, esta significa una delección de aminoácidos comenzando en cualquiera de los residuos de aminoácido 1 a 8 y acabando en cualquiera de los residuos de aminoácido 6 a 38 (preferentemente comenzando en el residuo 6 y acabando en el residuo 38), y/o comenzando en cualquiera de los residuos de aminoácido 40 a 61 y acabando en cualquiera de los residuos de aminoácido 210 a 218 (preferentemente comenzando en el residuo 61 y acabando en el residuo 218) de la gD madura, respectivamente. En las mismas, los residuos inicial y final están comprendidos en la delección. El término "región correspondiente de una gD homóloga" se refiere a una región de una gD que se alinea con una región dada de gD de HSV-1 (preferentemente la delección tal como se describió anteriormente), según la SEQ ID NO: 4, cuando se utiliza el algoritmo de Smith-Waterman y los siguientes parámetros de alineación: MATRIZ: BLOSUM62, APERTURA DE HUECO: 10, EXTENSIÓN DE HUECO: 0,5. En el caso de que solo una parte o partes de la región dada de gD de HSV-1 se alinee con la secuencia de una gD homóloga utilizando el algoritmo y los parámetros anteriores, el término "región correspondiente de una gD homóloga" se refiere a la región que se alinea con la(s) parte(s) de la región dada de gD de HSV-1. En otras palabras, en este caso, la delección en la gD homóloga comprende solo los aminoácidos que se alinean con la(s) parte(s) de la región dada de gD de HSV-1. Además, en el mismo caso, el término "región correspondiente de una gD homóloga" puede referirse a una región que está flanqueada por secuencias flanqueantes correspondientes, en la que las secuencias flanqueantes correspondientes son secuencias de la gD homóloga que se alinean, utilizando

el algoritmo y los parámetros anteriores, con secuencias que flanquean la región dada anterior (preferentemente la delección tal como se describió anteriormente) de gD de HSV-1. Estas secuencias flanqueantes de gD de HSV-1 tienen una longitud de, como mínimo, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40 o 50 aminoácidos (la secuencia flanqueante en el extremo N-terminal de la gD, es decir, N-terminal respecto a cualquier residuo de aminoácido 26 a 33, según la SEQ ID NO: 4, puede ser más corta, es decir, tal como se especifica pero hasta una longitud de 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31 o 32 residuos de aminoácido) y se alinean con la secuencia de una gD homóloga utilizando el algoritmo y los parámetros anteriores. La gD homóloga es, preferentemente, gD de HSV-2, gD del virus del herpes alfa1 de chimpancé (CHHV), gD del virus del herpes de macacino 1 (MHV1), gD del virus del herpes de *Papiine* 2 (HVP2), gD del virus del herpes de cercopitecino 1 (CeHV1), gD del virus del herpes de cercopitecino 2 (CeHV2), gD virus del herpes de *Saimiriine* 1 (HVS1), gD del virus del herpes bovino 1 (BoHV-1), gD del virus del herpes bovino 5 (BoHV-5), gD del virus del herpes equino 1 (EHV-1), gD del virus del herpes equino 3 (EHV-3), gD del virus del herpes equino 4 (EHV-4), gD del virus del herpes equino 8 (EHV-8), gD del virus del herpes equino 9 (EHV-9), gD del virus del herpes canino 1 (CHV), gD del virus del herpes felino 1 (FHV-1), gD del virus de la enteritis de pato (DEV), gD del virus del herpes de alce (ElkHV), gD del virus del herpes rangiferino (RanHV), gD del virus del herpes de cérvido 1 (CerHV-1), virus del herpes de lepórido 4 (LHV-4), virus del herpes de cérvido 2 (CerHV-2), gD del virus del herpes caprino 1 (CaphV-1), gD del virus del herpes bufalino 1 (BuHV1), gD del virus del herpes alfa del murciélago de la fruta 1 (FBAHV1), gD del virus del herpes de macropódido 1 (MaHV-1), virus del herpes de falcónido 1 (FaHV-1), gD del virus del herpes de macropódido 2 (MaHV-2), gD del virus de la pseudorabia porcino (PrV), virus del herpes de fócido 1 (PHHV-1), virus de la enfermedad de Marek (MDV), virus del herpes de pavo (HVT), virus del herpes de *Meleagrid* 1 (MeHV-1), gD del virus del herpes aviar 1 (GaHV-1), gD del virus del herpes aviar 2 (GaHV-2) o gD del virus del herpes de buitre (VHV). Más preferentemente, la gD homóloga es la gD de HSV-2, gD del virus del herpes alfa1 de chimpancé (CHHV), gD del virus del herpes de *Papiine* 2 (HVP2), de virus del herpes de macacino 1 (MHV1), gD del virus del herpes de cercopitecino 1 (CeHV1), gD del virus del herpes alfa del murciélago de la fruta 1 (FBAHV1), gD del virus del herpes de cercopitecino 2 (CeHV2), gD del virus del herpes de macropódido 2 (MaHV-2) o gD del virus del herpes de *Saimiriine* 1 (HVS1). De la manera más preferente, la gD homóloga es la gD de HSV-2.

En otra realización del primer aspecto de la presente invención, el ligando polipeptídico heterólogo está fusionado con un dominio que es equivalente funcionalmente al extremo N-terminal de gD y está presente en una proteína cuya función es equivalente a la gD de HSV, por ejemplo, gp42 del virus del herpes humano 4 (EBV), BZLF2 del virus del herpes de macacino, ORF44 del virus del herpes de callitrícino 3 o BZLF2 del virus del herpes linfotrópico porcino 1.

El virus del herpes también puede estar atenuado, por ejemplo, mediante delecciones en o alteraciones de los genes virales γ 134.5, UL39 y/o ICP47. El término "atenuado" se refiere a un virus del herpes debilitado o menos virulento. Es preferente una atenuación condicional, en la que la atenuación afecta solo a células no enfermas por dirigidas por el virus del herpes mediante la redirección, según la presente invención. Por tanto, solo las células enfermas (por ejemplo, células cancerosas) a las que se redirige el virus del herpes están afectadas por la virulencia completa del virus del herpes. Una atenuación condicional se puede conseguir, por ejemplo, mediante la sustitución de la región promotora del gen γ 134.5, UL39 y/o ICP47 con un promotor de un gen humano que se expresa exclusivamente en células cancerosas (por ejemplo, el promotor survivina). Modificaciones adicionales de una atenuación condicional pueden incluir la sustitución de regiones reguladoras responsables de la transcripción de genes IE, como la región promotora ICP-4, con regiones promotoras de genes expresados exclusivamente en células enfermas, por ejemplo, cancerosas (por ejemplo, el promotor survivina). Este cambio dará como resultado un HSV condicional en replicación, que se puede replicar en células cancerosas pero no en células normales. Una modificación adicional del virus puede incluir la inserción de elementos de secuencia sensibles a microARN (miR), que son abundantes en células normales pero no en tumorales, en la región sin traducir 3' de genes de HSV esenciales, como ICP4. El resultado será de nuevo un virus cuya replicación es incompetente solo en células normales.

El término "genes IE" se refiere a genes tempranos inmediatos, que son genes activados de manera transitoria y rápida en respuesta a un estímulo celular.

En otra realización del primer aspecto de la presente invención, el virus del herpes comprende un ligando polipeptídico heterólogo fusionado con el extremo N-terminal de la gD madura o de una gD truncada, o insertado en la gD (también denominada en el presente documento gD modificada). En una realización preferente, el ligando polipeptídico heterólogo insertado en la gD está insertado de manera C-terminal respecto a cualquiera de los aminoácidos 26 a 243 de la gD, según la SEQ ID NO: 4 (1 a 218 de la gD madura) o reemplaza una secuencia de aminoácidos comenzando en cualquiera de los residuos de aminoácido 26 a 33 y acabando en cualquiera de los residuos de aminoácido 31 a 63 (preferentemente comenzando en el residuo 31 y acabando en el residuo 63), y/o comenzando en cualquiera de los residuos de aminoácido 65 a 86 y acabando en cualquiera de los residuos de aminoácido 235 a 243 (preferentemente comenzando en el residuo 86 y acabando en el residuo 243) de la gD, según la SEQ ID NO: 4, o una región correspondiente de una gD homóloga. De nuevo, el término "región correspondiente de una gD homóloga" se refiere a una región de una gD que se alinea con una región dada de gD de HSV-1 (preferentemente la secuencia de aminoácidos que se va a reemplazar tal como se describió anteriormente), según la SEQ ID NO: 4, cuando se utiliza el algoritmo de Smith-Waterman y los siguientes parámetros de alineación: MATRIZ: BLOSUM62, APERTURA DE HUECO: 10, EXTENSIÓN DE HUECO: 0,5. En el

caso de que solo una parte o partes de la región dada de gD de HSV-1 se alinee con la secuencia de una gD homóloga utilizando el algoritmo y los parámetros anteriores, el término “región correspondiente de una gD homóloga” se refiere a la región que se alinea con la(s) parte(s) de la región dada de gD de HSV-1. En otras palabras, en este caso, la secuencia que se va a reemplazar en la gD homóloga comprende solo los aminoácidos que se alinean con la(s) parte(s) de la región dada de gD de HSV-1. Además, en el mismo caso, el término “región correspondiente de una gD homóloga” puede referirse a una región que está flanqueada por secuencias flanqueantes correspondientes, en la que las secuencias flanqueantes correspondientes son secuencias de la gD homóloga que se alinean, utilizando el algoritmo y los parámetros anteriores, con secuencias que flanquean la región dada anterior (preferentemente la secuencia de aminoácidos que se va a reemplazar tal como se describió anteriormente) de gD de HSV-1. Estas secuencias flanqueantes de gD de HSV-1 tienen una longitud de, como mínimo, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40 o 50 aminoácidos (la secuencia flanqueante en el extremo N-terminal de gD, es decir, N-terminal respecto a cualquier residuo de aminoácido 26 a 33, según la SEQ ID NO: 4, puede ser más corta, es decir, tal como se especifica pero hasta una longitud de 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31 o 32 residuos de aminoácido) y se alinean con la secuencia de una gD homóloga utilizando el algoritmo y los parámetros anteriores. La gD homóloga es tal como se especificó anteriormente con respecto a la delección de gD.

En una realización preferente del primer aspecto de la presente invención, el ligando polipeptídico heterólogo fusionado con o insertado en la gH y/o gD se une a una molécula diana, o a una parte de la misma, accesible en la superficie de una célula. Preferentemente, se une específicamente a una molécula, o a una parte de la misma, accesible en la superficie de una célula. El término “se une específicamente”, tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a una reacción de unión que es determinante de la presencia de dicha molécula en una población heterogénea de proteínas y, en particular, células, tales como en un organismo, preferentemente un cuerpo humano. De este modo, el ligando especificado se une a su molécula diana particular y no se une en una cantidad sustancial a otras moléculas presentes en las células o a otras moléculas con las que el ligando puede entrar en contacto en un organismo. En general, un ligando que “se une específicamente” a una molécula diana tiene una constante de afinidad en equilibrio superior a aproximadamente 10^5 (por ejemplo, 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} , 10^{11} y 10^{12} o más) moles/litro por esa molécula diana. En general, el ligando polipeptídico heterólogo fusionado con o insertado en la gH se puede unir a la misma molécula, o a una diferente, o a una parte de la misma, accesible en la superficie de una célula que el ligando polipeptídico fusionado con o insertado en la gD. Se cree que la unión a la misma molécula aumenta el grado de unión a la molécula, mientras que la unión a moléculas diferentes otorga una especificidad dual, y permite: 1) un mantenimiento de la especificidad celular en el caso de que una de las moléculas ya no esté presente en la superficie celular, por ejemplo, en el caso de una célula tumoral mutada; 2) lidiar con la heterogeneidad tumoral: los tumores son heterogéneos y, con frecuencia, una molécula específica de tumor no se expresa en todas las células tumorales; por tanto, la dirección dual permite al virus entrar en las células utilizando o bien el primer receptor dirigido o bien el segundo, aumentando de ese modo el número de células tumorales que se pueden infectar.

En una realización, el ligando polipeptídico heterólogo se selecciona entre el grupo que consiste en un anticuerpo, un derivado de anticuerpo y un mimético de anticuerpo. El anticuerpo, derivado de anticuerpo o mimético de anticuerpo puede ser monoespecífico (es decir, específico de una molécula diana, o de una parte de la misma, accesible en la superficie de una célula) o multiespecífico (es decir, específico de más de una molécula diana, o de una parte de la misma, accesible en la superficie de la misma célula, o una diferente), por ejemplo, biespecífico o trispecífico (véase, por ejemplo, Castoldi et al., *Oncogene*. 12 de diciembre de 2013;32(50):5593-601; Castoldi et al., *Protein Eng Des Sel*. Octubre de 2012;25(10):551-9). La dirección simultánea de más de una molécula diana, o de una parte de la misma, accesible en la superficie de la misma célula aumenta la especificidad del virus. La dirección simultánea de más de una molécula diana, o de una parte de la misma, accesible en la superficie de una célula diferente permite lidiar con la heterogeneidad tumoral, tal como se describió anteriormente.

El término “derivado de anticuerpo”, tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a una molécula que comprende, como mínimo, un dominio variable de anticuerpo, pero que no tiene la estructura global de un anticuerpo, tal como IgA, IgD, IgE, IgG, IgM, IgY o IgW, aunque aun así es capaz de unirse a una molécula diana. Dichos derivados pueden ser, pero no se limitan a, fragmentos de anticuerpo funcionales (es decir, que se unen a la diana, particularmente que se unen a la diana de manera específica), tales como Fab, Fab2, scFv, Fv o partes de los mismos, u otros derivados o combinaciones de las inmunoglobulinas, tales como nanocuerpos, diacuerpos, minicuerpos, anticuerpos de dominio único de camélido, dominios únicos o fragmentos Fab, dominios de las cadenas pesada y ligera de la región variable (tales como Fd, VL, incluyendo Vlambda y V kappa, VH, VHH), así como minidominios que consisten en dos cadenas beta de un dominio de inmunoglobulina conectado por, como mínimo, dos bucles estructurales. Preferentemente, el derivado de anticuerpo es monovalente. Más preferentemente, el derivado es un anticuerpo monocatenario que, de la manera más preferente, tiene la estructura VL-ligador peptídico-VH o VH-ligador peptídico-VL.

El término “mimético de anticuerpo”, tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a compuestos orgánicos que, al igual que los anticuerpos, se pueden unir específicamente a antígenos, pero que no están relacionados estructuralmente con los anticuerpos. Habitualmente son péptidos o proteínas artificiales con una masa molar de aproximadamente 3 a 20 kDa. Ejemplos no limitativos de miméticos de anticuerpo son aficuerpos, afinas, afímeros, afitinas, anticalinas, avímeros, DARPin, finómeros, péptidos del dominio Kunitz, monocuerpos, dominio Z

de la proteína A, gamma B cristalina, ubiquitina, cistatina, Sac7D de *Sulfolobus acidocaldarius*, lipocalina, dominio A de un receptor de membrana, motivo de repetición de anquirina, dominio SH3 de Fyn, dominio Kunitz de inhibidores de proteasas, el 10^o dominio de tipo III de fibronectina, ligandos heterobivalentes o heteromultivalentes sintéticos (Josán et al., Bioconjug Chem. 2011 22(7): 1270-1278; Xu et al., PNAS 2012 109 (52) 21295-21300; Shallal et al., Bioconjug Chem. 2014 25(2) 393-405) o ligandos peptídicos sintéticos, por ejemplo, de una biblioteca de péptidos (al azar). Los ligandos peptídicos sintéticos tienen secuencias de aminoácidos que no se producen de manera natural que funcionan para unirse a una molécula diana particular. En general, los ligandos peptídicos, dentro del contexto de la presente invención, son secuencias de aminoácidos restringidas (es decir, que tienen algún elemento de estructura como, por ejemplo, la presencia de aminoácidos que inician un giro β o una lámina plegada β , o, por ejemplo, ciclados por la presencia de residuos de Cys unidos por disulfuro) o no restringidas (lineales) de menos de aproximadamente 50 residuos de aminoácido y, preferentemente, menos de aproximadamente 40 residuos de aminoácido. De los ligandos peptídicos de menos de aproximadamente 40 residuos de aminoácido, son preferentes los ligandos peptídicos de entre aproximadamente 10 y aproximadamente 30 residuos de aminoácido.

En una realización, la célula es una célula enferma. En particular, puede ser una célula tumoral, una célula infectada de manera crónica o una célula senescente.

En el caso de una célula tumoral, la enfermedad subyacente es un tumor, preferentemente seleccionado entre el grupo que consiste en cáncer suprarrenal, cáncer de ano, cáncer de vías biliares, cáncer de vejiga, cáncer de huesos, cáncer de cerebro/SNC, tumores, cáncer de mama, cáncer primario oculto, enfermedad de Castleman, cáncer de cuello uterino, cáncer de colon/recto, cáncer de endometrio, cáncer de esófago, familia Ewing de tumores, cáncer de ojo, cáncer de vesícula biliar, tumores carcinoides gastrointestinales, tumor del estroma gastrointestinal (GIST), enfermedad trofoblástica gestacional, enfermedad de Hodgkin, sarcoma de Kaposi, cáncer de riñón, cáncer de laringe e hipofaringe, leucemia, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, linfoma, linfoma de la piel, mesotelioma maligno, mieloma múltiple, síndrome mielodisplásico, cáncer de la cavidad nasal y del seno paranasal, cáncer de nasofaringe, neuroblastoma, linfoma no Hodgkin, cáncer de la cavidad bucal y de orofaringe, osteosarcoma, cáncer de ovarios, cáncer de páncreas, cáncer de pene, tumores de hipófisis, cáncer de próstata, retinoblastoma, rhabdomyosarcoma, cáncer de las glándulas salivales, sarcoma - cáncer de partes blandas en adultos, cáncer de piel, cáncer de intestino delgado, cáncer de estómago, cáncer de testículo, cáncer de timo, cáncer de tiroides, sarcoma uterino, cáncer de vagina, cáncer de vulva, macroglobulinemia de Waldenström y tumor de Wilms.

Las enfermedades tumorales preferentes son cánceres positivos para HER-2 (como cáncer de mama, cáncer de ovarios, cáncer de estómago, cáncer de pulmón, cáncer de cabeza y cuello, osteosarcoma y glioblastoma multiforme), cánceres positivos para EGFR (como cáncer de cabeza y cuello, glioblastoma multiforme, cáncer de pulmón no microcítico, cáncer de mama, cáncer colorrectal y de páncreas), cánceres positivos para EGFR-vIII (como glioblastoma multiforme), cánceres positivos para PSMA (como cáncer de próstata), linfoma positivo para CD20+ y tumores relacionados con EBV.

En el caso de una célula infectada de manera crónica, la enfermedad subyacente es una enfermedad infecciosa crónica, tal como tuberculosis, malaria, hepatitis viral crónica (HBV, virus de la hepatitis D y HCV), síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA, provocado por el HIV, virus de la inmunodeficiencia humana) o trastornos relacionados con EBV: enfermedades autoinmunitarias sistémicas (lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide y síndrome de Sjögren) y esclerosis múltiple (EM).

En el caso de una célula senescente, la enfermedad subyacente es una enfermedad asociada a senescencia, tal como (i) enfermedades genéticas raras, denominadas síndromes, caracterizadas por un envejecimiento prematuro: síndrome de Werner (SW), síndrome de Bloom (SB), síndrome de Rothmund-Thomson (SRT), síndrome de Cockayne (SC), xeroderma pigmentosa (XP), tricotodistrofia o síndrome de progeria de Hutchinson-Gilford (SPHG) o (ii) trastornos relacionados con la edad habituales: obesidad, diabetes de tipo 2, sarcopenia, artrosis, fibrosis pulmonar idiopática y enfermedad pulmonar obstructiva crónica, cataratas, enfermedades neurodegenerativas o trastornos relacionados con el tratamiento del cáncer.

En una realización, en cuanto a la molécula diana, o una parte de la misma, accesible en la superficie de una célula, la molécula diana es una proteína, un glicolípido o un glicósido. Preferentemente, la proteína es un receptor celular. En el caso de una célula tumoral, es preferente que la proteína de superficie celular sea un antígeno asociado a cáncer, tal como HER2, EGFR, EGFRvIII, EGFR3 (ERBB3), MET, FAP, PSMA, CXCR4, ITGB3, CEA, CAIX, mucinas, proteína de unión a folato, GD2, VEGFR1, VEGFR2, CD20, CD30, CD33, CD52, CTLA4, CD55, integrina α V β 3, integrina α 5 β 1, IGF1R, EPHA3, RANKL, TRAILR1, TRAILR2, IL13R α 1, UPAR, tenascina, PD-1, PD-L1, glicoproteína 72 asociada a tumor, gangliósido GM2, A33, antígeno Y de Lewis o MUC1. En el caso de una célula senescente, la molécula diana es cualquier proteína de superficie que sea expresada por la célula senescente como, por ejemplo, CXCR2 o el receptor de IL-1.

En una realización, la molécula diana, o una parte de la misma, accesible en la superficie de una célula enferma no es accesible de manera natural en la superficie de la célula, es decir, no es accesible en la superficie de una célula no enferma (es decir, sana) del mismo tipo y/o tejido y, preferentemente, no es accesible en la superficie de ninguna otra célula del mismo organismo. En una realización relacionada en cuanto a enfermedades por infecciones

crónicas, la molécula diana es una molécula derivada de un patógeno (por ejemplo, un virus, una bacteria o un parásito) que infectó la célula y se expresa en la superficie de la célula infectada (tal como HBsAg de HBV, gp120 de HIV, E1 y E2 de HCV, LMP1 y LMP2 de EBV). En otra realización, el ligando polipeptídico heterólogo fusionado con o insertado en la gD no se une a ninguna molécula, ni a una parte de la misma, accesible en la superficie de una célula, pero anula la unión a receptores de HSV naturales. Tal como se indica, en esta realización, el ligando fusionado con o insertado en la gD tiene el propósito de anular la capacidad de gD de unirse a sus receptores naturales. La dirección a la célula diana se logra mediante la fusión con o inserción en una glicoproteína diferente del virus, en particular gH.

En otra realización, el ligando polipeptídico heterólogo fusionado con o insertado en la gH o gD se une a una molécula heteróloga, o a una parte de la misma, accesible en la superficie de una célula. El término "molécula heteróloga", tal como se utiliza en el presente documento, con respecto a células se refiere a una molécula que no es nativa de la célula. En particular, no se produce y/o no se puede producir de manera natural (es decir, de manera no recombinante) por la célula. Preferentemente, en el caso de un polipéptido, no está codificado por el genoma nativo (es decir, inalterado de manera recombinante) de la célula. En esta realización, la célula seleccionada como diana por la gH o gD que se une a la molécula heteróloga, o a una parte de la misma, accesible en la superficie de la célula se puede utilizar para el crecimiento, es decir, la propagación, del virus. El modo de propagación es específico para esta célula, y otras células (tales como células de un paciente que se va a tratar utilizando este virus del herpes) no serán seleccionadas como diana por la gH o gD que se une a la molécula heteróloga, o a una parte de la misma.

En una realización adicional del primer aspecto de la presente invención, el virus del herpes infeccioso recombinante comprende un marcador detectable heterólogo, preferentemente en un casete de expresión. El término "marcador detectable", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a marcadores y etiquetas utilizados habitualmente en el sector, por ejemplo, marcadores enzimáticos, tales como fosfatasa y peroxidasa, transportadores de membrana, tales como el cotransportador unidireccional NaI, los radiomarcadores PET o SPEC o marcadores fluorescentes. Los marcadores fluorescentes incluyen, por ejemplo, GFP y variantes de GFP, por ejemplo, GFP mutantes que tienen un espectro de fluorescencia diferente, RFP (por ejemplo, RFP de mCherry) y variantes de RFP, por ejemplo, GFP mutantes que tienen un espectro de fluorescencia diferente, proteína fluorescente inducible por bilirrubina UnaG, dsRed, eqFP611, Dronpa, TagRFP, KFP, EosFP, Dendra e IrisFP. Para la visualización de tumores, el transportador de membrana cotransportador unidireccional NaI es particularmente adecuado.

Preferentemente, el marcador detectable está insertado en una región que no interfiere en la infección de la célula por el virus o en la multiplicación del virus en la célula o en la propagación del virus que. En particular, la región no interrumpe ninguna superposición ni ninguna unidad de transcripción (sentido o antisentido). Preferentemente, el marcador detectable está insertado en una secuencia intergénica del genoma del virus del herpes, más preferentemente entre las secuencias intergénicas UL37 y UL38, UL3 y UL4 o US1 y US2.

En una realización adicional del primer aspecto, el virus del herpes infeccioso recombinante comprende uno o varios casetes de expresión que expresan uno o varios de los siguientes

- i) una o varias proteínas terapéuticas, tales como inmunomoduladores con actividad proinflamatoria o antiinflamatoria (incluyendo citocinas, preferentemente citocinas que estimulan la respuesta inmunitaria como GM-CSF o IL12), anticuerpos, derivados de los mismos o miméticos de anticuerpo, por ejemplo, anticuerpos, derivados de los mismos o miméticos de anticuerpo contra inhibidores del punto de control (por ejemplo, PDL1, PD1, CTLA4), o proteínas que pueden modificar el microentorno de una enfermedad (por ejemplo, collagenasa), en particular el microentorno de un tumor,
- ii) uno o varios antígenos, epítomos/neoepítomos o una cadena de epítomos/neoepítomos heterólogos o autólogos, o
- iii) una o varias enzimas de conversión de profármacos, tales como valaciclovir y proteína cinasa del citomegalovirus humano, CYP2B1, citosina desaminasa, purina-desoxinucleósido fosforilasa, carboxilesterasa, acetilcolinesterasa, butirilcolinesterasa, paraoxonasa, metaloproteinasas de matriz, fosfatasa alcalina, β -glucuronidasa, valaciclovirasa, plasmina, carboxipeptidasa G2, penicilina amidasa, β -lactamasa o β -galactosidasa (ejemplos de Yang et al., Acta Pharmaceutica Sinica B 2011 1(3)143-159).

En una realización particular del primer aspecto, el virus del herpes infeccioso recombinante tiene una gH modificada con una secuencia de aminoácidos, según la SEQ ID NO: 2 (gH como en la construcción R-VG803, R-VG805 y R-VG809 de los ejemplos; scFv-HER2 entre los aa 23-24 de la gH de tipo natural) o la SEQ ID NO: 3 (gH como en la construcción R-VG811 de los ejemplos; scFv-HER2 que reemplaza a los aa 24-47 de la gH de tipo natural), careciendo ambas de la secuencia señal (residuos 1-18 de las SEQ ID NO: 2 y 3, respectivamente), o una variante funcional de las misma que tiene una identidad de secuencia de, como mínimo, el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 % o el 99 % y, opcionalmente, una gD modificada con una secuencia de aminoácidos, según la SEQ ID NO: 5 (gD como en la construcción R-LM113 de los ejemplos, scFv HER2 que reemplaza a los aa 31 a 63 de gD de tipo natural), la SEQ ID NO: 6 (gD como en la construcción R-LM249 de los ejemplos, scFv HER2 que reemplaza los aa 86-243 de la gD de tipo natural), la SEQ ID NO: 7 (gD como en la construcción R-VG805 de los

ejemplos, scFv EGFR que reemplaza los aa 31 a 63 de la gD de tipo natural), la SEQ ID NO: 8 (gD como en la construcción R-VG807 de los ejemplos, scFv-HER2 que reemplaza los aa 31 a 63 de la gD de tipo natural) o la SEQ ID NO: 9 (gD como en la construcción R-VG809 de los ejemplos, delección de los aa 31 a 63 de la gD de tipo natural), careciendo todas ellas de la secuencia señal (residuos 1-25 de las SEQ ID NO 5-9), o una variante funcional de las mismas que tiene una identidad de secuencia de, como mínimo, el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 % o el 99 %. El término "funcional" a este respecto, aparte de gD, según la SEQ ID NO: 9, significa que la gH y/o gD es capaz de mediar la infección de una célula que porta HER2 y/o EGFR, respectivamente, en su superficie. Con respecto a gD, según la SEQ ID NO: 9, significa que la gD con la delección y sin inserción no es capaz de mediar la infección de ninguna célula, en particular mediante HVEM o Nectina-1.

En otra realización particular del primer aspecto, el virus del herpes infeccioso recombinante tiene una gH modificada con una secuencia de aminoácidos, según la SEQ ID NO: 2 o 3, en el que la gH comprende cualquier ligando peptídico heterólogo, tal como se definió anteriormente, en lugar de scFv-HER2 (particularmente no scFv-HER2), o una variante funcional del mismo que tiene una identidad de secuencia de, como mínimo, el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 % o el 99 % y, opcionalmente, una gD modificada con una secuencia de aminoácidos, según cualquiera de las SEQ ID NO: 5-9, en el que la gD de las SEQ ID NO: 5-9 comprende cualquier ligando peptídico heterólogo, tal como se definió anteriormente, en lugar del definido en estas secuencias (scFv-HER2 y scFv-EGFR, respectivamente; cualquier significa, en particular, no el ligando peptídico heterólogo definido en estas secuencias). El término "funcional" a este respecto, aparte de gD, según la SEQ ID NO: 9, significa que la gH y/o gD es capaz de mediar la infección de una célula que porta una molécula en su superficie a la que se une el ligando peptídico heterólogo comprendido en gH/gD. Con respecto a gD, según la SEQ ID NO: 9, significa que la gD con la delección y sin inserción no es capaz de mediar la infección de ninguna célula, en particular mediante HVEM o Nectina-1.

En un segundo aspecto, la presente invención se refiere al virus del herpes infeccioso recombinante del primer aspecto, para su utilización en el tratamiento de una enfermedad.

En una realización preferente, dicha enfermedad es una enfermedad tumoral, una enfermedad infecciosa crónica o una enfermedad asociada a senescencia.

La enfermedad tumoral se selecciona, preferentemente, entre el grupo que consiste en cáncer suprarrenal, cáncer de ano, cáncer de vías biliares, cáncer de vejiga, cáncer de huesos, cáncer de cerebro/SNC, tumores, cáncer de mama, cáncer primario oculto, enfermedad de Castleman, cáncer de cuello uterino, cáncer de colon/recto, cáncer de endometrio, cáncer de esófago, familia Ewing de tumores, cáncer de ojo, cáncer de vesícula biliar, tumores carcinoides gastrointestinales, tumor del estroma gastrointestinal (GIST), enfermedad trofoblástica gestacional, enfermedad de Hodgkin, sarcoma de Kaposi, cáncer de riñón, cáncer de laringe e hipofaringe, leucemia, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, linfoma, linfoma de la piel, mesotelioma maligno, mieloma múltiple, síndrome mielodisplásico, cáncer de la cavidad nasal y del seno paranasal, cáncer de nasofaringe, neuroblastoma, linfoma no Hodgkin, cáncer de la cavidad bucal y de orofaringe, osteosarcoma, cáncer de ovarios, cáncer de páncreas, cáncer de pene, tumores de hipófisis, cáncer de próstata, retinoblastoma, rhabdomyosarcoma, cáncer de las glándulas salivales, sarcoma - cáncer de partes blandas en adultos, cáncer de piel, cáncer de intestino delgado, cáncer de estómago, cáncer de testículo, cáncer de timo, cáncer de tiroides, sarcoma uterino, cáncer de vagina, cáncer de vulva, macroglobulinemia de Waldenstrom y tumor de Wilms.

Preferente, las enfermedades tumorales son cánceres positivos para HER-2 (como cáncer de mama, cáncer de ovarios, cáncer de estómago, cáncer de pulmón, cáncer de cabeza y cuello, osteosarcoma y glioblastoma multiforme), cánceres positivos para EGFR (como cáncer de cabeza y cuello, glioblastoma multiforme, cáncer de pulmón no microcítico, cáncer de mama, cáncer colorrectal y de páncreas), cánceres positivos para EGFR-VIII (como glioblastoma multiforme), cánceres positivos para PSMA (como cáncer de próstata), linfoma positivo para CD20+ y tumores relacionados con EBV.

La enfermedad infecciosa crónica se selecciona, preferentemente, entre el grupo que consiste en tuberculosis, malaria, hepatitis viral crónica (HBV, virus de la hepatitis D y HCV), síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA, provocado por el HIV, virus de la inmunodeficiencia humana) o trastornos relacionados con EBV, por ejemplo, enfermedades autoinmunitarias sistémicas (lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide y síndrome de Sjogren) y esclerosis múltiple (EM).

La enfermedad asociada a senescencia se selecciona, preferentemente, entre el grupo que consiste en (i) enfermedades genéticas raras, denominadas síndromes progeroides, caracterizadas por un envejecimiento prematuro: síndrome de Werner (SW), síndrome de Bloom (SB), síndrome de Rothmund-Thomson (SRT), síndrome de Cockayne (SC), xerodermia pigmentosa (XP), tricotodistrofia o síndrome de progeria de Hutchinson-Gilford (SPHG) o (ii) trastornos relacionados con la edad habituales: obesidad, diabetes de tipo 2, sarcopenia, artrosis, fibrosis pulmonar idiopática y enfermedad pulmonar obstructiva crónica, cataratas, enfermedades neurodegenerativas o trastornos relacionados con el tratamiento del cáncer.

En un tercer aspecto, la presente invención se refiere a un ácido nucleico que comprende el genoma del virus del

herpes infeccioso recombinante del primer aspecto, en el que el genoma codifica el ligando polipeptídico heterólogo fusionado con o insertado en la gH, tal como se define en (a), y la gD alterada que comprende el ligando polipeptídico heterólogo, tal como se define en (b). Se debe entender que el ácido nucleico, en particular el genoma, no codifica, preferentemente, la gH modificada y, opcionalmente, la gD modificada como proteínas maduras, sino como precursores que incluyen las secuencias señal (residuos 1-18 de la SEQ ID NO: 1 y residuos 1-25 de la SEQ ID NO: 4). Ejemplos representativos son gH y gD, según las SEQ ID NO 2, 3 y 5-9.

En un cuarto aspecto, la presente invención se refiere a un vector que comprende el ácido nucleico del tercer aspecto. En la técnica se conocen vectores adecuados, e incluyen, por ejemplo, plásmidos, cósmidos, cromosomas artificiales (por ejemplo, bacterianos, de levaduras o humanos), bacteriófagos, vectores virales (por ejemplo, retrovirus, lentivirus, adenovirus, virus adenoasociados), en particular vector de baculovirus, o sustancias modificadas por nanoingeniería (por ejemplo, ormosiles).

En una realización, el vector está modificado, en particular mediante una delección, inserción y/o mutación de uno o varios residuos de ácido nucleico, de tal manera que su virulencia está atenuada, preferentemente en el caso de un vector viral, o que se replica de manera condicional en células enfermas pero no en células no enfermas. Por ejemplo, se incluye la sustitución de la región promotora del gen γ 34.5 con un promotor de un gen humano que se expresa exclusivamente en células cancerosas (por ejemplo, el promotor survivina), que dará como resultado un fenotipo atenuado en células no cancerosas y un fenotipo no atenuado en células cancerosas. Modificaciones adicionales pueden incluir la sustitución de regiones reguladoras responsables de la transcripción de genes IE, como la región promotora ICP-4, con promotores de genes expresados exclusivamente en células cancerosas (por ejemplo, el promotor survivina). Este cambio producirá un HSV condicional en replicación, que se puede replicar en células cancerosas pero no en células normales. Las células del cultivo celular para la propagación de los descendientes del virus proporcionarán altos niveles de proteínas activadoras de promotores específicos para permitir la producción de altos rendimientos de virus.

En un quinto aspecto, la presente invención se refiere a una célula que comprende el virus del herpes infeccioso recombinante del primer aspecto, el ácido nucleico del tercer aspecto o el vector del cuarto aspecto. Preferentemente, la célula es una célula de cultivo celular. En la técnica se conocen bien cultivos celulares y técnicas de cultivo adecuados, véase, por ejemplo, Peterson et al., Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 1988;11(2):93-8.

En un sexto aspecto, la presente invención se refiere al virus del herpes infeccioso recombinante del primer aspecto, para su utilización como medicamento.

En un séptimo aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento *in vitro* para destruir una célula utilizando el virus del herpes infeccioso recombinante del primer aspecto. En una realización, se pueden destruir células en un cultivo celular que portan la molécula diana en su superficie, por ejemplo, para poner a prueba la eficacia lítica del virus del herpes infeccioso recombinante del primer aspecto. En otra realización, la célula es una célula enferma obtenida de un paciente, por ejemplo, una célula tumoral de un paciente con cáncer y, opcionalmente, propagada. Esta célula está infectada y, por tanto, se destruye por el virus del herpes infeccioso recombinante del primer aspecto. La destrucción exitosa de células obtenidas del paciente es indicativa de la especificidad celular del virus del herpes infeccioso recombinante del primer aspecto, *in vivo* en el paciente, es decir, del éxito terapéutico. En una realización adicional, también se pueden obtener células no enfermas del mismo paciente o de un sujeto que no padece la enfermedad que padece el paciente como control (células que no portan la molécula diana en su superficie), como indicación de si las células no enfermas son susceptibles o no de infección por el virus del herpes infeccioso recombinante. En aún otra realización, se destruyen células enfermas comprendidas en una población de células (por ejemplo, tejido tal como sangre) que comprende células no enfermas y células enfermas (por ejemplo, células cancerosas tales como células de leucemia) después del aislamiento de la población de células del paciente (por ejemplo, leucocitaféresis). Esto es para obtener una población de células libre de células enfermas, por ejemplo, sangre libre de células enfermas, tales como células de leucemia, en particular para un posterior trasplante de la población de células a un paciente, preferentemente al mismo paciente del que se aisló la población de células. En el caso de sangre y leucemia, por ejemplo, este procedimiento permite una reinfusión de sangre libre de células tumorales.

En un octavo aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento *in vitro* para hacer crecer el virus del herpes infeccioso recombinante del primer aspecto, en células. En la técnica se conocen bien técnicas y condiciones adecuadas para hacer crecer el virus del herpes en células, véase, por ejemplo, Peterson et al., (Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 1988;11(2):93-8). En una realización particular, el virus del herpes infeccioso recombinante del primer aspecto, comprende una gH y gD modificadas tal como se describió anteriormente. Preferentemente, las células en las que se hace crecer el virus del herpes portan una molécula diana a la que se une o bien (i) el ligando de la gH modificada o bien (ii) el ligando de la gD modificada. En el caso de (i), el ligando de la gD modificada se une a una molécula de una célula que se va a seleccionar como diana *in vivo*, preferentemente una célula enferma en un paciente, y el ligando de la gH modificada se une a una molécula de una célula que se va a seleccionar como diana en un cultivo celular; en el caso de (ii), el ligando de la gH modificada se une a una molécula de una célula que se va a seleccionar como diana *in vivo*, preferentemente una célula enferma en un paciente, y el ligando de la gD

modificada se une a una molécula de una célula que se va a seleccionar como diana en un cultivo celular.

La presente invención se describe por medio de los siguientes ejemplos que se deben interpretar simplemente como ilustrativos y no limitativos del alcance de la presente invención. Cabe señalar que, en los ejemplos, las referencias a residuos de aminoácido con respecto a gH se refieren a la proteína precursora, según la SEQ ID NO: 1, y las referencias a residuos de aminoácido con respecto a gD se refieren a la proteína madura (SEQ ID NO: 4 que carece de los residuos 1-25).

EJEMPLOS

Ejemplo 1: construcción de recombinantes de HSV que expresan gH modificadas genéticamente que portan un anticuerpo monocatenario (scFv) dirigido a Her2 (scFv-HER2), sin o con delección en el gen de HSV, y que portan mCherry como gen indicador.

A) R-VG803: Inserción de scFv-HER2 entre los aa 23 y 24 de gH de HSV por medio de recombinación de HSV-BAC y galK.

Los inventores modificaron por ingeniería R-VG801 mediante la inserción de la secuencia que codifica el scFv de trastuzumab entre los AA 23 y 24 de gH. El genoma inicial fue pYEBac102, que porta secuencias de pBeloBAC enmarcadas por LOX-P insertadas entre UL3 y UL4 del genoma de HSV-1. La modificación por ingeniería se realizó por medio de recombinación de galK. De forma breve, el casete GalK con brazos de homología a gH se amplificó por medio de los cebadores gH6_galK_f

ATGCGGTCCATGCCAGGCCATCCAAAAACCATGGGTCTGTCTGCTCAGTCCTGTTGACAATTAATCATCG
GCA (SEQ ID NO: 10) y gH5_galK_r

TCGTGGGGGTTATTATTTGGGCGTTGCGTGGGGTTCAGGTCCACGACTGGTCAGCACTGTCCTGCTCCTT

(SEQ ID NO: 11). Este casete se sometió a electroporación en bacterias SW102 que portaban pYEBac102. Los clones recombinantes que portaban el casete galK se seleccionaron en placas que contenían medio M63 ((NH₄)₂SO₄ 15 mM, KH₂PO₄ 100 mM, 1,8 µg de FeSO₄·7H₂O, ajustado a pH7) complementado con D-biotina 1 mg/l, galactosa al 0,2 %, L-leucina 45 mg/l, MgSO₄·7H₂O 1 mM y cloramfenicol 12 µg/ml. Para excluir colonias bacterianas falso positivas para galK, se sembraron en estrías también en placas a base de agar de McConkey

complementadas con galactosa al 1 % y cloramfenicol 12 µg/ml y se comprobaron mediante PCR de colonias con los cebadores galK_129_f ACAATCTCTGTTTGCCAACGCATTTGG (SEQ ID NO: 28) y galK_417_r

CATTGCCGCTGATCACCATGTCCACGC (SEQ ID NO: 29). A continuación, el casete de scFv de trastuzumab

enmarcado por los ligadores de Ser-Gly descritos a continuación y por los brazos de homología a gH se amplificó como dos fragmentos independientes, denominados fragmento # 1 y fragmento # 2, a partir de pSG-ScFvHER2-SG. pSG-ScFvHER2-SG porta un casete de scFv de trastuzumab enmarcado por ligadores de

Ser-Gly (SEQ ID NO: 12). El fragmento # 1 se amplificó por medio de los cebadores gH23_8SG_scFv4D5_f
TCGTGGGGGTTATTATTTGGGCGTTGCGTGGGGTTCAGGTCCACGACTGGCATAGTAGTGGCGGTGGCTC
TGGATCCG (SEQ ID NO: 13) y scFv4D5_358_r GGAAACGGTTTCGGATCAGCCATCGG (SEQ ID NO: 14),

utilizando pSG-ScFvHER2 como molde. El fragmento # 2 se amplificó por medio de gH24_12SG_scFv4D5r

ATGCGGTCCATGCCAGGCCATCCAAAAACCATGGGTCTGTCTGCTCAGTACCGGATCCACCGGAACCAG

AGCC (SEQ ID NO: 15) y scFv4D5_315_f GGAGATCAAATCGGATATGCCGATGG (SEQ ID NO: 16) utilizando

pSG-ScFvHER2 como molde. Los fragmentos # 1 y # 2 se hibridaron y extendieron para generar el casete

scFv-HER2, enmarcado por los ligadores de Ser-Gly y los brazos de homología a gH. El genoma recombinante

porta el scFv contra HER2 enmarcado por un ligador de Ser-Gly en el sentido 5', con la secuencia HSSGGGSG

(SEQ ID NO: 17), y un ligador de Ser-Gly en el sentido 3', con la secuencia SSGGGSGSGGSG (SEQ ID NO:

18). El ligador entre V_L y V_H es SDMPMADPNRFRGKNLVFHS (SEQ ID NO: 19). Los clones recombinantes

que portan la escisión del casete galK y la inserción de la secuencia de elección, ejemplificados por

scFv-HER2, o mCherry, se seleccionaron en placas que contenían medio M63 (véase anteriormente)

complementado con D-biotina 1 mg/l, desoxi-2-galactosa al 0,2 %, glicerol al 0,2 %, L-leucina 45 mg/l,

MgSO₄·7H₂O 1 mM y cloramfenicol 12 µg/ml. Las colonias bacterianas también se comprobaron para

determinar la presencia de la secuencia de elección por medio de PCR de colonias. En R-VG801, los

inventores insertaron después la proteína fluorescente roja mCherry en la región intergénica UL37-UL38. La

secuencia de mCherry está bajo el promotor del CMV. En primer lugar, los inventores insertaron el casete galK,

amplificado por medio de los oligonucleótidos UL37/38_galK_f

CCGCAGGCGTTGCGAGTACCCCGCTCTTCGCGGGGTGTTATACGGCCACCCTGTTGACAATTAATCATC

GGCA (SEQ ID NO: 20) y UL37/38_galK_r

TCCGGACAATCCCCGGGCCTGGGTCCGCGAACGGGATGCCGGGACTTAATCAGCACTGTCTGCTCCTT

(SEQ ID NO: 21). Posteriormente, los inventores reemplazaron la secuencia de galK por el casete

promotor-mCherry, amplificado por medio de los oligonucleótidos UL37/38_CMV_mcherry_f

CCGCAGGCGTTGCGAGTACCCCGCTCTTCGCGGGGTGTTATACGGCCACCGATGTACGGGCCAGATAT

ACG (SEQ ID NO: 22) y UL37/38_pA_mcherry_1958_r

TCCGGACAATCCCCGGGCCTGGGTCCGCGAACGGGATGCCGGGACTTAACCATAGAGCCACCGCATC

C (SEQ ID NO: 23).

B) Inserción de scFv-HER2 entre los aa 23 y 48 de gH de HSV (R-VG811).

En primer lugar, los inventores modificaron por ingeniería R-VG799, mediante la inserción de la secuencia que

codifica el scFv de trastuzumab entre los AA 23 y 48 de gH. El procedimiento fue el mismo que se describió

anteriormente para modificar por ingeniería scFv-HER2 en gH de R-VG803, con las siguientes dos diferencias. En primer lugar, el casete galK se amplificó por medio de los cebadores gH29_galK_f
CGCGGTGGTTTTGGGGTTCGGGGTGGTTGGCAGCCACAGACGCCCGTCTGTTGACAATTAATCATC
GGCA (SEQ ID NO: 24) y gH5_galK_r

TCGTGGGGTTATTATTTGGGCGTTGCGTGGGGTTCAGGTCCACGACTGGTCAGCACTGTCCTGCTCCTT
(SEQ ID NO: 25). En segundo lugar, el fragmento # 2 difirió del fragmento # 2 empleado para generar R-VG803
en que se amplificó por medio de gH48_12SG_scFv4D5_r
CCGCGCGGTGGTTTTGGGGTTCGGGGTGGTTGGCAGCCACAGACGCCCGTCTGTTGACAATTAATCATC
GAGCC (SEQ ID NO: 26) y scFv4D5_315_f GGAGATCAAATCGGATATGCCGATGG (SEQ ID NO: 27). La
secuencia de mCherry se insertó tal como se detalla para la construcción de R-VG803.

C) R-VG809: delección de los AA 6-38 de gD de R-VG803.

R-VG809 es idéntico a R-VG803 y, además, porta la delección de la secuencia correspondiente a los AA 6-38
en gD. El material inicial fue el genoma de R-VG803 BAC. Para generar la delección de los AA 6-38 en gD, el
casete galK flanqueado por los brazos de homología a gD se amplificó con los cebadores gD5_galK_f
TTGTCGTCATAGTGGGCCTCCATGGGGTCCGCGGCAAATATGCCTTGGCGCCTGTTGACAATTAATCATCG
GCA (SEQ ID NO: 30) y gD39_galK_r
ATCGGGAGGCTGGGGGGCTGGAACGGGTCCGGTAGGCCCCGCTGGATGTGTCAGCACTGTCCTGCTCCT
T (SEQ ID NO: 31). A continuación, los inventores reemplazaron la secuencia de galK por un oligonucleótido
bicatenario sintético gD_aa5_39_f_r

TTGTCGTCATAGTGGGCCTCCATGGGGTCCGCGGCAAATATGCCTTGGCGCACATCCAGGCGGGCCTACC
GGACCCGTTCCAGCCCCCAGCCTCCCGAT (SEQ ID NO: 32).

D) R-VG805: inserción de scFv-EGFR en lugar de los AA 6-38 de gD de R-VG803.

El material inicial para R-VG805 fue el genoma de R-VG803 BAC. Para generar la delección de los AA 6-38 en
gD, el casete galK flanqueado por los brazos de homología a gD se amplificó con los cebadores gD5_galK_f
TTGTCGTCATAGTGGGCCTCCATGGGGTCCGCGGCAAATATGCCTTGGCGCCTGTTGACAATTAATCATCG
GCA (SEQ ID NO: 33) y gD39_galK_r

ATCGGGAGGCTGGGGGGCTGGAACGGGTCCGGTAGGCCCCGCTGGATGTGTCAGCACTGTCCTGCTCCT
T (SEQ ID NO: 34). A continuación, los inventores reemplazaron la secuencia de galK en BAC VG804 por un
casete scFv-EGFR amplificado a partir de pTNHaa-αEGFR (proporcionado amablemente por el Dr. Steve
Russel, Mayo Clinic, Rochester) por medio de los cebadores BAC LM611_f
TTGTCGTCATAGTGGGCCTCCATGGGGTCCGCGGCAAATATGCCTTGGCGGCCGAGGTGCAACTGCAGCA
GTC (SEQ ID NO: 35) y gD39_11SAG_EGFR_r
ATCGGGAGGCTGGGGGGCTGGAACGGGTCCGGTAGGCCCCGCTGGATGTGACTTGCCTAGATGAAGCA
CTTCCTGCGGAAGATTTGATCTCGAGTTCTGTCCCCG (SEQ ID NO: 36). El ligador en el sentido 3' tiene la
secuencia SSAGSASSAS (SEQ ID NO: 37); no hay presente ningún ligador en el sentido 5'. El ligador entre
V_H y V_L es GGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 38).

E) R-VG807: inserción de scFv-HER2 en lugar de los AA 6-38 de gD de R-VG803.

El material inicial para R-VG807 fue el genoma de R-VG803 BAC. Para generar la delección de los AA 6-38 en
gD, el casete galK flanqueado por los brazos de homología a gD se amplificó con los cebadores gD5_galK_f
TTGTCGTCATAGTGGGCCTCCATGGGGTCCGCGGCAAATATGCCTTGGCGCCTGTTGACAATTAATCATCG
GCA (SEQ ID NO: 39) y gD39_galK_r

ATCGGGAGGCTGGGGGGCTGGAACGGGTCCGGTAGGCCCCGCTGGATGTGTCAGCACTGTCCTGCTCCT
T (SEQ ID NO: 40). A continuación, los inventores reemplazaron la secuencia de galK por el casete scFv HER2
amplificado a partir de pSG-ScFvHER2 por medio de los cebadores gD5_scFvHER2_f
TTGTCGTCATAGTGGGCCTCCATGGGGTCCGCGGCAAATATGCCTTGGCGTCCGATATCCAGATGACCCA
GTCCC (SEQ ID NO: 41) y gD39_11SAG_HER2_r
ATCGGGAGGCTGGGGGGCTGGAACGGGTCCGGTAGGCCCCGCTGGATGTGACTTGCCTAGATGAAGCA
CTTCCTGCGGAAGAGGAGACGGGTGACTAGTGTTCCTTGACC (SEQ ID NO: 42). El ligador en el sentido 3'
tiene la secuencia SSAGSASSAS (SEQ ID NO: 43); no hay presente ningún ligador en el sentido 5'. El ligador
entre V_H y V_L es SDMPMADPNRFRGKNLVFHS (SEQ ID NO: 44).

Para reconstituir los virus recombinantes, se transfectaron 500 ng de ADN de BAC recombinante en células
SK-OV-3 por medio de Lipofectamine 2000 (Life Technologies). El crecimiento del virus se monitorizó mediante
fluorescencia roja. La estructura de los recombinantes se verificó mediante la secuenciación de la gH y también del
ORF de la gD para R-VG809, R-VG805 y R-VG807. Se generaron reservas de virus y se titularon en células
SK-OV-3 o en células J-HER2.

Ejemplo 2: verificación de la inserción de scFv-HER2 en gH de R-VG803.

Se infectaron células Vero con R-VG803 (3 UFP/célula), y con R-LM5 a modo de comparación, y se recogieron
72 horas después de la infección. Los lisados celulares se sometieron a electroforesis en gel de poliacrilamida, se
transfirieron a membranas de PVDF y se sometieron a inmunotransferencia con anticuerpo policlonal contra gH. La
figura 2 muestra que scFv-HER2-gH quimérico de R-VG803 migró con una movilidad electroforética más lenta que
wt-gH de R-LM5 y una M_r aparente de 130 K.

Ejemplo 3: ensayo de infección con R-VG803, que porta scFv-HER2 en gH, de células J-HER2, que expresan HER2 como único receptor.

Previamente se ha demostrado que la inserción de scFv-HER2 en gD otorga a los virus recombinantes R-LM113 y R-LM249 la capacidad de entrar en células a través del receptor HER2. Para proporcionar evidencias de que la inserción de scFv-HER2 en gH otorga a R-VG803 la capacidad de entrar en células a través del receptor HER2, los inventores utilizaron células que expresan HER2 como único receptor. Las células J parentales no expresan ningún receptor para gD, por tanto no pueden activar a gD, y no se infectan por wt-HSV. Las células J-HER2 expresan de manera transgénica HER2 como único receptor. Como controles, los inventores incluyeron células J-Nectina y J-HVEM, que expresan de manera transgénica Nectina 1 o HVEM como receptores y se infectan por wt-HSV, y células humanas y animales que expresan los ortólogos HVEM/Nectina 1 humanos o animales, concretamente células HaCaT queratinocíticas, células SK-N-SH neuronales, células HeLa de cáncer, MDA-MB-231, células HFF14 fibroblásticas humanas, células BHK de hámster, así como células SK-OV-3 de cáncer de ovarios que expresan HER2 más HVEM/Nectina 1. Tal como se muestra en la figura 3 A, R-VG803 infectó las células J-HER2. La infección de J-Nectina 1, J-HVEM y de células humanas y animales con R-VG803 (figura 3 A) no fue sorprendente, ya que R-VG803 codifica wt-gD. Además, los inventores notificaron que R-VG803 puede realizar una extensión célula a célula en células J-HER2. Las células se infectaron a 0,01 UFP/célula y se monitorizaron diariamente. En el día 1, la infección involucró a células individuales. En los siguientes días, la infección involucró a grupos de células, progresivamente más grandes en cuanto a tamaño (figura 3 B).

Para demostrar que la entrada de R-VG803 en células J-HER2 se produce a través de HER2 como receptor celular y para investigar el papel de gD en la ruta de entrada de R-VG803 en células SK-OV-3, los inventores confirmaron, en primer lugar, que la infección se produce a través del receptor HER2. Las células J-HER2 se infectaron con R-VG803 en presencia de trastuzumab, el MAb contra HER2 del que se derivó scFv-HER2. El trastuzumab bloqueó la infección de células J-HER2 con R-VG803, tal como se detectó mediante microscopía de fluorescencia (figura 4 A) y se cuantificó mediante clasificación celular activada por fluorescencia (FACS) (figura 4 B). Esto valida la conclusión de que R-VG803 redirigido utiliza HER2 como portal de entrada en células J-HER2. El hallazgo de que R-VG803 puede utilizar a HER2 como receptor proporciona evidencias de que se puede modificar el tropismo de HSV mediante modificación por ingeniería de un ligando heterólogo en gH. Además, la infección del HSV redirigido por gH, R-VG803, en células J-HER2 puede tener lugar en células que carecen de un receptor de gD, es decir en condiciones en las que gD está presente físicamente en los viriones R-VG803, pero se elimina funcionalmente puesto que no se puede activar por su receptores relacionados y no puede transmitir la activación a gH. Los inventores concluyen que la infección de R-VG803 no necesita una gD con sitios de unión al receptor funcionales. A continuación, los inventores analizaron la utilización de receptores en células SK-OV-3 que expresan ambos conjuntos de receptores, HER2 y nectina1/HVEM. La cuestión fue si se utilizaba preferentemente un receptor con respecto al otro, o si se utilizaba alternativamente cada uno. Se infectaron células SK-OV-3 con R-VG803, en presencia de MAb contra HER2 (trastuzumab), MAb contra HD1 o ambos. Los controles fueron R-LM5, que porta wt-gD y las otras modificaciones genómicas presentes en R-VG803, R-LM249 y R-LM113, concretamente la inserción de las secuencias de BAC y la inserción del marcador GFP. R-LM249 es un HSV redirigido a HER2 por medio de la inserción de scFv-HER2 en la delección de los AA 61-218 de gD. R-LM113 es un HSV redirigido a HER2 por medio de la inserción de scFv-HER2 en la delección de los AA 6-38 de la gD madura. R-VG809 también se incluyó (véase el ejemplo 4). La figura 4 C muestra que el MAb contra HER2 o HD1 no ejerció casi ninguna inhibición sobre R-VG803 cuando se administró individualmente, pero anuló prácticamente la infección cuando se administraron juntos. Por tanto, R-VG803 puede utilizar alternativamente HER2 o Nectina1/HVEM para infectar células SK-OV-3. La utilización de uno o los otros portales de entrada por R-VG803 depende del espectro de receptores visualizado por las células. Tal como se esperaba, R-LM249 y R-LM113 redirigidos completamente muestran una ruta de entrada dependiente de HER2. La infección con R-VG809 también se inhibe por el trastuzumab, ya sea solo o en combinación con MAb contra HD1, lo que conduce a la conclusión de que este recombinante se redirige a HER2 por medio de gH y se desdirige de nectina1/HVEM como consecuencia de la delección de los AA 6-38 en la gD madura.

Ejemplo 4: modificación por ingeniería genética del recombinante R-VG809 redirigido a HER2 mediante la inserción de scFv-HER2 en gH y desdirigido de los receptores de gD mediante la delección de la secuencia de gD que codifica los AA 6-38.

Los inventores modificaron por ingeniería un recombinante que portaba scFv-HER2 en gH y la delección de porciones de sitios de unión de receptores de gD. Los dos receptores principales de gD son Nectina 1 y HVEM. El sitio de unión de HVEM en gD se asigna a los AA 1-32. El sitio de unión de Nectina 1 en gD madura es más amplio e incluye el núcleo plegado de Ig y las porciones ubicadas entre los AA 35-38, 199-201, 214-217, 219-221. Los inventores delecionaron de la gD madura de R-VG803 la región de los AA 6-38, es decir, la misma región que se delecionó previamente de R-LM113, un HSV redirigido a HER2 mediante la inserción de scFv-HER2 entre los AA 5 y 39 de la gD madura. La delección retira todo el sitio de unión de HVEM y algunos residuos implicados en la interacción con Nectina 1, que incluyen el núcleo plegado de Ig y las porciones ubicadas entre los AA 35-38, 199-201, 214-217, 219-221. A pesar de que se delecionaron algunos AA implicados en la interacción con Nectina 1, se demostró que R-LM113 se desdirigió de Nectina 1 y de HVEM, el recombinante se desdirige tanto de HVEM como de Nectina 1. El virus recombinante denominado R-VG809 no pudo infectar ni células J-HVEM, ni tampoco células J-Nectina 1, así

como células HaCaT, SK-N-SH, MDA-MB-231, HeLa, HFF14 humanas, células BHK de hámster. Mantuvo la capacidad de infectar de manera eficiente células J-HER2 y SK-OV-3 (figura 5). El tropismo de R-VG809 es sorprendentemente diferente del de R-VG803 (compárese la figura 5 con la figura 3A). Los inventores concluyen que la infección con R-VG809 a través de la gH redirigida a HER2 no requiere los sitios de unión para HVEM y para Nectina 1 en gD y, en consecuencia, la activación de gD mediada por receptores. En resumen, R-VG809 muestra un tropismo completamente redirigido, redirigido al receptor HER2 a través de gH y desdirigido de los receptores de gD. Su ruta de entrada en células SK-OV-3 se muestra en la figura 4. Se puede observar que, a diferencia de la entrada de R-VG803, la entrada de R-VG809 en células SK-OV-3 se inhibió por trastuzumab solo, lo que indica que es completamente a través del receptor HER2.

Ejemplo 5: modificación por ingeniería genética del recombinante R-VG805 redirigido a HER2 mediante la inserción de scFv-HER2 en gH y redirigido a EGFR mediante la inserción de scFv-EGFR en lugar de la región de los AA 6-38 de la gD madura. Redirección doble a dos receptores de elección diferentes más desdirección de los receptores de gD.

Los inventores modificaron por ingeniería un recombinante de HSV redirigido simultáneamente a HER2, mediante la inserción de scFv-HER2 en gH, y a EGFR, mediante la inserción de scFv-EGFR en lugar de la región de los AA 6-38 de la gD madura. De forma breve, R-VG803 se modificó para reemplazar la región endógena de los AA 6-38 de la gD madura por el scFv contra EGFR, denominado en el presente documento scFv-EGFR. De hecho, el virus recombinante denominado R-VG805 se redirigió a HER2 por medio de gH, se desdirigió de Nectina 1 y HVEM, debido a la delección de la región de los AA 6-38 en la gD madura, y se redirigió a EGFR debido a la inserción de scFv contra EGFR en lugar de los AA 6-38 de la gD madura (figura 6). Los inventores señalan que la inserción de scFv-EGFR redirige R-VG805 también a EGFR-vIII, una variante de EGFR que porta una delección (figura 6). Esta variante de EGFR se expresa altamente en glioblastoma humano. Estos resultados muestran que es posible modificar por ingeniería un recombinante de HSV con una redirección doble a dos receptores de elección diferentes.

Ejemplo 6: modificación por ingeniería genética del recombinante R-VG807 doblemente redirigido a HER2 mediante la inserción de scFv-HER2 en gH y mediante la inserción de scFv-HER2 en lugar de la región de los AA 6-38 de la gD madura. Redirección doble a un mismo receptor de elección más desdirección de los receptores de gD.

Los inventores modificaron por ingeniería un recombinante de HSV redirigido a HER2 tanto mediante la inserción de scFv-HER2 en gH como mediante la inserción de scFv-HER2 en lugar de la región de los AA 6-38 de la gD madura. De forma breve, R-VG803 se modificó para reemplazar la región endógena de los AA 6-38 de la gD madura por scFv-HER2. El virus recombinante denominado R-VG807 está doblemente redirigido a HER2 y desdirigido de Nectina 1 y HVEM, debido a la delección de la región de los AA 6-38 en la gD madura.

Ejemplo 7: estudio sobre el sitio de inserción para scFv-HER2 en gH. Delección de la secuencia que codifica los AA 24-47.

Los inventores investigaron si la inserción de scFv-HER2 se puede acoplar con la delección de la porción N-terminal de gH. La porción delecionada fue la secuencia que codifica los AA 24-47 de gH. Esta secuencia se reemplazó por scFv-HER2. El recombinante resultante se denominó R-VG811. La figura 7 muestra que R-VG811 infectó células J-HER2. Por tanto, la inserción de scFv-HER2 se puede acoplar con una delección en gH, como mínimo, hasta el AA 48. Esto indica que el sitio de inserción puede ser C-terminal con respecto al AA 18 y N-terminal respecto a cualquier AA entre el AA 19 y el AA 48. Atanasiu et al., (MBio. 26 de febrero de 2013;4(2). pii: e00046-13. doi: 10.1128/mBio.00046-13) propusieron que "gH Δ 48/gL tiene una estructura intermedia en la ruta que conduce a una activación reguladora completa, y sugirieron que una etapa clave en la ruta de fusión es la conversión de gH/gL en un estado activado por la gD unida al receptor; esta gH/gL activada se parece a gH Δ 48/gL". Basándose en los resultados de Atanasiu, obtenidos en el ensayo de fusión célula-célula y no en la entrada de virión-célula, un experto en la materia podría plantear la hipótesis de que la delección de los AA 24-47 de la secuencia en gH, y su reemplazo por scFv-HER2, podría conducir a un virus más propenso a fusionarse con la membrana celular y, por tanto, capaz de una infección potenciada en relación con R-VG803. Los inventores transfectaron ADN-BAC de R-VG811 y, a modo de comparación, de R-VG803 en células SK-OV-3 y J-HER2, y determinaron el grado de infección/formación de virus a través de la cantidad de células que expresan el marcador mCherry. Las figuras 7 B-D comparan la cantidad de células infectadas obtenidas tras la transfección de ADN de R-VG811 o de R-VG803 en células J-HER2 o SK-OV-3. La cuantificación del experimento se muestra en las figuras 7 C-D. En general, la eficiencia de producción de virus infecciosos fue inferior con R-VG811 que con R-VG803, lo que indica que la delección de los AA en el extremo N-terminal de gH, hasta el AA 48, reduce la capacidad infecciosa de los recombinantes. Por tanto, los resultados de Atanasiu et al no fueron predictivos del comportamiento de un recombinante de HSV que porta la inserción de scFv-HER2 en lugar de las secuencias de gH endógenas con los AA 24-47 delecionados.

Ejemplo 8: grado de replicación de los recombinantes.

Los inventores compararon el grado de replicación de R-VG803 y R-VG809 con el de dos recombinantes, R-LM113 y R-LM249, que se redirigen a HER2 a través de la inserción de scFv-HER2 en gD. La replicación se midió en células J-HER2, que expresan HER2 como receptor, y en células SK-OV-3, que expresan HER2 y Nectina1/HVEM

como receptores. Las células se infectaron a 0,1 UFP/célula o 0,01 UFP/ml, y se recogieron 3, 24, 48 horas después de la infección. Los resultados en la figura 8 muestran que R-VG803 y R-VG809 se replicaron tan eficientemente como R-LM113 o R-LM249, o incluso más eficientemente, en células SK-OV-3.

5 Ejemplo 9: capacidad de R-VG803 y R-VG809 para destruir células cancerosas positivas para HER2.

10 Como una medida de la capacidad de R-VG803 o R-VG809 para destruir células, los inventores realizaron una prueba de citotoxicidad, por medio de AlamarBlue, para determinar células SK-OV-3 positivas para HER2. A modo de comparación, se incluyeron R-LM5 de HSV wt y R-LM113 y R-LM249 redirigidos. La figura 9 muestra que las citotoxicidades provocadas por R-VG803 y por R-VG809 fueron muy similares a las provocadas por R-LM113 o R-LM249.

LISTA DE SECUENCIAS

15 <110> Alma Mater Studiorum Universita' di Bologna

<120> VIRUS DEL HERPES REDIRIGIDO CON UNA FUSIÓN DE GLICOPROTEÍNA H

20 <130> 854-7 PCT

<150> Patente EP15425012.0

<151> 11/02/2015

25 <160> 44

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 838

30 <212> PRT

<213> HSV-1

<400> 1

ES 2 874 584 T3

Met Gly Asn Gly Leu Trp Phe Val Gly Val Ile Ile Leu Gly Val Ala
1 5 10 15

Trp Gly Gln Val His Asp Trp Thr Glu Gln Thr Asp Pro Trp Phe Leu
20 25 30

Asp Gly Leu Gly Met Asp Arg Met Tyr Trp Arg Asp Thr Asn Thr Gly
35 40 45

Arg Leu Trp Leu Pro Asn Thr Pro Asp Pro Gln Lys Pro Pro Arg Gly
50 55 60

Phe Leu Ala Pro Pro Asp Glu Leu Asn Leu Thr Thr Ala Ser Leu Pro
65 70 75 80

Leu Leu Arg Trp Tyr Glu Glu Arg Phe Cys Phe Val Leu Val Thr Thr
85 90 95

Ala Glu Phe Pro Arg Asp Pro Gly Gln Leu Leu Tyr Ile Pro Lys Thr
100 105 110

Tyr Leu Leu Gly Arg Pro Pro Asn Ala Ser Leu Pro Ala Pro Thr Thr
115 120 125

Val Glu Pro Thr Ala Gln Pro Pro Pro Ser Val Ala Pro Leu Lys Gly
130 135 140

Leu Leu Tyr Asn Pro Val Ala Ser Val Leu Leu Arg Ser Arg Ala Trp
145 150 155 160

Val Thr Phe Ser Ala Val Pro Asp Pro Glu Ala Leu Thr Phe Pro Arg

ES 2 874 584 T3

165										170					175				
Gly	Asp	Asn	Val	Ala	Thr	Ala	Ser	His	Pro	Ser	Gly	Pro	Arg	Asp	Thr				
			180					185					190						
Pro	Pro	Pro	Arg	Pro	Pro	Val	Gly	Ala	Arg	Arg	His	Pro	Thr	Thr	Glu				
		195					200					205							
Leu	Asp	Ile	Thr	His	Leu	His	Asn	Ala	Ser	Thr	Thr	Trp	Leu	Ala	Thr				
	210					215					220								
Arg	Gly	Leu	Leu	Arg	Ser	Pro	Gly	Arg	Tyr	Val	Tyr	Phe	Ser	Pro	Ser				
225					230					235					240				
Ala	Ser	Thr	Trp	Pro	Val	Gly	Ile	Trp	Thr	Thr	Gly	Glu	Leu	Val	Leu				
				245					250					255					
Gly	Cys	Asp	Ala	Ala	Leu	Val	Arg	Ala	Arg	Tyr	Gly	Arg	Glu	Phe	Met				
			260					265					270						
Gly	Leu	Val	Ile	Ser	Met	His	Asp	Ser	Pro	Pro	Val	Glu	Val	Met	Val				
	275						280					285							
Val	Pro	Ala	Gly	Gln	Thr	Leu	Asp	Arg	Val	Gly	Asp	Pro	Ala	Asp	Glu				
	290					295					300								
Asn	Pro	Pro	Gly	Ala	Leu	Pro	Gly	Pro	Pro	Gly	Gly	Pro	Arg	Tyr	Arg				
305					310					315					320				
Val	Phe	Val	Leu	Gly	Ser	Leu	Thr	Arg	Ala	Asp	Asn	Gly	Ser	Ala	Leu				
				325					330					335					
Asp	Ala	Leu	Arg	Arg	Val	Gly	Gly	Tyr	Pro	Glu	Glu	Gly	Thr	Asn	Tyr				
			340					345					350						
Ala	Gln	Phe	Leu	Ser	Arg	Ala	Tyr	Ala	Glu	Phe	Phe	Ser	Gly	Asp	Ala				
		355					360					365							
Gly	Ala	Glu	Gln	Gly	Pro	Arg	Pro	Pro	Leu	Phe	Trp	Arg	Leu	Thr	Gly				
	370					375					380								
Leu	Leu	Ala	Thr	Ser	Gly	Phe	Ala	Phe	Val	Asn	Ala	Ala	His	Ala	Asn				
385					390					395					400				
Gly	Ala	Val	Cys	Leu	Ser	Asp	Leu	Leu	Gly	Phe	Leu	Ala	His	Ser	Arg				
				405					410					415					

ES 2 874 584 T3

Ala Leu Ala Gly Leu Ala Ala Arg Gly Ala Ala Gly Cys Ala Ala Asp
 420 425 430
 Ser Val Phe Phe Asn Val Ser Val Leu Asp Pro Thr Ala Arg Leu Gln
 435 440 445
 Leu Glu Ala Arg Leu Gln His Leu Val Ala Glu Ile Leu Glu Arg Glu
 450 455 460
 Gln Ser Leu Ala Leu His Ala Leu Gly Tyr Gln Leu Ala Phe Val Leu
 465 470 475 480
 Asp Ser Pro Ser Ala Tyr Asp Ala Val Ala Pro Ser Ala Ala His Leu
 485 490 495
 Ile Asp Ala Leu Tyr Ala Glu Phe Leu Gly Gly Arg Val Leu Thr Thr
 500 505 510
 Pro Val Val His Arg Ala Leu Phe Tyr Ala Ser Ala Val Leu Arg Gln
 515 520 525
 Pro Phe Leu Ala Gly Val Pro Ser Ala Val Gln Arg Glu Arg Ala Arg
 530 535 540
 Arg Ser Leu Leu Ile Ala Ser Ala Leu Cys Thr Ser Asp Val Ala Ala
 545 550 555 560
 Ala Thr Asn Ala Asp Leu Arg Thr Ala Leu Ala Arg Ala Asp His Gln
 565 570 575
 Lys Thr Leu Phe Trp Leu Pro Asp His Phe Ser Pro Cys Ala Ala Ser
 580 585 590
 Leu Arg Phe Asp Leu Asp Glu Ser Val Phe Ile Leu Asp Ala Leu Ala
 595 600 605
 Gln Ala Thr Arg Ser Glu Thr Pro Val Glu Val Leu Ala Gln Gln Thr
 610 615 620
 His Gly Leu Ala Ser Thr Leu Thr Arg Trp Ala His Tyr Asn Ala Leu
 625 630 635 640
 Ile Arg Ala Phe Val Pro Glu Ala Ser His Arg Cys Gly Gly Gln Ser
 645 650 655
 Ala Asn Val Glu Pro Arg Ile Leu Val Pro Ile Thr His Asn Ala Ser
 660 665 670

ES 2 874 584 T3

Tyr Val Val Thr His Ser Pro Leu Pro Arg Gly Ile Gly Tyr Lys Leu
 675 680 685
 Thr Gly Val Asp Val Arg Arg Pro Leu Phe Leu Thr Tyr Leu Thr Ala
 690 695 700
 Thr Cys Glu Gly Ser Thr Arg Asp Ile Glu Ser Lys Arg Leu Val Arg
 705 710 715 720
 Thr Gln Asn Gln Arg Asp Leu Gly Leu Val Gly Ala Val Phe Met Arg
 725 730 735
 Tyr Thr Pro Ala Gly Glu Val Met Ser Val Leu Leu Val Asp Thr Asp
 740 745 750
 Asn Thr Gln Gln Gln Ile Ala Ala Gly Pro Thr Glu Gly Ala Pro Ser
 755 760 765
 Val Phe Ser Ser Asp Val Pro Ser Thr Ala Leu Leu Leu Phe Pro Asn
 770 775 780
 Gly Thr Val Ile His Leu Leu Ala Phe Asp Thr Gln Pro Val Ala Ala
 785 790 795 800
 Ile Ala Pro Gly Phe Leu Ala Ala Ser Ala Leu Gly Val Val Met Ile
 805 810 815
 Thr Ala Ala Leu Ala Gly Ile Leu Lys Val Leu Arg Thr Ser Val Pro
 820 825 830
 Phe Phe Trp Arg Arg Glu
 835

<210> 2
 <211> 1105
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> gH como en la construcción R-VG803, R-VG805 y R-VG809

<400> 2

Met Gly Asn Gly Leu Trp Phe Val Gly Val Ile Ile Leu Gly Val Ala
 1 5 10 15
 Trp Gly Gln Val His Asp Trp His Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Ser
 20 25 30

ES 2 874 584 T3

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 35 40 45
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala
 50 55 60
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 65 70 75 80
 Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 85 90 95
 Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 100 105 110
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro
 115 120 125
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ser Asp Met Pro Met
 130 135 140
 Ala Asp Pro Asn Arg Phe Arg Gly Lys Asn Leu Val Phe His Ser Glu
 145 150 155 160
 Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser
 165 170 175
 Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr Tyr
 180 185 190
 Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala
 195 200 205
 Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 210 215 220
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu
 225 230 235 240
 Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser
 245 250 255
 Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 260 265 270
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Ser Gly Gly
 275 280 285

ES 2 874 584 T3

Ser Gly Thr Glu Gln Thr Asp Pro Trp Phe Leu Asp Gly Leu Gly Met
 290 295 300
 Asp Arg Met Tyr Trp Arg Asp Thr Asn Thr Gly Arg Leu Trp Leu Pro
 305 310 315 320
 Asn Thr Pro Asp Pro Gln Lys Pro Pro Arg Gly Phe Leu Ala Pro Pro
 325 330 335
 Asp Glu Leu Asn Leu Thr Thr Ala Ser Leu Pro Leu Leu Arg Trp Tyr
 340 345 350
 Glu Glu Arg Phe Cys Phe Val Leu Val Thr Thr Ala Glu Phe Pro Arg
 355 360 365
 Asp Pro Gly Gln Leu Leu Tyr Ile Pro Lys Thr Tyr Leu Leu Gly Arg
 370 375 380
 Pro Pro Asn Ala Ser Leu Pro Ala Pro Thr Thr Val Glu Pro Thr Ala
 385 390 395 400
 Gln Pro Pro Pro Ser Val Ala Pro Leu Lys Gly Leu Leu Tyr Asn Pro
 405 410 415
 Val Ala Ser Val Leu Leu Arg Ser Arg Ala Trp Val Thr Phe Ser Ala
 420 425 430
 Val Pro Asp Pro Glu Ala Leu Thr Phe Pro Arg Gly Asp Asn Val Ala
 435 440 445
 Thr Ala Ser His Pro Ser Gly Pro Arg Asp Thr Pro Pro Pro Arg Pro
 450 455 460
 Pro Val Gly Ala Arg Arg His Pro Thr Thr Glu Leu Asp Ile Thr His
 465 470 475 480
 Leu His Asn Ala Ser Thr Thr Trp Leu Ala Thr Arg Gly Leu Leu Arg
 485 490 495
 Ser Pro Gly Arg Tyr Val Tyr Phe Ser Pro Ser Ala Ser Thr Trp Pro
 500 505 510
 Val Gly Ile Trp Thr Thr Gly Glu Leu Val Leu Gly Cys Asp Ala Ala
 515 520 525
 Leu Val Arg Ala Arg Tyr Gly Arg Glu Phe Met Gly Leu Val Ile Ser
 530 535 540

ES 2 874 584 T3

Met	His	Asp	Ser	Pro	Pro	Val	Glu	Val	Met	Val	Val	Pro	Ala	Gly	Gln	545	550	555	560
Thr	Leu	Asp	Arg	Val	Gly	Asp	Pro	Ala	Asp	Glu	Asn	Pro	Pro	Gly	Ala	565	570	575	
Leu	Pro	Gly	Pro	Pro	Gly	Gly	Pro	Arg	Tyr	Arg	Val	Phe	Val	Leu	Gly	580	585	590	
Ser	Leu	Thr	Arg	Ala	Asp	Asn	Gly	Ser	Ala	Leu	Asp	Ala	Leu	Arg	Arg	595	600	605	
Val	Gly	Gly	Tyr	Pro	Glu	Glu	Gly	Thr	Asn	Tyr	Ala	Gln	Phe	Leu	Ser	610	615	620	
Arg	Ala	Tyr	Ala	Glu	Phe	Phe	Ser	Gly	Asp	Ala	Gly	Ala	Glu	Gln	Gly	625	630	635	640
Pro	Arg	Pro	Pro	Leu	Phe	Trp	Arg	Leu	Thr	Gly	Leu	Leu	Ala	Thr	Ser	645	650	655	
Gly	Phe	Ala	Phe	Val	Asn	Ala	Ala	His	Ala	Asn	Gly	Ala	Val	Cys	Leu	660	665	670	
Ser	Asp	Leu	Leu	Gly	Phe	Leu	Ala	His	Ser	Arg	Ala	Leu	Ala	Gly	Leu	675	680	685	
Ala	Ala	Arg	Gly	Ala	Ala	Gly	Cys	Ala	Ala	Asp	Ser	Val	Phe	Phe	Asn	690	695	700	
Val	Ser	Val	Leu	Asp	Pro	Thr	Ala	Arg	Leu	Gln	Leu	Glu	Ala	Arg	Leu	705	710	715	720
Gln	His	Leu	Val	Ala	Glu	Ile	Leu	Glu	Arg	Glu	Gln	Ser	Leu	Ala	Leu	725	730	735	
His	Ala	Leu	Gly	Tyr	Gln	Leu	Ala	Phe	Val	Leu	Asp	Ser	Pro	Ser	Ala	740	745	750	
Tyr	Asp	Ala	Val	Ala	Pro	Ser	Ala	Ala	His	Leu	Ile	Asp	Ala	Leu	Tyr	755	760	765	
Ala	Glu	Phe	Leu	Gly	Gly	Arg	Val	Leu	Thr	Thr	Pro	Val	Val	His	Arg	770	775	780	
Ala	Leu	Phe	Tyr	Ala	Ser	Ala	Val	Leu	Arg	Gln	Pro	Phe	Leu	Ala	Gly				

ES 2 874 584 T3

785		790		795		800									
Val	Pro	Ser	Ala	Val	Gln	Arg	Glu	Arg	Ala	Arg	Arg	Ser	Leu	Leu	Ile
				805					810					815	
Ala	Ser	Ala	Leu	Cys	Thr	Ser	Asp	Val	Ala	Ala	Ala	Thr	Asn	Ala	Asp
			820					825					830		
Leu	Arg	Thr	Ala	Leu	Ala	Arg	Ala	Asp	His	Gln	Lys	Thr	Leu	Phe	Trp
		835					840					845			
Leu	Pro	Asp	His	Phe	Ser	Pro	Cys	Ala	Ala	Ser	Leu	Arg	Phe	Asp	Leu
	850						855					860			
Asp	Glu	Ser	Val	Phe	Ile	Leu	Asp	Ala	Leu	Ala	Gln	Ala	Thr	Arg	Ser
865					870					875					880
Glu	Thr	Pro	Val	Glu	Val	Leu	Ala	Gln	Gln	Thr	His	Gly	Leu	Ala	Ser
				885					890					895	
Thr	Leu	Thr	Arg	Trp	Ala	His	Tyr	Asn	Ala	Leu	Ile	Arg	Ala	Phe	Val
			900					905					910		
Pro	Glu	Ala	Ser	His	Arg	Cys	Gly	Gly	Gln	Ser	Ala	Asn	Val	Glu	Pro
		915					920					925			
Arg	Ile	Leu	Val	Pro	Ile	Thr	His	Asn	Ala	Ser	Tyr	Val	Val	Thr	His
	930					935					940				
Ser	Pro	Leu	Pro	Arg	Gly	Ile	Gly	Tyr	Lys	Leu	Thr	Gly	Val	Asp	Val
945					950					955					960
Arg	Arg	Pro	Leu	Phe	Leu	Thr	Tyr	Leu	Thr	Ala	Thr	Cys	Glu	Gly	Ser
				965					970					975	
Thr	Arg	Asp	Ile	Glu	Ser	Lys	Arg	Leu	Val	Arg	Thr	Gln	Asn	Gln	Arg
			980					985					990		
Asp	Leu	Gly	Leu	Val	Gly	Ala	Val	Phe	Met	Arg	Tyr	Thr	Pro	Ala	Gly
		995					1000					1005			
Glu	Val	Met	Ser	Val	Leu	Leu	Val	Asp	Thr	Asp	Asn	Thr	Gln	Gln	
	1010					1015					1020				
Gln	Ile	Ala	Ala	Gly	Pro	Thr	Glu	Gly	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ser	
	1025					1030					1035				

ES 2 874 584 T3

Ser Asp Val Pro Ser Thr Ala Leu Leu Leu Phe Pro Asn Gly Thr
1040 1045 1050

Val Ile His Leu Leu Ala Phe Asp Thr Gln Pro Val Ala Ala Ile
1055 1060 1065

Ala Pro Gly Phe Leu Ala Ala Ser Ala Leu Gly Val Val Met Ile
1070 1075 1080

Thr Ala Ala Leu Ala Gly Ile Leu Lys Val Leu Arg Thr Ser Val
1085 1090 1095

Pro Phe Phe Trp Arg Arg Glu
1100 1105

<210> 3

<211> 1081

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> gH como en la construcción R-VG811

10

<400> 3

Met Gly Asn Gly Leu Trp Phe Val Gly Val Ile Ile Leu Gly Val Ala
1 5 10 15

Trp Gly Gln Val His Asp Trp His Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Ser
20 25 30

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
35 40 45

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala
50 55 60

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
65 70 75 80

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
85 90 95

Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
100 105 110

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro
115 120 125

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ser Asp Met Pro Met

ES 2 874 584 T3

130		135		140
Ala Asp Pro Asn Arg Phe Arg Gly Lys Asn Leu Val Phe His Ser Glu				
145		150		155
Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser				
		165		170
				175
Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr Tyr				
		180		185
				190
Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala				
		195		200
				205
Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val Lys				
		210		215
				220
Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu				
		225		230
				235
Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser				
		245		250
				255
Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly				
		260		265
				270
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Ser Gly Gly				
		275		280
				285
Ser Gly Gly Arg Leu Trp Leu Pro Asn Thr Pro Asp Pro Gln Lys Pro				
		290		295
				300
Pro Arg Gly Phe Leu Ala Pro Pro Asp Glu Leu Asn Leu Thr Thr Ala				
		305		310
				315
Ser Leu Pro Leu Leu Arg Trp Tyr Glu Glu Arg Phe Cys Phe Val Leu				
		325		330
				335
Val Thr Thr Ala Glu Phe Pro Arg Asp Pro Gly Gln Leu Leu Tyr Ile				
		340		345
				350
Pro Lys Thr Tyr Leu Leu Gly Arg Pro Pro Asn Ala Ser Leu Pro Ala				
		355		360
				365
Pro Thr Thr Val Glu Pro Thr Ala Gln Pro Pro Pro Ser Val Ala Pro				
		370		375
				380

ES 2 874 584 T3

Leu Lys Gly Leu Leu Tyr Asn Pro Val Ala Ser Val Leu Leu Arg Ser
 385 390 395 400
 Arg Ala Trp Val Thr Phe Ser Ala Val Pro Asp Pro Glu Ala Leu Thr
 405 410 415
 Phe Pro Arg Gly Asp Asn Val Ala Thr Ala Ser His Pro Ser Gly Pro
 420 425 430
 Arg Asp Thr Pro Pro Pro Arg Pro Pro Val Gly Ala Arg Arg His Pro
 435 440 445
 Thr Thr Glu Leu Asp Ile Thr His Leu His Asn Ala Ser Thr Thr Trp
 450 455 460
 Leu Ala Thr Arg Gly Leu Leu Arg Ser Pro Gly Arg Tyr Val Tyr Phe
 465 470 475 480
 Ser Pro Ser Ala Ser Thr Trp Pro Val Gly Ile Trp Thr Thr Gly Glu
 485 490 495
 Leu Val Leu Gly Cys Asp Ala Ala Leu Val Arg Ala Arg Tyr Gly Arg
 500 505 510
 Glu Phe Met Gly Leu Val Ile Ser Met His Asp Ser Pro Pro Val Glu
 515 520 525
 Val Met Val Val Pro Ala Gly Gln Thr Leu Asp Arg Val Gly Asp Pro
 530 535 540
 Ala Asp Glu Asn Pro Pro Gly Ala Leu Pro Gly Pro Pro Gly Gly Pro
 545 550 555 560
 Arg Tyr Arg Val Phe Val Leu Gly Ser Leu Thr Arg Ala Asp Asn Gly
 565 570 575
 Ser Ala Leu Asp Ala Leu Arg Arg Val Gly Gly Tyr Pro Glu Glu Gly
 580 585 590
 Thr Asn Tyr Ala Gln Phe Leu Ser Arg Ala Tyr Ala Glu Phe Phe Ser
 595 600 605
 Gly Asp Ala Gly Ala Glu Gln Gly Pro Arg Pro Pro Leu Phe Trp Arg
 610 615 620
 Leu Thr Gly Leu Leu Ala Thr Ser Gly Phe Ala Phe Val Asn Ala Ala
 625 630 635 640

ES 2 874 584 T3

His Ala Asn Gly Ala Val Cys Leu Ser Asp Leu Leu Gly Phe Leu Ala
 645 650 655
 His Ser Arg Ala Leu Ala Gly Leu Ala Ala Arg Gly Ala Ala Gly Cys
 660 665 670
 Ala Ala Asp Ser Val Phe Phe Asn Val Ser Val Leu Asp Pro Thr Ala
 675 680 685
 Arg Leu Gln Leu Glu Ala Arg Leu Gln His Leu Val Ala Glu Ile Leu
 690 695 700
 Glu Arg Glu Gln Ser Leu Ala Leu His Ala Leu Gly Tyr Gln Leu Ala
 705 710 715 720
 Phe Val Leu Asp Ser Pro Ser Ala Tyr Asp Ala Val Ala Pro Ser Ala
 725 730 735
 Ala His Leu Ile Asp Ala Leu Tyr Ala Glu Phe Leu Gly Gly Arg Val
 740 745 750
 Leu Thr Thr Pro Val Val His Arg Ala Leu Phe Tyr Ala Ser Ala Val
 755 760 765
 Leu Arg Gln Pro Phe Leu Ala Gly Val Pro Ser Ala Val Gln Arg Glu
 770 775 780
 Arg Ala Arg Arg Ser Leu Leu Ile Ala Ser Ala Leu Cys Thr Ser Asp
 785 790 795 800
 Val Ala Ala Ala Thr Asn Ala Asp Leu Arg Thr Ala Leu Ala Arg Ala
 805 810 815
 Asp His Gln Lys Thr Leu Phe Trp Leu Pro Asp His Phe Ser Pro Cys
 820 825 830
 Ala Ala Ser Leu Arg Phe Asp Leu Asp Glu Ser Val Phe Ile Leu Asp
 835 840 845
 Ala Leu Ala Gln Ala Thr Arg Ser Glu Thr Pro Val Glu Val Leu Ala
 850 855 860
 Gln Gln Thr His Gly Leu Ala Ser Thr Leu Thr Arg Trp Ala His Tyr
 865 870 875 880
 Asn Ala Leu Ile Arg Ala Phe Val Pro Glu Ala Ser His Arg Cys Gly
 885 890 895

ES 2 874 584 T3

Gly Gln Ser Ala Asn Val Glu Pro Arg Ile Leu Val Pro Ile Thr His
900 905 910

Asn Ala Ser Tyr Val Val Thr His Ser Pro Leu Pro Arg Gly Ile Gly
915 920 925

Tyr Lys Leu Thr Gly Val Asp Val Arg Arg Pro Leu Phe Leu Thr Tyr
930 935 940

Leu Thr Ala Thr Cys Glu Gly Ser Thr Arg Asp Ile Glu Ser Lys Arg
945 950 955 960

Leu Val Arg Thr Gln Asn Gln Arg Asp Leu Gly Leu Val Gly Ala Val
965 970 975

Phe Met Arg Tyr Thr Pro Ala Gly Glu Val Met Ser Val Leu Leu Val
980 985 990

Asp Thr Asp Asn Thr Gln Gln Gln Ile Ala Ala Gly Pro Thr Glu Gly
995 1000 1005

Ala Pro Ser Val Phe Ser Ser Asp Val Pro Ser Thr Ala Leu Leu
1010 1015 1020

Leu Phe Pro Asn Gly Thr Val Ile His Leu Leu Ala Phe Asp Thr
1025 1030 1035

Gln Pro Val Ala Ala Ile Ala Pro Gly Phe Leu Ala Ala Ser Ala
1040 1045 1050

Leu Gly Val Val Met Ile Thr Ala Ala Leu Ala Gly Ile Leu Lys
1055 1060 1065

Val Leu Arg Thr Ser Val Pro Phe Phe Trp Arg Arg Glu
1070 1075 1080

<210> 4
<211> 394
5 <212> PRT
<213> HSV-1

<400> 4

Met Gly Gly Ala Ala Ala Arg Leu Gly Ala Val Ile Leu Phe Val Val
1 5 10 15

10 Ile Val Gly Leu His Gly Val Arg Gly Lys Tyr Ala Leu Ala Asp Ala
20 25 30

ES 2 874 584 T3

Ser Leu Lys Met Ala Asp Pro Asn Arg Phe Arg Gly Lys Asp Leu Pro
 35 40 45
 Val Leu Asp Gln Leu Thr Asp Pro Pro Gly Val Arg Arg Val Tyr His
 50 55 60
 Ile Gln Ala Gly Leu Pro Asp Pro Phe Gln Pro Pro Ser Leu Pro Ile
 65 70 75 80
 Thr Val Tyr Tyr Ala Val Leu Glu Arg Ala Cys Arg Ser Val Leu Leu
 85 90 95
 Asn Ala Pro Ser Glu Ala Pro Gln Ile Val Arg Gly Ala Ser Glu Asp
 100 105 110
 Val Arg Lys Gln Pro Tyr Asn Leu Thr Ile Ala Trp Phe Arg Met Gly
 115 120 125
 Gly Asn Cys Ala Ile Pro Ile Thr Val Met Glu Tyr Thr Glu Cys Ser
 130 135 140
 Tyr Asn Lys Ser Leu Gly Ala Cys Pro Ile Arg Thr Gln Pro Arg Trp
 145 150 155 160
 Asn Tyr Tyr Asp Ser Phe Ser Ala Val Ser Glu Asp Asn Leu Gly Phe
 165 170 175
 Leu Met His Ala Pro Ala Phe Glu Thr Ala Gly Thr Tyr Leu Arg Leu
 180 185 190
 Val Lys Ile Asn Asp Trp Thr Glu Ile Thr Gln Phe Ile Leu Glu His
 195 200 205
 Arg Ala Lys Gly Ser Cys Lys Tyr Ala Leu Pro Leu Arg Ile Pro Pro
 210 215 220
 Ser Ala Cys Leu Ser Pro Gln Ala Tyr Gln Gln Gly Val Thr Val Asp
 225 230 235 240
 Ser Ile Gly Met Leu Pro Arg Phe Ile Pro Glu Asn Gln Arg Thr Val
 245 250 255
 Ala Val Tyr Ser Leu Lys Ile Ala Gly Trp His Gly Pro Lys Ala Pro
 260 265 270
 Tyr Thr Ser Thr Leu Leu Pro Pro Glu Leu Ser Glu Thr Pro Asn Ala

ES 2 874 584 T3

Thr Gln Pro Glu Leu Ala Pro Glu Asp Pro Glu Asp Ser Ala Leu Leu
290 295 300

Glu Asp Pro Val Gly Thr Val Ala Pro Gln Ile Pro Pro Asn Trp His
305 310 315 320

Ile Pro Ser Ile Gln Asp Ala Ala Thr Pro Tyr His Pro Pro Ala Thr
325 330 335

Pro Asn Asn Met Gly Leu Ile Ala Gly Ala Val Gly Gly Ser Leu Leu
340 345 350

Ala Ala Leu Val Ile Cys Gly Ile Val Tyr Trp Met Arg Arg Arg Thr
355 360 365

Gln Lys Ala Pro Lys Arg Ile Arg Leu Pro His Ile Arg Glu Asp Asp
370 375 380

Gln Pro Ser Ser His Gln Pro Leu Phe Tyr
385 390

<210> 5

<211> 621

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> gD como en R-LM113

10

<400> 5

Met Gly Gly Ala Ala Ala Arg Leu Gly Ala Val Ile Leu Phe Val Val
1 5 10 15

Ile Val Gly Leu His Gly Val Arg Gly Lys Tyr Ala Leu Ala Glu Asn
20 25 30

Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
35 40 45

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr
50 55 60

Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu
65 70 75 80

Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
85 90 95

ES 2 874 584 T3

Gly	Ser	Arg	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	
			100				105			110						
Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	His	Tyr	Thr	Thr	Pro	
			115				120				125					
Pro	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Ser	Asp	Met	Pro	
			130				135				140					
Met	Ala	Asp	Pro	Asn	Arg	Phe	Arg	Gly	Lys	Asn	Leu	Val	Phe	His	Ser	
145				150						155	160					
Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	
			165				170	175								
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Asn	Ile	Lys	Asp	Thr	
			180				185	190								
Tyr	Ile	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	
			195				200	205								
Ala	Arg	Ile	Tyr	Pro	Thr	Asn	Gly	Tyr	Thr	Arg	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	
			210				215	220								
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Ala	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Thr	Ala	Tyr	
225				230			235								240	
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
			245				250	255								
Ser	Arg	Trp	Gly	Gly	Asp	Gly	Phe	Tyr	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	
			260				265	270								
Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	
			275				280	285								
Gly	Ser	His	Ile	Gln	Ala	Gly	Leu	Pro	Asp	Pro	Phe	Gln	Pro	Pro	Ser	
			290				295	300								
Leu	Pro	Ile	Thr	Val	Tyr	Tyr	Ala	Val	Leu	Glu	Arg	Ala	Cys	Arg	Ser	
305				310			315								320	
Val	Leu	Leu	Asn	Ala	Pro	Ser	Glu	Ala	Pro	Gln	Ile	Val	Arg	Gly	Ala	
			325				330	335								
Ser	Glu	Asp	Val	Arg	Lys	Gln	Pro	Tyr	Asn	Leu	Thr	Ile	Ala	Trp	Phe	

ES 2 874 584 T3

```

340              345              350

Arg Met Gly Gly Asn Cys Ala Ile Pro Ile Thr Val Met Glu Tyr Thr
    355              360              365

Glu Cys Ser Tyr Asn Lys Ser Leu Gly Ala Cys Pro Ile Arg Thr Gln
    370              375              380

Pro Arg Trp Asn Tyr Tyr Asp Ser Phe Ser Ala Val Ser Glu Asp Asn
    385              390              395              400

Leu Gly Phe Leu Met His Ala Pro Ala Phe Glu Thr Ala Gly Thr Tyr
    405              410              415

Leu Arg Leu Val Lys Ile Asn Asp Trp Thr Glu Ile Thr Gln Phe Ile
    420              425              430

Leu Glu His Arg Ala Lys Gly Ser Cys Lys Tyr Ala Leu Pro Leu Arg
    435              440              445

Ile Pro Pro Ser Ala Cys Leu Ser Pro Gln Ala Tyr Gln Gln Gly Val
    450              455              460

Thr Val Asp Ser Ile Gly Met Leu Pro Arg Phe Ile Pro Glu Asn Gln
    465              470              475              480

Arg Thr Val Ala Val Tyr Ser Leu Lys Ile Ala Gly Trp His Gly Pro
    485              490              495

Lys Ala Pro Tyr Thr Ser Thr Leu Leu Pro Pro Glu Leu Ser Glu Thr
    500              505              510

Pro Asn Ala Thr Gln Pro Glu Leu Ala Pro Glu Asp Pro Glu Asp Ser
    515              520              525

Ala Leu Leu Glu Asp Pro Val Gly Thr Val Ala Pro Gln Ile Pro Pro
    530              535              540

Asn Trp His Ile Pro Ser Ile Gln Asp Ala Ala Thr Pro Tyr His Pro
    545              550              555              560

Pro Ala Thr Pro Asn Asn Met Gly Leu Ile Ala Gly Ala Val Gly Gly
    565              570              575

Ser Leu Leu Ala Ala Leu Val Ile Cys Gly Ile Val Tyr Trp Met Arg
    580              585              590

Arg Arg Thr Gln Lys Ala Pro Lys Arg Ile Arg Leu Pro His Ile Arg
    595              600              605

Glu Asp Asp Gln Pro Ser Ser His Gln Pro Leu Phe Tyr
    610              615              620

```

5 <210> 6
 <211> 503
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> gD como en R-LM249

5 <400> 6

```

Met Gly Gly Ala Ala Ala Arg Leu Gly Ala Val Ile Leu Phe Val Val
 1                               10                      15

Ile Val Gly Leu His Gly Val Arg Gly Lys Tyr Ala Leu Ala Asp Ala
    20                      25                      30

Ser Leu Lys Met Ala Asp Pro Asn Arg Phe Arg Gly Lys Asp Leu Pro
    35                      40                      45

Val Leu Asp Gln Leu Thr Asp Pro Pro Gly Val Arg Arg Val Tyr His
    50                      55                      60

Ile Gln Ala Gly Leu Pro Asp Pro Phe Gln Pro Pro Ser Leu Pro Ile
 65                      70                      75                      80

Thr Val Tyr Tyr Ala His Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Ser Asp Ile
    85                      90                      95

Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg
    100                      105                      110

Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala Val Ala
    115                      120                      125

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser
    130                      135                      140

Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Arg
 145                      150                      155                      160

Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp
    165                      170                      175

Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro Thr Phe

```

ES 2 874 584 T3

180						185						190					
Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Ser	Asp	Met	Pro	Met	Ala	Asp		
		195					200					205					
Pro	Asn	Arg	Phe	Arg	Gly	Lys	Asn	Leu	Val	Phe	His	Ser	Glu	Val	Gln		
	210					215					220						
Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	Ser	Leu	Arg		
225					230					235					240		
Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Asn	Ile	Lys	Asp	Thr	Tyr	Ile	His		
				245					250					255			
Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	Ala	Arg	Ile		
			260					265					270				
Tyr	Pro	Thr	Asn	Gly	Tyr	Thr	Arg	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg		
		275					280					285					
Phe	Thr	Ile	Ser	Ala	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Thr	Ala	Tyr	Leu	Gln	Met		
	290					295					300						
Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ser	Arg	Trp		
305					310					315					320		
Gly	Gly	Asp	Gly	Phe	Tyr	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu		
				325					330					335			
Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Gly	Ser	Gly		
			340					345					350				
Met	Leu	Pro	Arg	Phe	Ile	Pro	Glu	Asn	Gln	Arg	Thr	Val	Ala	Val	Tyr		
		355					360					365					
Ser	Leu	Lys	Ile	Ala	Gly	Trp	His	Gly	Pro	Lys	Ala	Pro	Tyr	Thr	Ser		
	370					375					380						
Thr	Leu	Leu	Pro	Pro	Glu	Leu	Ser	Glu	Thr	Pro	Asn	Ala	Thr	Gln	Pro		
385					390					395					400		
Glu	Leu	Ala	Pro	Glu	Asp	Pro	Glu	Asp	Ser	Ala	Leu	Leu	Glu	Asp	Pro		
				405					410					415			
Val	Gly	Thr	Val	Ala	Pro	Gln	Ile	Pro	Pro	Asn	Trp	His	Ile	Pro	Ser		
			420					425					430				

ES 2 874 584 T3

Ile Gln Asp Ala Ala Thr Pro Tyr His Pro Pro Ala Thr Pro Asn Asn
435 440 445

Met Gly Leu Ile Ala Gly Ala Val Gly Gly Ser Leu Leu Ala Ala Leu
450 455 460

Val Ile Cys Gly Ile Val Tyr Trp Met Arg Arg Arg Thr Gln Lys Ala
465 470 475 480

Pro Lys Arg Ile Arg Leu Pro His Ile Arg Glu Asp Asp Gln Pro Ser
485 490 495

Ser His Gln Pro Leu Phe Tyr
500

<210> 7

<211> 615

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> gD como en R-VG805

10

<400> 7

Met Gly Gly Ala Ala Ala Arg Leu Gly Ala Val Ile Leu Phe Val Val
1 5 10 15

Ile Val Gly Leu His Gly Val Arg Gly Lys Tyr Ala Leu Ala Ala Glu
20 25 30

Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser
35 40 45

Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser His Trp
50 55 60

Met His Trp Val Lys Gln Arg Ala Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly
65 70 75 80

Glu Phe Asn Pro Ser Asn Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
85 90 95

Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met
100 105 110

Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
115 120 125

Ser Arg Asp Tyr Asp Tyr Asp Gly Arg Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln

ES 2 874 584 T3

130		135		140
Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly				
145		150		155 160
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro Ala				
		165	170	175
Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala				
		180	185	190
Ser Ser Ser Val Thr Tyr Met Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser				
		195	200	205
Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val				
		210	215	220
Pro Val Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr				
		225	230	235 240
Ile Ser Arg Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln				
		245	250	255
Trp Ser Ser His Ile Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Glu Leu Glu Ile				
		260	265	270
Lys Ser Ser Ala Gly Ser Ala Ser Ser Ser Ala Ser His Ile Gln Ala				
		275	280	285
Gly Leu Pro Asp Pro Phe Gln Pro Pro Ser Leu Pro Ile Thr Val Tyr				
		290	295	300
Tyr Ala Val Leu Glu Arg Ala Cys Arg Ser Val Leu Leu Asn Ala Pro				
		305	310	315 320
Ser Glu Ala Pro Gln Ile Val Arg Gly Ala Ser Glu Asp Val Arg Lys				
		325	330	335
Gln Pro Tyr Asn Leu Thr Ile Ala Trp Phe Arg Met Gly Gly Asn Cys				
		340	345	350
Ala Ile Pro Ile Thr Val Met Glu Tyr Thr Glu Cys Ser Tyr Asn Lys				
		355	360	365
Ser Leu Gly Ala Cys Pro Ile Arg Thr Gln Pro Arg Trp Asn Tyr Tyr				
		370	375	380

ES 2 874 584 T3

Asp Ser Phe Ser Ala Val Ser Glu Asp Asn Leu Gly Phe Leu Met His
 385 390 395 400
 Ala Pro Ala Phe Glu Thr Ala Gly Thr Tyr Leu Arg Leu Val Lys Ile
 405 410 415
 Asn Asp Trp Thr Glu Ile Thr Gln Phe Ile Leu Glu His Arg Ala Lys
 420 425 430
 Gly Ser Cys Lys Tyr Ala Leu Pro Leu Arg Ile Pro Pro Ser Ala Cys
 435 440 445
 Leu Ser Pro Gln Ala Tyr Gln Gln Gly Val Thr Val Asp Ser Ile Gly
 450 455 460
 Met Leu Pro Arg Phe Ile Pro Glu Asn Gln Arg Thr Val Ala Val Tyr
 465 470 475 480
 Ser Leu Lys Ile Ala Gly Trp His Gly Pro Lys Ala Pro Tyr Thr Ser
 485 490 495
 Thr Leu Leu Pro Pro Glu Leu Ser Glu Thr Pro Asn Ala Thr Gln Pro
 500 505 510
 Glu Leu Ala Pro Glu Asp Pro Glu Asp Ser Ala Leu Leu Glu Asp Pro
 515 520 525
 Val Gly Thr Val Ala Pro Gln Ile Pro Pro Asn Trp His Ile Pro Ser
 530 535 540
 Ile Gln Asp Ala Ala Thr Pro Tyr His Pro Pro Ala Thr Pro Asn Asn
 545 550 555 560
 Met Gly Leu Ile Ala Gly Ala Val Gly Gly Ser Leu Leu Ala Ala Leu
 565 570 575
 Val Ile Cys Gly Ile Val Tyr Trp Met Arg Arg Arg Thr Gln Lys Ala
 580 585 590
 Pro Lys Arg Ile Arg Leu Pro His Ile Arg Glu Asp Asp Gln Pro Ser
 595 600 605
 Ser His Gln Pro Leu Phe Tyr
 610 615

<210> 8

<211> 619

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> gD como en R-VG807

10

<400> 8

ES 2 874 584 T3

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

ES 2 874 584 T3

Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln
 225 230 235 240
 Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Arg
 245 250 255
 Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 260 265 270
 Leu Val Thr Val Ser Ser Ser Ala Gly Ser Ala Ser Ser Ser Ala Ser
 275 280 285
 His Ile Gln Ala Gly Leu Pro Asp Pro Phe Gln Pro Pro Ser Leu Pro
 290 295 300
 Ile Thr Val Tyr Tyr Ala Val Leu Glu Arg Ala Cys Arg Ser Val Leu
 305 310 315 320
 Leu Asn Ala Pro Ser Glu Ala Pro Gln Ile Val Arg Gly Ala Ser Glu
 325 330 335
 Asp Val Arg Lys Gln Pro Tyr Asn Leu Thr Ile Ala Trp Phe Arg Met
 340 345 350
 Gly Gly Asn Cys Ala Ile Pro Ile Thr Val Met Glu Tyr Thr Glu Cys
 355 360 365
 Ser Tyr Asn Lys Ser Leu Gly Ala Cys Pro Ile Arg Thr Gln Pro Arg
 370 375 380
 Trp Asn Tyr Tyr Asp Ser Phe Ser Ala Val Ser Glu Asp Asn Leu Gly
 385 390 395 400
 Phe Leu Met His Ala Pro Ala Phe Glu Thr Ala Gly Thr Tyr Leu Arg
 405 410 415
 Leu Val Lys Ile Asn Asp Trp Thr Glu Ile Thr Gln Phe Ile Leu Glu
 420 425 430
 His Arg Ala Lys Gly Ser Cys Lys Tyr Ala Leu Pro Leu Arg Ile Pro
 435 440 445
 Pro Ser Ala Cys Leu Ser Pro Gln Ala Tyr Gln Gln Gly Val Thr Val
 450 455 460
 Asp Ser Ile Gly Met Leu Pro Arg Phe Ile Pro Glu Asn Gln Arg Thr
 465 470 475 480

ES 2 874 584 T3

Val Ala Val Tyr Ser Leu Lys Ile Ala Gly Trp His Gly Pro Lys Ala
485 490 495

Pro Tyr Thr Ser Thr Leu Leu Pro Pro Glu Leu Ser Glu Thr Pro Asn
500 505 510

Ala Thr Gln Pro Glu Leu Ala Pro Glu Asp Pro Glu Asp Ser Ala Leu
515 520 525

Leu Glu Asp Pro Val Gly Thr Val Ala Pro Gln Ile Pro Pro Asn Trp
530 535 540

His Ile Pro Ser Ile Gln Asp Ala Ala Thr Pro Tyr His Pro Pro Ala
545 550 555 560

Thr Pro Asn Asn Met Gly Leu Ile Ala Gly Ala Val Gly Gly Ser Leu
565 570 575

Leu Ala Ala Leu Val Ile Cys Gly Ile Val Tyr Trp Met Arg Arg Arg
580 585 590

Thr Gln Lys Ala Pro Lys Arg Ile Arg Leu Pro His Ile Arg Glu Asp
595 600 605

Asp Gln Pro Ser Ser His Gln Pro Leu Phe Tyr
610 615

<210> 9

<211> 361

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> gD como en R-VG809

10

<400> 9

Met Gly Gly Ala Ala Ala Arg Leu Gly Ala Val Ile Leu Phe Val Val
1 5 10 15

Ile Val Gly Leu His Gly Val Arg Gly Lys Tyr Ala Leu Ala His Ile
20 25 30

Gln Ala Gly Leu Pro Asp Pro Phe Gln Pro Pro Ser Leu Pro Ile Thr
35 40 45

Val Tyr Tyr Ala Val Leu Glu Arg Ala Cys Arg Ser Val Leu Leu Asn
50 55 60

ES 2 874 584 T3

Ala Pro Ser Glu Ala Pro Gln Ile Val Arg Gly Ala Ser Glu Asp Val
 65 70 75 80
 Arg Lys Gln Pro Tyr Asn Leu Thr Ile Ala Trp Phe Arg Met Gly Gly
 85 90 95
 Asn Cys Ala Ile Pro Ile Thr Val Met Glu Tyr Thr Glu Cys Ser Tyr
 100 105 110
 Asn Lys Ser Leu Gly Ala Cys Pro Ile Arg Thr Gln Pro Arg Trp Asn
 115 120 125
 Tyr Tyr Asp Ser Phe Ser Ala Val Ser Glu Asp Asn Leu Gly Phe Leu
 130 135 140
 Met His Ala Pro Ala Phe Glu Thr Ala Gly Thr Tyr Leu Arg Leu Val
 145 150 155 160
 Lys Ile Asn Asp Trp Thr Glu Ile Thr Gln Phe Ile Leu Glu His Arg
 165 170 175
 Ala Lys Gly Ser Cys Lys Tyr Ala Leu Pro Leu Arg Ile Pro Pro Ser
 180 185 190
 Ala Cys Leu Ser Pro Gln Ala Tyr Gln Gln Gly Val Thr Val Asp Ser
 195 200 205
 Ile Gly Met Leu Pro Arg Phe Ile Pro Glu Asn Gln Arg Thr Val Ala
 210 215 220
 Val Tyr Ser Leu Lys Ile Ala Gly Trp His Gly Pro Lys Ala Pro Tyr
 225 230 235 240
 Thr Ser Thr Leu Leu Pro Pro Glu Leu Ser Glu Thr Pro Asn Ala Thr
 245 250 255
 Gln Pro Glu Leu Ala Pro Glu Asp Pro Glu Asp Ser Ala Leu Leu Glu
 260 265 270
 Asp Pro Val Gly Thr Val Ala Pro Gln Ile Pro Pro Asn Trp His Ile
 275 280 285
 Pro Ser Ile Gln Asp Ala Ala Thr Pro Tyr His Pro Pro Ala Thr Pro
 290 295 300
 Asn Asn Met Gly Leu Ile Ala Gly Ala Val Gly Gly Ser Leu Leu Ala
 305 310 315 320
 Ala Leu Val Ile Cys Gly Ile Val Tyr Trp Met Arg Arg Arg Thr Gln
 325 330 335
 Lys Ala Pro Lys Arg Ile Arg Leu Pro His Ile Arg Glu Asp Asp Gln
 340 345 350
 Pro Ser Ser His Gln Pro Leu Phe Tyr
 355 360

<210> 10
 <211> 74
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador gH6_galK_f

 10 <400> 10

 atgcggtcca tgcccaggcc atccaaaaac catgggtctg tctgctcagt cctgttgaca 60
 attaatcatc ggca 74

 <210> 11
 15 <211> 70
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 20 <223> cebador gH5_galK_r

 <400> 11

 <210> 12
 25 <211> 801
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 30 <223> pSG-ScFvHER2-SG que porta un casete de scFv de trastuzumab enmarcado por ligadores de Ser-Gly

 <400> 12

 catagtagtg gcggtggctc tggatccgat atccagatga cccagtcgcc gagctccctg 60
 tccgcctctg tgggcgatag ggtcaccatc acctgccgtg ccagtcagga tgtgaatact 120
 gctgtagcct ggtatcaaca gaaaccagga aaagctccga agcttctgat ttactcggca 180
 tccttctctc actctggagt ccttctctgc ttctctggta gccgttccgg gacggatttc 240
 actctgacca tcagcagtct gcagccggaa gacttcgcaa cttattactg tcagcaacat 300
 tatactactc ctcccacgtt cggacagggt accaaggtgg agatcaaatac ggatatgccg 360
 tcgtgggggt tattattttg ggcgttgctg ggggtcaggt ccacgactgg tcagcactgt 60

 35 cctgctcctt 70
 atggctgata cgaaccgttt ccgcggtaag aacctggttt ttcattctga ggttcagctg 420
 gtggagtctg gcggtggcct ggtgcagcca gggggctcac tccgtttgtc ctgtgcagct 480
 tctggcttca acattaaaga cacctatata cactgggtgc gtcaggcccc gggtaagggc 540
 ctggaatggg ttgcaaggat ttatcctacg aatgggtata ctagatatgc cgatagcgtc 600
 aagggccgtt tcactataag cgcagacaca tccaaaaaca cagcctacct acaaatgaac 660
 agcttaagag ctgaggacac tgccgtctat tattgtagcc gctggggagg ggacggettc 720
 tatgctatgg actactgggg tcaaggaaca ctagtcaccg tctcctcgag tggcgggtggc 780
 tctggttccg gtggatccgg t 801

 <210> 13

<211> 78
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> cebador gH23_8SG_scFv4D5_f

<400> 13

tcgtgggggt tattattttg ggcgttgcgt ggggtcaggt ccacgactgg catagtagtg 60

10 gcggtggctc tggatccg 78

<210> 14
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> cebador scFv4D5_358_r

20 <400> 14
 ggaaacggtt cggatcagcc atcgg 25

<210> 15
 <211> 74
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> cebador gH24_12SG_scFv4D5r

30 <400> 15

atgcggtcca tgcccaggcc atccaaaaac catgggtctg tctgctcagt accggtacca 60

ccggaaccag agcc 74

35 <210> 16
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> cebador scFv4D5_315_f

<400> 16
 ggagatcaaa tcgatatgc cgatgg 26

45 <210> 17
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> ligador

<400> 17

55

His Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly
 1 5

<210> 18
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

60

<220>
<223> ligador

5 <400> 18

Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Ser Gly Gly Ser Gly
1 5 10

<210> 19
<211> 20
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> ligador

<400> 19

Ser Asp Met Pro Met Ala Asp Pro Asn Arg Phe Arg Gly Lys Asn Leu
1 5 10 15

Val Phe His Ser
20

20 <210> 20
<211> 74
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> cebador UL37/38_galK_f

<400> 20

30 ccgcaggcgt tgcgagtacc ccgcgtcttc gcggggtggt atacggccac cctgttgaca 60
attaatcatc ggca 74

35 <210> 21
<211> 70
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> cebador UL37/38_galK_r

<400> 21

tccggacaat ccccggggcc tgggtccgcg aacgggatgc cgggacttaa tcagcactgt 60
cctgctcctt 70

45 <210> 22
<211> 72
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

50 <220>
<223> cebador UL37/38_CMV_mcherry_f

<400> 22

55 ccgcaggcgt tgcgagtacc ccgcgtcttc gcggggtggt atacggccac cgatgtacgg 60
gccagatata cg 72

<210> 23
 <211> 70
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador UL37/38_pA_mcherry_1958_r

 10 <400> 23

 tccggacaat cccccgggcc tgggtccgcg aacgggatgc cgggacttaa ccatagagcc 60
 caccgcatcc 70

 <210> 24
 15 <211> 74
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 20 <223> cebador gH29_galK_f

 <400> 24

 cgcggtggtt ttgggggtc ggggtgttt ggcagccaca gacgcccggt cctgttgaca 60
 attaatcatc ggca 74

 25 <210> 25
 <211> 70
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> cebador gH5_galK_r

 <400> 25
 35 <210> 26
 <211> 74
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 40 <223> cebador gH48_12SG_scFv4D5_r

 <400> 26

 ccgcgcggtg gtttttgggg gtcgggggtg tttggcagcc acagacgcc accggatcca 60
 ccggaaccag agcc 74

 50 <210> 27
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 55 <220>
 <223> cebador scFv4D5_315_f

 <400> 27

ggagatcaaa tcggatatgc cgatgg 26

<210> 28
<211> 27
5 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
10 <223> cebador galk_129_f

<400> 28
acaatctctg ttgccaacg catttgg 27

<210> 29
15 <211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
20 <223> cebador galk_417_r

<400> 29
cattgccgct gatcaccatg tccacgc 27

<210> 30
25 <211> 74
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
30 <223> cebador gD5_galk_f

<400> 30

ttgtcgtcat agtgggcctc catgggggtcc gcggcaaata tgccttggcg cctgttgaca 60

35 attaatcatc ggca 74

<210> 31
<211> 70
<212> ADN
40 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador gD39_galk_r

45 <400> 31

atcgggagggc tggggggctg gaacgggtcc ggtaggcccg cctggatgtg tcagcactgt 60

cctgctcctt 70

<210> 32
50 <211> 100
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
55 <223> oligonucleótido gD_aa5_39_f_r

<400> 32

ttgtcgtcat agtgggcctc catgggggtcc gcggcaaata tgccttggcg cacatccagg 60

cgggcctacc ggacccttc cagcccccca gcctcccgat 100

60

<210> 33
 <211> 74
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> cebador gD5_galK_f
 <400> 33
 10 ttgtcgtcat agtgggcctc catgggggtcc gcggcaaata tgccttggcg cctgttgaca 60
 attaatcatc ggca 74
 <210> 34
 <211> 70
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> gD39_galK_r
 20 <400> 34
 atcgggagggc tggggggctg gaacgggtcc ggtaggcccg cctggatgtg tcagcactgt 60
 cctgctcctt 70
 25 <210> 35
 <211> 73
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> cebador BAC_LM611_f
 <400> 35
 35 ttgtcgtcat agtgggcctc catgggggtcc gcggcaaata tgccttggcg gccgaggtgc 60
 aactgcagca gtc 73
 <210> 36
 <211> 106
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> gD39_11SAG_EGFR_r
 45 <400> 36
 atcgggagggc tggggggctg gaacgggtcc ggtaggcccg cctggatgtg acttgacta 60
 gatgaagcac ttctgcgga agatttgatc tcgagttctg tccccg 106
 50 <210> 37
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 55 <220>
 <223> ligador
 <400> 37

ES 2 874 584 T3

```

                Ser Ser Ala Gly Ser Ala Ser Ser Ser Ala Ser
                1         5         10

<210> 38
<211> 15
5  <212> PRT
   <213> Secuencia artificial

<220>
<223> ligador
10

<400> 38

                Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
                1         5         10         15

15  <210> 39
    <211> 74
    <212> ADN
    <213> Secuencia artificial

20  <220>
    <223> cebador gD5_galK_f

    <400> 39

    ttgtcgtcat agtgggcctc catgggggtcc gcggcaaata tgccttggcg cctgttgaca        60

25  attaatcatc ggca                                                74

    <210> 40
    <211> 70
    <212> ADN
30  <213> Secuencia artificial

    <220>
    <223> cebador gD39_galK_r

35  <400> 40

    atcgggaggc tggggggctg gaacgggtcc ggtaggcccg cctggatgtg tcagcactgt        60

    cctgctcctt                                                        70

    <210> 41
    <211> 75
    <212> ADN
    <213> Secuencia artificial

    <220>
45  <223> cebador gD5_scFvHER2_f

    <400> 41

    ttgtcgtcat agtgggcctc catgggggtcc gcggcaaata tgccttggcg tccgatatcc        60

    agatgaccca gtccc                                                75

50

    <210> 42
    <211> 110
    <212> ADN
    <213> Secuencia artificial

55  <220>
    <223> cebador gD39_11SAG_HER2_r

    <400> 42

```

ES 2 874 584 T3

```

atcgggaggc tggggggctg gaacgggtcc ggtaggcccg cctggatgtg acttgcacta      60
gatgaagcac ttcctgcgga agaggagacg gtgactagtg ttccttgacc      110

<210> 43
<211> 11
5  <212> PRT
   <213> Secuencia artificial

<220>
<223> ligador
10

<400> 43

                Ser Ser Ala Gly Ser Ala Ser Ser Ser Ala Ser
                1          5          10

15  <210> 44
    <211> 20
    <212> PRT
    <213> Secuencia artificial

20  <220>
    <223> ligador

    <400> 44

                Ser Asp Met Pro Met Ala Asp Pro Asn Arg Phe Arg Gly Lys Asn Leu
                1          5          10          15

25  Val Phe His Ser
                20

```

REIVINDICACIONES

1. Virus del herpes infeccioso recombinante, que comprende

- (a) un ligando polipeptídico heterólogo, en el que el ligando polipeptídico heterólogo está fusionado con el extremo N-terminal de la glicoproteína H (gH) madura o de una gH truncada hasta el aminoácido 48 de la SEQ ID NO: 1, o insertado en la gH dentro de la región N-terminal comenzando en cualquiera de los aminoácidos 19 a 23 y acabando en el aminoácido 48, y en el que el ligando polipeptídico heterólogo no es la glicoproteína D (gD) del virus del herpes, ni un fragmento de la misma, que se une específicamente a un ligando celular de gD, y
- (b) una gD alterada que tiene unión reducida o inespecífica a ligandos celulares de gD, en el que la gD comprende un ligando polipeptídico heterólogo fusionado con el extremo N-terminal de la gD madura o de una gD truncada, o insertado en la gD.

2. Virus del herpes infeccioso recombinante, según la reivindicación 1, en el que el ligando polipeptídico heterólogo está insertado de manera N-terminal respecto al dominio H1A de gH.

3. Virus del herpes infeccioso recombinante, según la reivindicación 1, en el que el ligando polipeptídico heterólogo está insertado en la gH entre el aminoácido 23 y el aminoácido 24 de la gH, según la SEQ ID NO: 1, o una región correspondiente de una gH homóloga.

4. Virus del herpes infeccioso recombinante, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que uno o varios aminoácidos de gH de la región N-terminal están delecionados.

5. Virus del herpes infeccioso recombinante, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la gD tiene una delección de aminoácidos comenzando en cualquiera de los residuos de aminoácido 26 a 33 y acabando en cualquiera de los residuos de aminoácido 31 a 63, y/o comenzando en cualquiera de los residuos de aminoácido 65 a 86 y acabando en cualquiera de los residuos de aminoácido 235 a 243 de la gD, según la SEQ ID NO: 4, o una región correspondiente de una gD homóloga.

6. Virus del herpes infeccioso recombinante, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicho virus del herpes tiene una virulencia reducida o tiene una capacidad de replicación que es diferente en células enfermas frente a células no enfermas.

7. Virus del herpes infeccioso recombinante, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende, además, un marcador detectable heterólogo y/o uno o varios casetes de expresión que expresan uno o varios de los siguientes

- i) una o varias proteínas terapéuticas,
- ii) uno o varios antígenos, epítopos/neoepítopos o cadena de epítopos/neoepítopos heterólogos o autólogos, o
- iii) una o varias enzimas de conversión de profármacos.

8. Virus del herpes infeccioso recombinante, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el ligando polipeptídico heterólogo se une a una molécula, o a una parte de la misma, accesible en la superficie de una célula, y en el que la célula es, preferentemente, una célula enferma.

9. Virus del herpes infeccioso recombinante, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, para su utilización en medicina.

10. Ácido nucleico que comprende un genoma que codifica el virus del herpes infeccioso recombinante, según cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que el genoma codifica el ligando polipeptídico heterólogo fusionado con o insertado en la gH, tal como se define en la reivindicación 1 (a), y la gD alterada que comprende el ligando polipeptídico heterólogo, tal como se define en la reivindicación 1 (b).

11. Ácido nucleico, según la reivindicación 10, en el que el genoma codifica la gH modificada y la gD modificada como precursores que incluyen las secuencias señal.

12. Vector que comprende el ácido nucleico, según la reivindicación 11.

13. Célula que comprende el virus del herpes infeccioso recombinante, según cualquiera de las reivindicaciones 1-9, el ácido nucleico, según la reivindicación 11, o el vector, según la reivindicación 12.

14. Procedimiento *in vitro* para destruir una célula utilizando el virus del herpes infeccioso recombinante, según cualquiera de las reivindicaciones 1-8.

15. Procedimiento *in vitro* para hacer crecer el virus del herpes infeccioso recombinante, según cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en células.

Figura 1

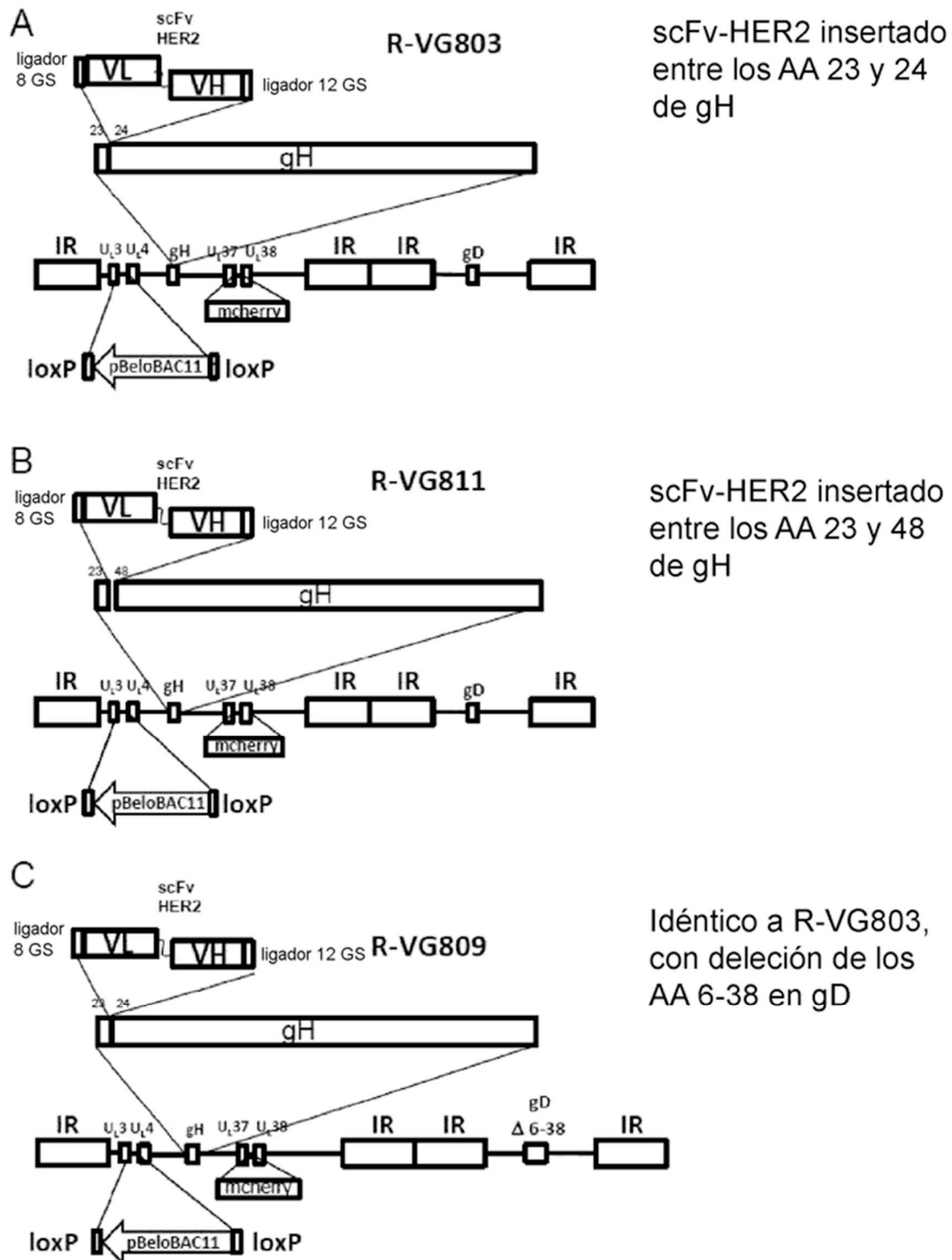


Figura 1 (continuación)

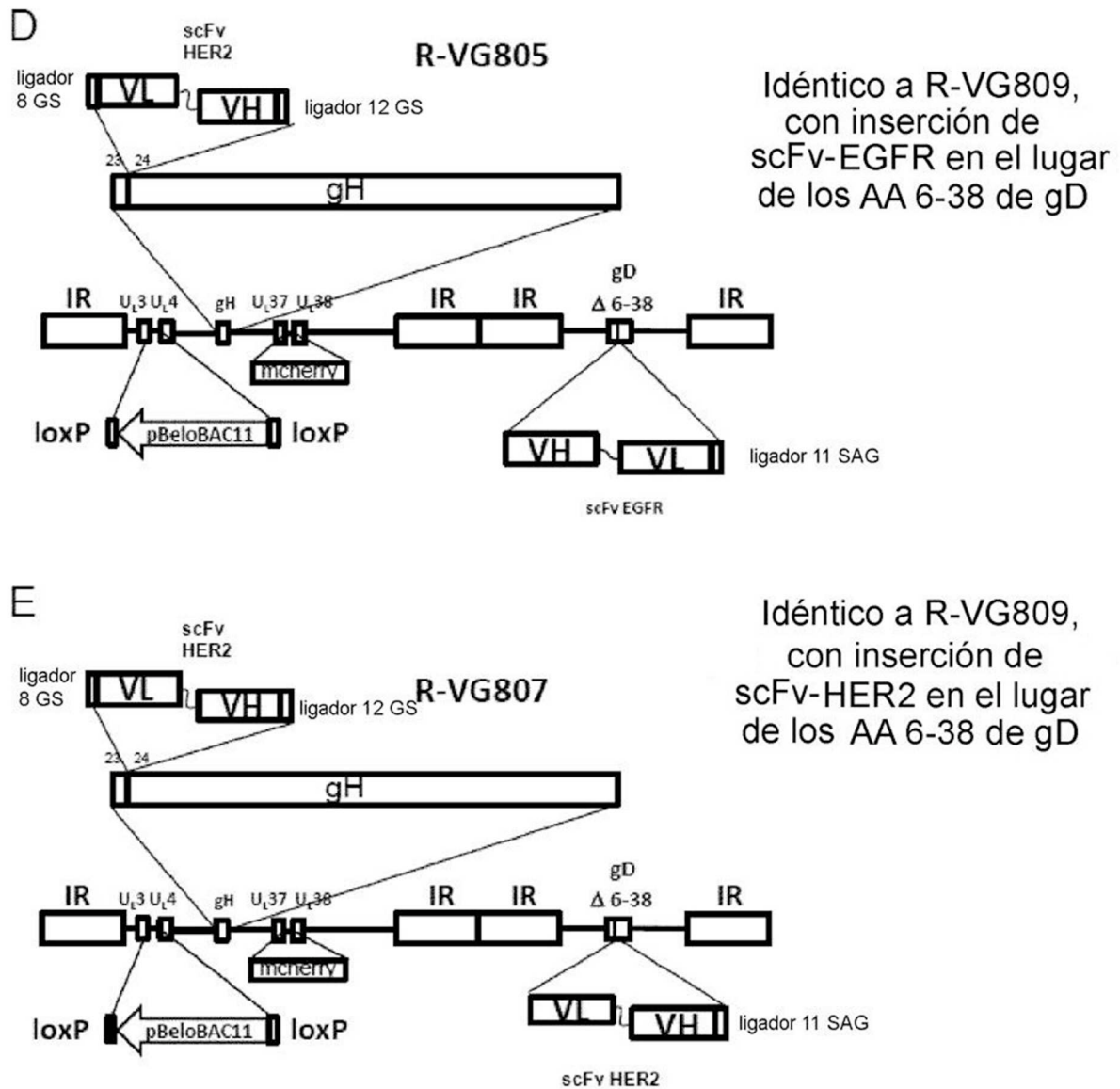


Figura 2

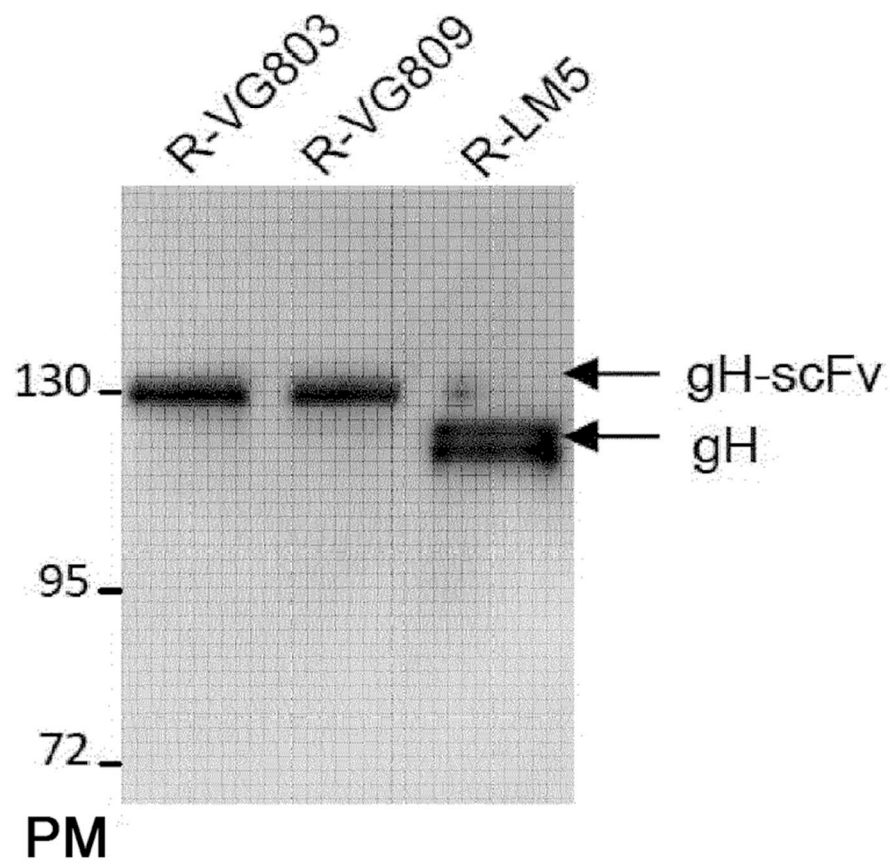


Figura 3

R-VG803

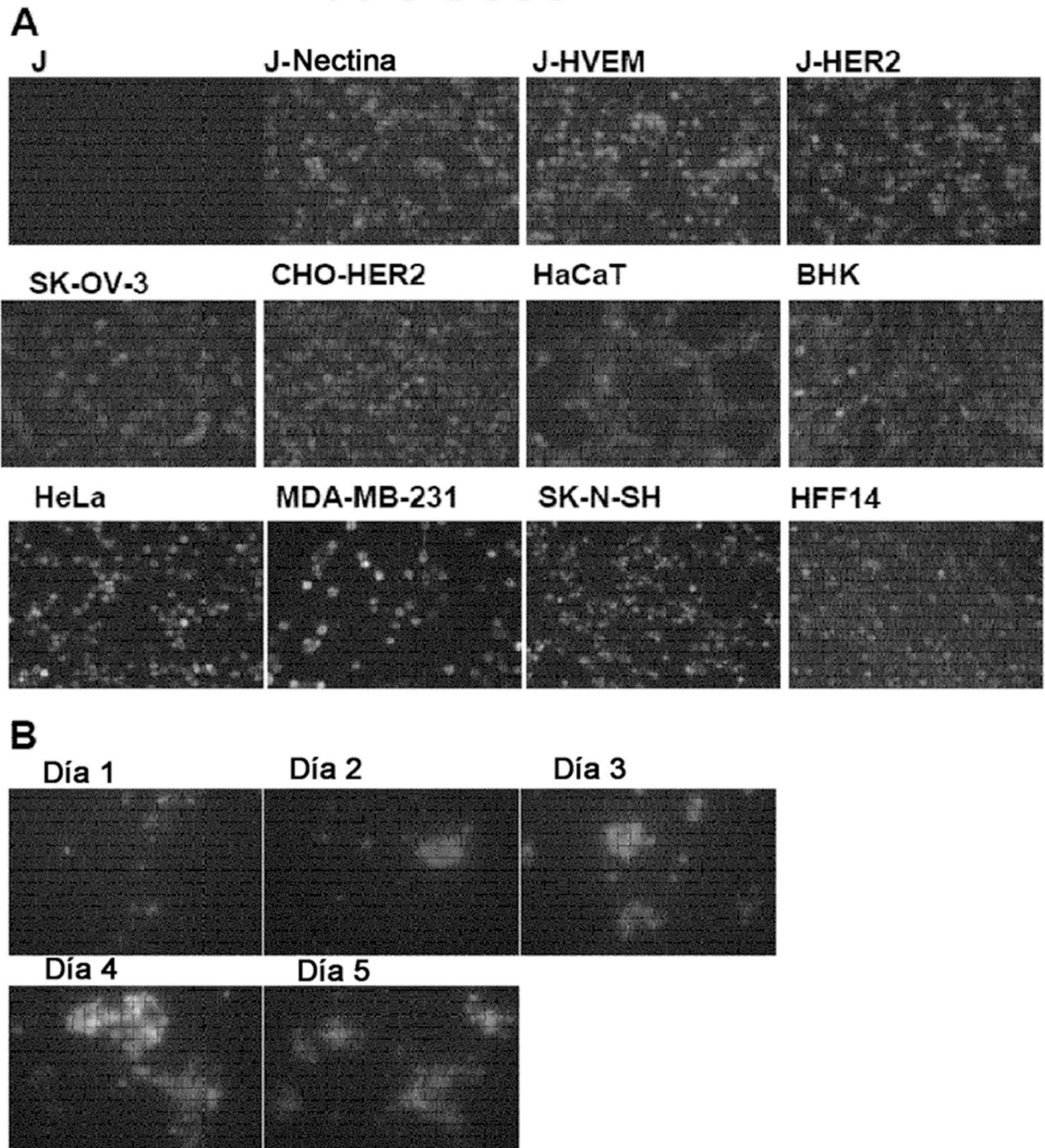


Figura 4

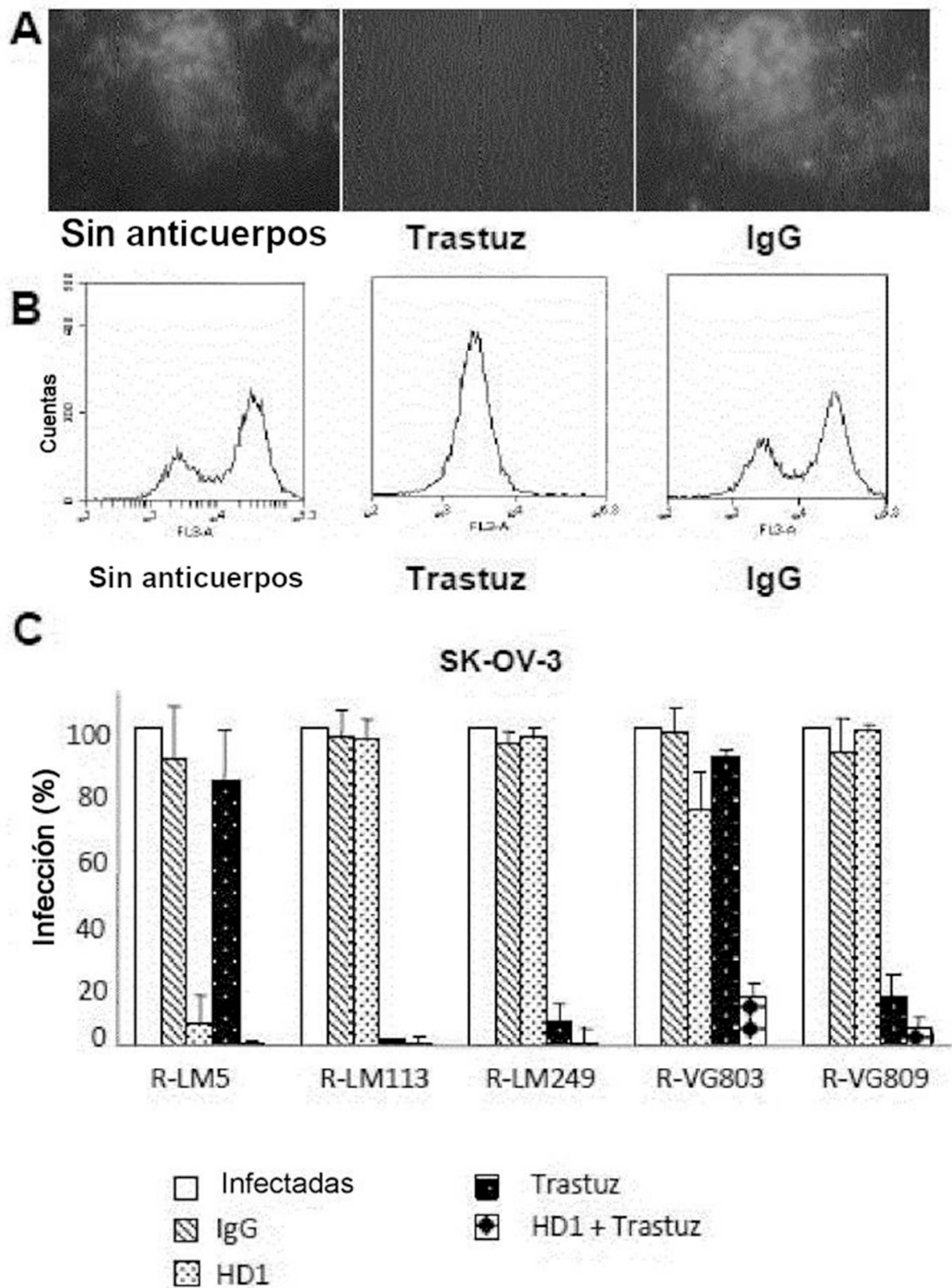


Figura 5

R-VG809

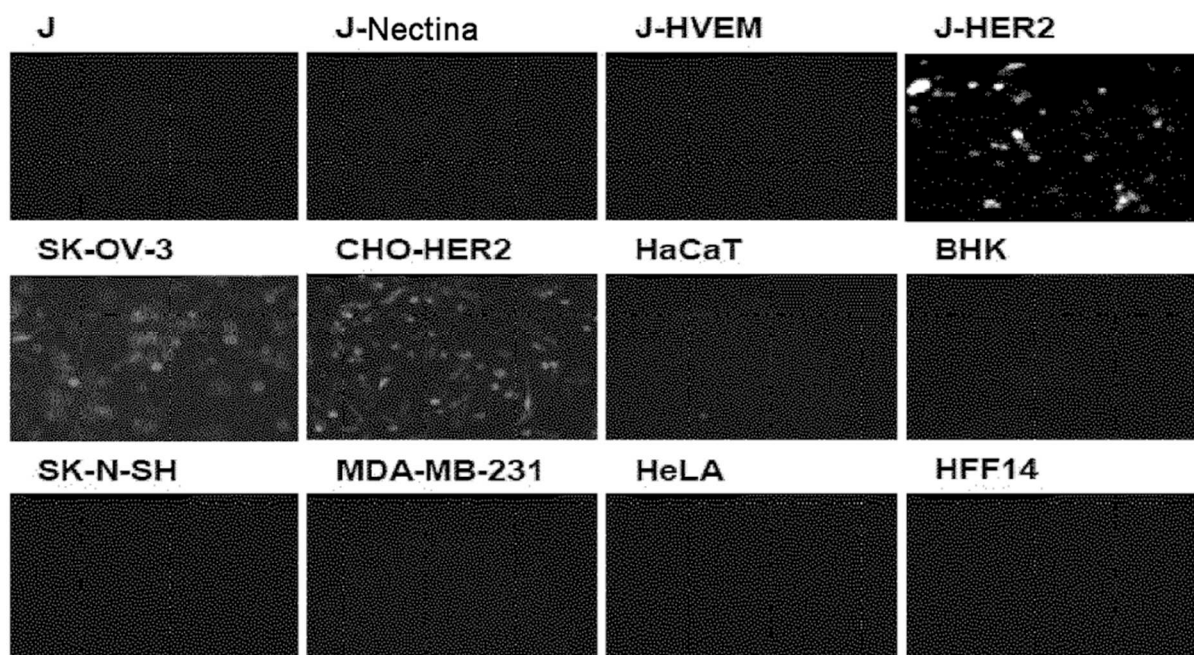


Figura 6

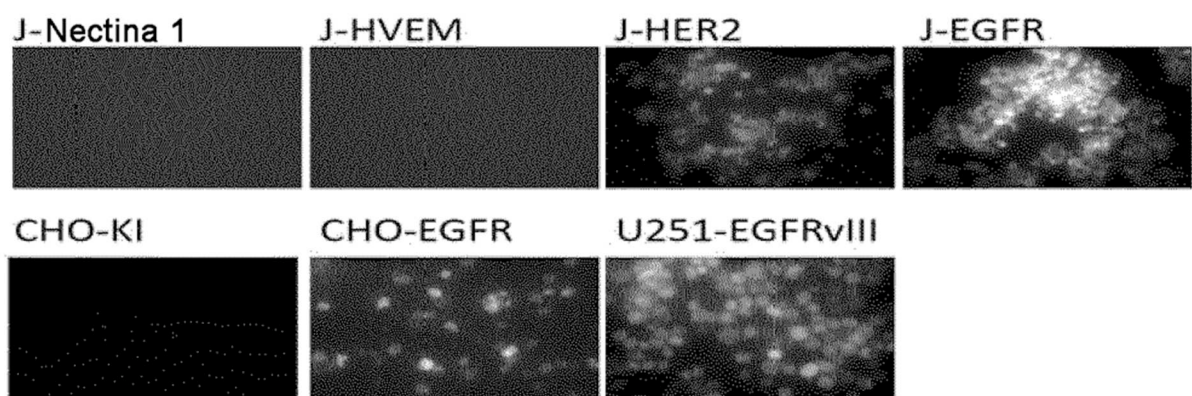


Figura 7

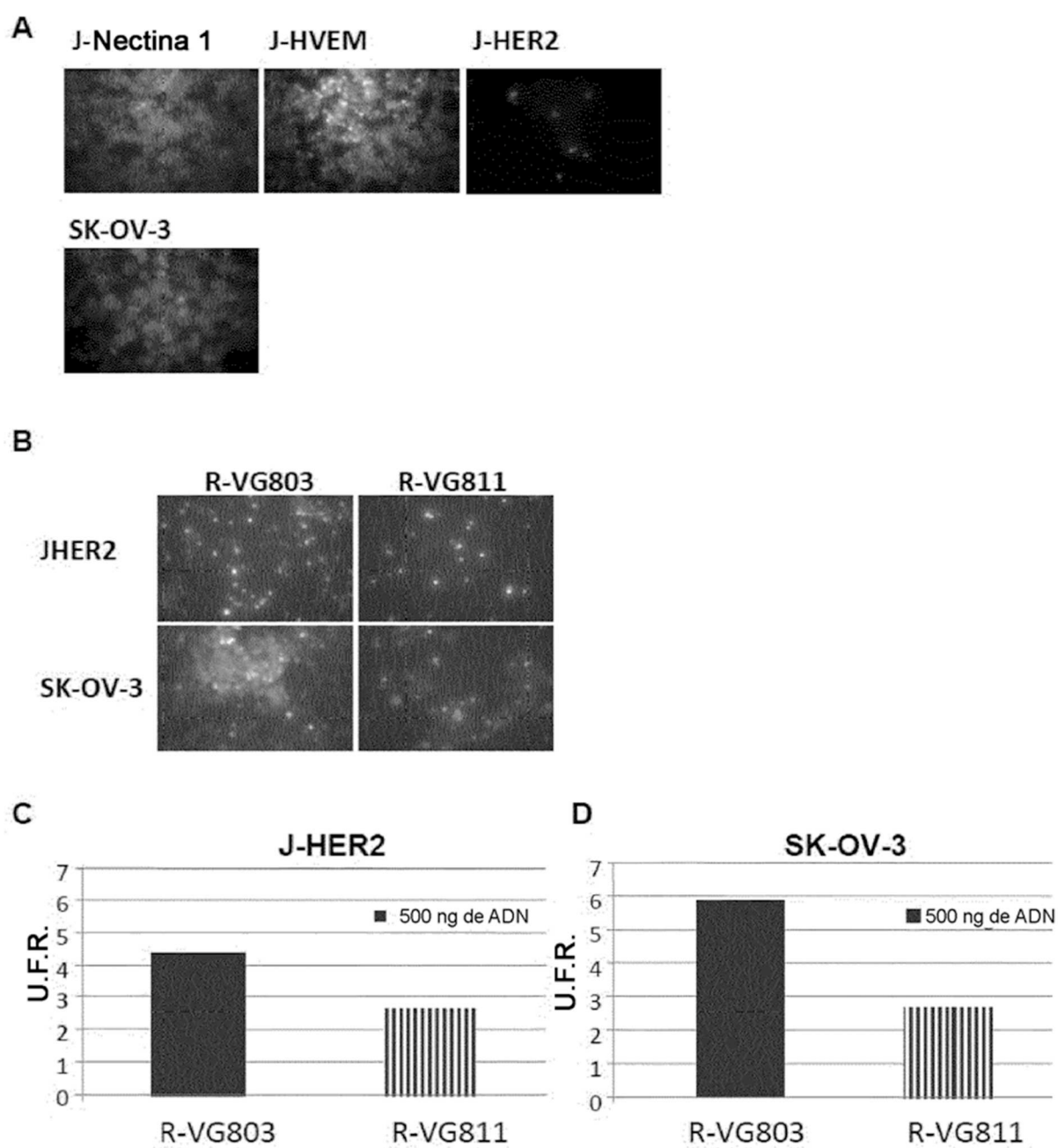


Figura 8

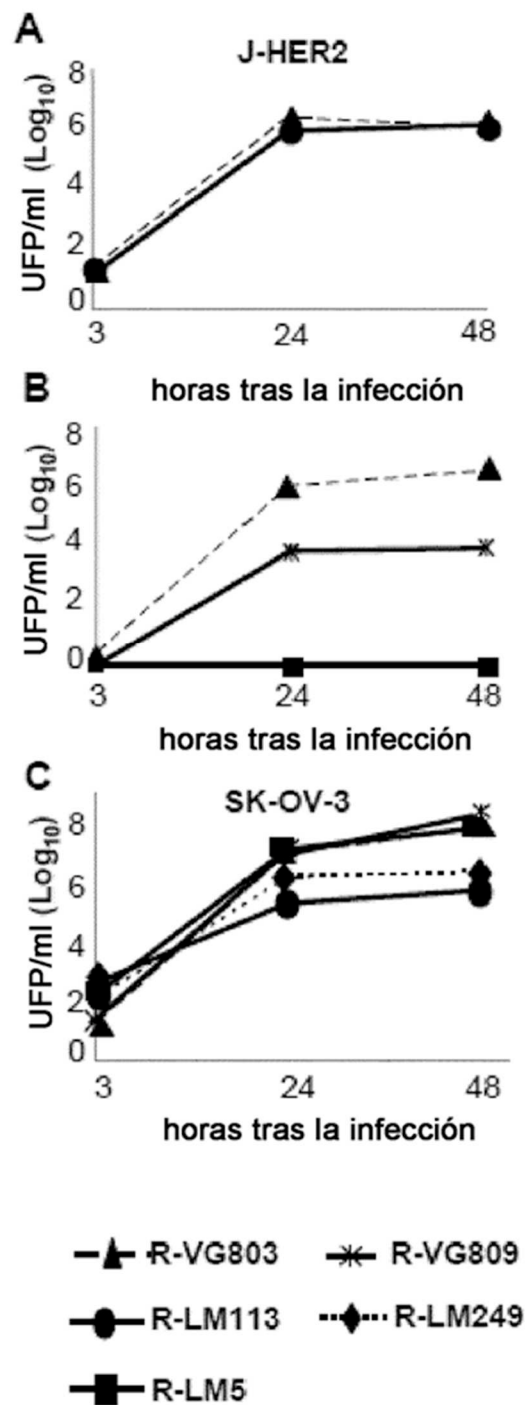
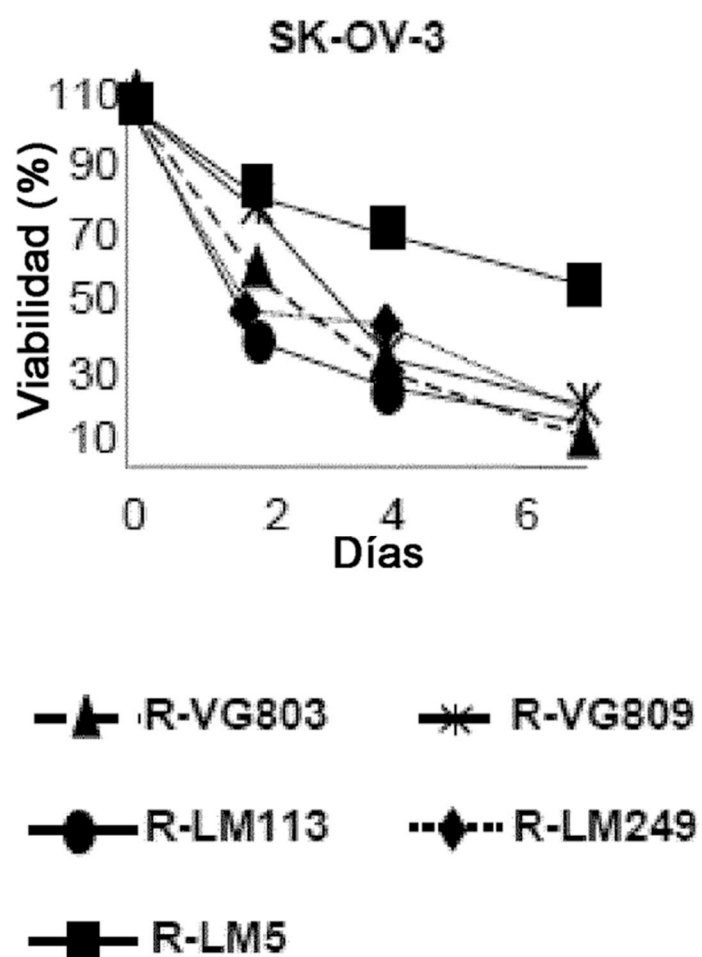


Figura 9



REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Esta lista de referencias citada por el solicitante es únicamente para mayor comodidad del lector. No forman parte del documento de la Patente Europea. Incluso teniendo en cuenta que la compilación de las referencias se ha efectuado con gran cuidado, los errores u omisiones no pueden descartarse; la EPO se exime de toda responsabilidad al respecto.

Documentos de patentes citados en la descripción

- WO 2009013448 A
- EP 15425012

Literatura no patente citada en la descripción

- **CAIRNS et al.** *Journal of Virology*, June 2003, vol. 77 (12), 6731-6742
- A multilingual glossary of biotechnological terms: (IUPAC Recommendations). Helvetica Chimica Acta. 1995
- **SANDRI-GOLDIN et al.** Alpha Herpesviruses: Molecular and Cellular Biology. Caister Academic Press, 2006
- **CHOWDARY et al.** *Nat Struct Mol Biol*, 2010, vol. 17, 882-888
- **BACKOVIC et al.** *PNAS*, 2012, vol. 107 (52), 22635-22640
- **MATSUURA et al.** *PNAS*, 2010, vol. 107 (52), 22641-22646
- **GIANNI T; SALVIOLI S; CHESNOKOVA LS; HUTT-FLETCHER LM; CAMPADELLI-FIUME G.** *PLoS Pathog*, 2013, vol. 9 (12), e1003806
- **CASTOLDI et al.** *Oncogene*, 12 December 2013, vol. 32 (50), 5593-601
- **CASTOLDI et al.** *Protein Eng Des Sel.*, October 2012, vol. 25 (10), 551-9
- **JOSAN et al.** *Bioconjug Chem.*, 2011, vol. 22 (7), 1270-1278
- **XU et al.** *PNAS*, 2012, vol. 109 (52), 21295-21300
- **SHALLAL et al.** *Bioconjug Chem.*, 2014, vol. 25 (2), 393-405
- **YANG et al.** *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 2011, vol. 1 (3), 143-159
- **PETERSON et al.** *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.*, 1988, vol. 11 (2), 93-8
- **ATANASIU et al.** *MBio.*, 26 February 2013, vol. 4 (2)