

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 972 406**

51 Int. Cl.:

A61K 38/17 (2006.01)

A61K 38/20 (2006.01)

C07K 14/035 (2006.01)

C07K 14/54 (2006.01)

C12N 15/869 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.08.2017 PCT/US2017/044993**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.02.2018 WO18026872**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.08.2017 E 17837576 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.11.2023 EP 3490583**

54 Título: **Vectores del virus oncolítico del herpes simple que expresan moléculas estimuladoras del sistema inmunitario**

30 Prioridad:
01.08.2016 US 201662369646 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.06.2024

73 Titular/es:
**VIROGIN BIOTECH CANADA LTD (100.0%)
150-13511 Commerce Parkway
Richmond, BC V6V 2J8, CA**

72 Inventor/es:
**JIA, WILLIAM;
LIU, GUOYU;
LEE, ERICA;
CHOULJENKO, DMITRY y
DING, JUN**

74 Agente/Representante:
ELZABURU, S.L.P

ES 2 972 406 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

Vectores del virus oncolítico del herpes simple que expresan moléculas estimuladoras del sistema inmunitario

CAMPO DE LA INVENCIÓN

5 La presente invención se refiere en general a vectores oncolíticos del virus del herpes simple (oHSV) que expresan moléculas que estimulan el sistema inmunológico.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

10 Los virus oncolíticos (OVs) han sido un arsenal terapéutico para destruir específicamente las células cancerosas mediante la oncólisis, que es un mecanismo de destrucción caracterizado por la lisis de las células cancerosas durante el curso de la replicación lítica del virus. Además de la destrucción celular directa por parte del virus. Entre los diversos OVs, los OVs basados en el virus del herpes simple tipo 1 ("HSV-1") son los más avanzados, por ejemplo, la FDA de U.S. ha aprobado un OV basado en el virus del herpes (T-Vec) para el tratamiento del melanoma. Los ejemplos representativos de vectores HSV incluyen los descritos en los documentos de Patente US Patent Nos. 7,223,593, 7,537,924, 7,063,835, 7,063,851, 7,118,755, 8,277,818, y 8,680,068.

15 La presente invención supera las deficiencias de los virus oncolíticos comerciales actuales y proporciona además beneficios inesperados adicionales. Cualquier referencia a métodos de tratamiento a lo largo de la solicitud debe interpretarse como referencias a compuestos, composiciones farmacéuticas y medicamentos de la presente invención para su uso en un método para el tratamiento del cuerpo humano (o animal) mediante terapia (o para diagnóstico).

COMPENDIO

20 La invención se define en las reivindicaciones. En pocas palabras, la divulgación se refiere a un vector oncolítico de HSV que comprende uno o más casetes de expresión para IL12, IL15 y/o una subunidad alfa del receptor de IL15. En una realización, uno o más casetes de expresión expresan todos de IL12, IL15 y la subunidad alfa del receptor de IL15. En realizaciones preferidas, el casete de expresión expresa IL12 murina o humana, IL15 murina o humana y la subunidad alfa del receptor de IL15 murino o humano. En otras realizaciones más, el casete de expresión expresa IL12, hIL15, murina o humana, y la subunidad alfa del receptor h15 y murino.

25 En una realización, el casete de expresión expresa todos de IL12, IL15 y la subunidad alfa del receptor de IL15. En una realización, el casete de expresión comprende mL12, hIL15 y la subunidad alfa del receptor de hIL15. En otras realizaciones, el casete de expresión comprende hIL12, hIL15 y la subunidad alfa del receptor de hIL15. En determinadas realizaciones, la secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido 2A autoescindible está situada en el marco entre las secuencias codificantes mL12, hIL15 y la subunidad alfa del receptor de hIL15. En otras realizaciones, el vector HSV codifica un péptido 2A autoescindible. En otras realizaciones, la una o más secuencias de IRES se localizan entre las secuencias codificantes para IL12, hIL15 y la subunidad alfa del receptor de hIL15 murina o humana. En realizaciones, la hIL15 y la subunidad alfa del receptor de hIL15 se co-expresan usando una secuencia de IRES, y en determinadas realizaciones, hIL15 y la subunidad alfa del receptor de hIL15 se expresan mediante un promotor bidireccional, que puede ser bi-CMV en algunas realizaciones. En otras realizaciones más, cada una de hIL15 y la subunidad alfa del receptor de hIL15 está seguida por una secuencia de ácido nucleico que codifica Lys5 o Glu5. En determinadas realizaciones, la subunidad alfa del receptor hIL15 se selecciona del grupo que consiste en la variante 1, la variante 2, la variante 3 y la variante 4.

40 El vector puede comprender además un casete de expresión para uno o más péptidos bloqueantes de PD-L1, puede comprender además una secuencia que codifica un enlazador peptídico o una o más secuencias de IRES (o ambas) entre múltiples péptidos bloqueantes de PD-L1. En algunas realizaciones, el vector HSV puede comprender además una secuencia que codifica un dominio Fc unido al extremo 3' del péptido bloqueante de PD-L1. En otras realizaciones más, los péptidos bloqueantes de PD-L1 se insertan entre los genes virales UL3 y UL4.

45 En determinadas realizaciones, el casete de expresión se inserta en la región de repetición terminal del genoma de HSV. En realizaciones, el vector HSV comprende además un elemento potenciador de NFkB y OCT4/SOX2 en las regiones reguladoras ICP4 o ICP27. El vector HSV puede tener una eliminación de los genes de ICP34.5. En otras realizaciones, el gen de ICP34.5 está regulado por una 3'UTR que contiene secuencias objetivo de miRNAs que están infraexpresadas en células tumorales.

El casete de expresión puede comprender al menos un promotor de CMV bidireccional. Puede comprender al menos un promotor celular.

50 En algunas realizaciones, el casete de expresión para mL12/hIL15/la subunidad alfa del receptor de hIL15 se inserta en la región de repetición terminal donde la secuencia viral original se sustituye por el casete.

El vector HSV puede ser HSV-1 o HSV-2.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

- Las características ejemplares de la presente divulgación, su naturaleza y diversas ventajas serán evidentes a partir de los dibujos adjuntos y la siguiente descripción detallada de diversas realizaciones. Se describen realizaciones no limitantes y no exhaustivas con referencia a los dibujos adjuntos, en donde etiquetas o números de referencia similares se refieren a partes similares en las diversas vistas, a menos que se especifique lo contrario. Los tamaños y posiciones relativas de los elementos en los dibujos no están necesariamente dibujados a escala. Por ejemplo, las formas de varios elementos se seleccionan, amplían y colocan para mejorar la legibilidad del dibujo. Las formas particulares de los elementos dibujados se han seleccionado para facilitar su reconocimiento en los dibujos. Una o más realizaciones se describen a continuación con referencia a los dibujos adjuntos en donde:
- 5 Las Figuras 1A y 1B son esquemas de vectores oHSV ejemplares.
- La Figura 2 muestra un esquema de la región de ICP34.5 modificada (SEQ ID NO: 572) para el virus hVG161.
- La Figura 3 muestra un esquema de una región promotora de UL54 modificada (SEQ ID NO: 573) para el virus hVG161.
- 15 La Figura 4 muestra un esquema del genoma viral de hVG161 con una inserción de un bloqueante de PD-L1 (SEQ ID NO: 574).
- La Figura 5 muestra un esquema de la región de TR modificada con hVG161 (SEQ ID NO: 575).
- Las Figuras 6A-6C muestran los datos de ELISA y transferencia de Western para la expresión de IL-12 después de la infección de células con hVG161.
- 20 Las Figuras 7A-7C muestran los datos de ELISA y de transferencia Western para la expresión de IL-15 después de la infección de células con hVG161.
- Las Figuras 8A-8C muestran los datos de ELISA y transferencia de Western para la expresión de IgG4 después de la infección de células con hVG161.
- Las Figuras 9A-9C son (A) un esquema de un constructo ejemplar en donde el promotor bi-CMV dirige la expresión del dominio Sushi de IL-15R α e IL-15, y (B-C) una secuencia y esquema de DNA (SEQ ID No: 557).
- 25 Las Figuras 10A-10C son (A) un esquema de un constructo ejemplar en donde el promotor bi-CMV dirige la expresión de IL-15 y la variante 4 de IL-15R α 4, y (B-C) una secuencia y esquema de DNA (SEQ ID No: 558).
- Las Figuras 11A-11C son (A) un esquema de un constructo ejemplar en donde el promotor bi-CMV dirige la expresión de IL-15-K5 y dominio Sushi-E5 de IL-15R α , y (B-C) una secuencia y esquema de DNA (SEQ ID No. : 559).
- 30 Las Figuras 12A-12D son (A) un esquema de un constructo ejemplar en donde el promotor bi-CMV dirige la expresión de IL-15-K5 y variante 4-E5 de IL-15R α , y (B-D) una secuencia y esquema de DNA (SEQ ID No. : 560).
- Las Figuras 13A-13D son (A) un esquema de un constructo ejemplar en donde el promotor EF1 α controla la expresión del dominio Sushi de IL-15-IRES-IL-15R α , y (B-D) una secuencia y esquema de DNA (SEQ ID No: 561).
- Las Figuras 14A-14D son (A) un esquema de un constructo ejemplar en donde el promotor EF1 α controla la expresión de la variante 4 de IL-15-IRES-IL-15R α , y (B-D) una secuencia y esquema de DNA (SEQ ID No: 562).
- 35 Las Figuras 15A-15D son (A) un esquema de un constructo ejemplar en donde el promotor EF1 α controla la expresión del dominio Sushi E5 de IL-15K5-IRES-IL-15R α , y (B-D) una secuencia y esquema de DNA (SEQ ID No: 563).
- Las Figuras 16A-16D son (A) un esquema de un constructo ejemplar en donde el promotor EF1 α controla la expresión de la variante 4E5 de IL-15K5-IRES-IL-15R α , y (B-D) una secuencia y esquema de DNA (SEQ ID No: 564).
- 40 Las Figuras 17A-17E son (A) un esquema de un constructo ejemplar en donde el promotor CMV controla la expresión del dominio Sushi de IL-12-p2A-IL-15-p2A-IL-15R α , y (B-E) una secuencia y esquema de DNA (SEQ ID No: 565).
- Las Figuras 18A-18E son (A) un esquema de un constructo ejemplar en donde el promotor CMV controla la expresión de la variante 1 de IL-12-p2A-IL-15-p2A-IL-15R α , y (B-E) una secuencia y esquema de DNA (SEQ ID No: 566).
- 45 Las Figuras 19A-19D son (A) un esquema de un constructo ejemplar en donde el promotor CMV controla la expresión del dominio Sushi E5 de IL-12-p2A-IL-15K5-p2A-IL-15R α , y (B-D) una secuencia y esquema de DNA (SEQ ID No: 567).
- Las Figuras 20A-20D son (A) un esquema de un constructo ejemplar en donde el promotor CMV controla la expresión de la variante 1-E5 de IL-12-p2A-IL-15K5-p2A-IL-15R α , y (B-D) una secuencia y esquema de DNA (SEQ ID No: 568).

La Figura 21 es un gráfico que muestra el porcentaje de inhibición de la unión de PD-L1 a PD-1 mediante péptidos bloqueantes.

Las Figuras 22A-22D muestran el efecto de los péptidos inhibidores de PD-L1 sobre la citotoxicidad de las células objetivo por las células mononucleares de sangre periférica humana estimuladas con anti-CD3.

- 5 Las Figuras 23A y 24B muestran los efectos de IL-12 sola, IL-15R α sola e IL-12 y 1L-15R α juntos sobre la producción de IFN γ y TNF α en células mononucleares de sangre periférica humana.

Las Figuras 24A y 24B muestran los efectos de IL-12 e IL-15R α sobre la citotoxicidad de células tumorales U87 y MDA-MB-231 por células mononucleares de sangre periférica.

Las Figuras 25A-25E muestran los resultados de infección celular con VG161-PLBh y VG161-15h.

- 10 Las Figuras 26A-26D muestran resultados de ensayos *in vitro* para diversos constructos. Las Figuras 15A-15B muestran los resultados de la transfección celular con plásmido IL-TF-Fc que lleva IL-12, IL-15 y bloqueante de PD-L1. Las Figuras 15C-15D muestran los resultados de la infección celular con una variedad de virus mutantes incluyendo hVG161.

- 15 Las Figuras 27A-27E muestran los resultados de ensayos de viabilidad celular para hVG161 y HSV-345 en líneas de células tumorales humanas y línea de células Vero.

Las Figuras 28A-28J muestran los resultados de ensayos *in vitro* para diversos constructos. Las Figuras 28A-28E muestran los resultados de ensayos de viabilidad celular para mVG161 y HSV-345 en líneas de células tumorales de ratón y línea de células Vero; las Figuras 28F-28J muestran la caracterización de la expresión transgénica después de la infección con mVG161 o VG001 de células tumorales de ratón CT26.

- 20 Las Figuras 29A-29E muestran resultados de la caracterización *in vitro* de la expresión transgénica después de la infección con hVG161 o VG001 de diversas líneas celulares.

Las Figuras 30A-30G muestran los resultados de ensayos para evaluar la capacidad de hVG161 para destruir una variedad de células cancerosas humanas *in vitro*.

Las Figuras 31A-31G muestran los resultados de ensayos *in vivo* para los constructos mVG161 y hVG161.

- 25 Las Figuras 32A-32C muestran las curvas de crecimiento para diferentes virus en tres líneas celulares humanas diferentes.

Las Figuras 33A-33D muestran las curvas de crecimiento de mVG161 y HSV-345 en líneas de células tumorales de ratón y línea de células Vero.

- 30 Las Figuras 34A-34E muestran las curvas de crecimiento de hVG161 y HSV-345 en líneas de células tumorales humanas y línea de células Vero.

Las Figuras 35A-35D muestran los efectos de las modificaciones del virus.

Las Figuras 36A-36D proporcionan los datos de eficacia *in vitro*.

Las Figuras 37A y 37B proporcionan datos *in vivo*.

Las Figuras 38A-38C proporcionan datos sobre el efecto de VG161m en la respuesta inmune.

- 35 **DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION**

La invención se define en las reivindicaciones. La presente divulgación puede entenderse más fácilmente haciendo referencia a la siguiente descripción detallada de realizaciones preferidas de la invención y los Ejemplos incluidos en la presente memoria.

COMPENDIO DE LA DIVULGACIÓN

- 40 La presente invención puede entenderse más fácilmente haciendo referencia a la siguiente descripción detallada de realizaciones preferidas de la invención y los Ejemplos incluidos en la presente memoria. Brevemente, la presente divulgación proporciona vectores oncolíticos del virus del herpes simple tipo 1 o 2 que expresan moléculas inmunoestimulantes. Los vectores representativos comprenden uno o más casetes de expresión que codifican IL-12, IL-15 e IL-15R α . Determinados vectores codifican IL-12 murina o humana, IL-15 murina o humana e IL-15R α murina o humana. En determinadas realizaciones, los vectores codifican IL-12, hIL15 y la subunidad alfa del receptor hIL15 murino o humano. En otras realizaciones, los vectores codifican hIL-12, hIL15 y la subunidad alfa del receptor hIL15. Las tres proteínas pueden expresarse en uno, dos o tres transcritos. Cuando se expresa en el mismo transcrito, se produce un procesamiento postranscripcional que da como resultado la expresión de las proteínas individuales. En tal caso, las regiones codificantes están separadas por secuencias de IRES o secuencias que codifican péptidos 2A
- 45

autoescindibles. Las regiones codificantes pueden expresarse mediante un promotor bidireccional. El vector HSV expresa opcionalmente uno o más péptidos PD-L1 que pueden secretarse.

A. Vector oHSV

5 Un virus oncolítico es un virus que lisará células cancerosas (oncólisis), preferiblemente de manera selectiva. Los virus que se replican selectivamente en células en división sobre células que no se dividen son a menudo oncolíticos. Los virus oncolíticos adecuados para su uso en la presente memoria incluyen los virus del herpes simple 1 y 2.

10 Los virus del herpes simple (HSV) 1 y 2 son miembros de la familia Herpesviridae que infectan a los humanos. El genoma del HSV contiene dos regiones únicas, que se denominan regiones únicas largas (UL) y únicas cortas (US). Cada una de estas regiones está flanqueada por un par de secuencias de repetición terminales invertidas. Hay aproximadamente 75 marcos de lectura abiertos conocidos. El genoma viral se ha diseñado para desarrollar virus oncolíticos para su uso, por ejemplo, en la terapia contra el cáncer. La replicación selectiva del tumor del HSV puede conferirse mediante la mutación del gen ICP34.5 de HSV (también denominado γ 34.5). HSV contiene dos copias de ICP34.5. Se sabe que los mutantes que inactivan una o ambas copias del gen ICP34.5 carecen de neurovirulencia, es decir, son avirulentos/no neurovirulentos y son oncolíticos.

15 El HSV oncolítico adecuado puede derivarse de HSV-1 o HSV-2, incluyendo cualquier cepa de laboratorio o aislado clínico. En algunas realizaciones, el oHSV puede ser o puede derivarse de una de las cepas de laboratorio cepa 17 de HSV-1, cepa F de HSV-1 o cepa HG52 de HSV-2. En otras realizaciones, puede ser de o derivar de la cepa JS-1 que no es de laboratorio. Otros virus HSV-1 adecuados incluyen HrrR3 (Goldsten and Weller, J. Virol. 62, 196-205, 1988), G2O7 (Mineta et al. Nature Medicine. 1(9):938-943, 1995; Kooby et al. The FASEB Journal, 13(11):1325-1334, 1999); G47Delta (Todo et al. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2001; 98(11):6396-6401); HSV 1716 (Mace et al. Head & Neck, 2008; 30(8):1045-1051; Harrow et al. Gene Therapy. 2004; 11(22):1648-1658); HF10 (Nakao et al. Cancer Gene Therapy. 2011; 18(3):167-175); NV1020 (Fong et al. Molecular Therapy, 2009; 17(2):389-394); T-VEC (Andtbacka et al. Journal of Clinical Oncology, 2015; 33(25):2780-8); J100 (Gastón et al. PloS one, 2013; 8(11):e81768); M002 (Parker et al. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2000; 97(5):2208-2213); 20 NV1042(Passer et al. Cancer Gene Therapy. 2013; 20(1):17-24); G2O7-IL2 (Carew et al. Molecular Therapy, 2001; 4(3):250-256); rQNestin34.5 (Kambara et al. Cancer Research, 2005; 65(7):2832-2839); G47 Δ -mIL-18 (Fukuhara et al. Cancer Research, 2005; 65(23):10663-10668); y aquellos vectores que se describen en la solicitudes de Patente PCT applications PCT/US2017/030308 titulada "HSV Vectors with Enhanced Replication in Cancer Cells", y PCT/US2017/018539 titulada "Compositions and Methods of Using Stat1/3 Inhibitors with Oncolytic Herpes Virus".

30 El vector oHSV puede tener modificaciones, mutaciones o eliminaciones de al menos un gen γ 34.5. El vector carece de genes γ 34.5 intactos. En algunas realizaciones, ambos genes se eliminan, mutan o modifican. En otras realizaciones, uno está eliminado y el otro está mutado o modificado. Cualquiera de los genes γ 34.5 nativos puede eliminarse. En una realización, se elimina la repetición terminal, que comprende el gen γ 34.5 y el gen ICP4. Las mutaciones, tales como las alteraciones, inserciones y eliminaciones de nucleótidos hacen que el gen sea inexpressable o el producto inactivo. El gen γ 34.5 puede modificarse con secuencias objetivo de miRNA en su 3'UTR. Las secuencias objetivo se unen a miRNA que se expresan a niveles más bajos en las células tumorales que en sus homólogos normales. En algunas realizaciones, los genes γ 34.5 modificados o mutados se construyen *in vitro* y se insertan en el vector oHSV como sustitutos del gen(s) viral(es). Cuando el gen γ 34.5 modificado o mutado es un sustituto de solo un gen γ 34.5, se elimina el otro γ 34.5. El gen γ 34.5 puede comprender cambios adicionales, tales como tener un promotor exógeno.

35 El oHSV puede tener mutaciones adicionales, que pueden incluir mutaciones incapacitantes (por ejemplo, eliminaciones, sustituciones, inserciones), que pueden afectar la virulencia del virus o su capacidad de replicarse. Por ejemplo, se pueden realizar mutaciones en uno cualquiera o más de ICP6, ICPO, ICP4, ICP27, ICP47, ICP 24, ICP56. Preferiblemente, una mutación en uno de estos genes (opcionalmente en ambas copias del gen cuando sea apropiado) conduce a una incapacidad (o reducción de la capacidad) del HSV para expresar el polipéptido funcional correspondiente. En algunas realizaciones, el promotor de un gen viral puede sustituirse con un promotor que sea selectivamente activo en células objetivo o inducible tras la administración de un inductor o inducible tras un suceso celular o entorno particular. En realizaciones particulares, un promotor específico de tumor impulsa la expresión de genes virales esenciales para la replicación del HSV. En determinadas realizaciones, la expresión de ICP4 o ICP27 o 40 ambos está controlada por un promotor exógeno, por ejemplo, un promotor específico del tumor. Los promotores específicos de tumores ejemplares incluyen survivina o telomerasa; otros promotores específicos de tumores adecuados pueden ser específicos de un único tipo de tumor y son conocidos en la técnica. Otros elementos pueden estar presentes. En algunos casos, está presente un potenciador tal como el potenciador NF- κ B/OCT4/SOX2, por ejemplo en las regiones reguladoras de ICP4 o ICP27 o ambas. Además, la 5'UTR puede ser exógena, tal como una 5'UTR de genes de factores de crecimiento tales como el FGF.

55 El oHSV también puede tener genes y secuencias de nucleótidos que no son de origen del HSV. Por ejemplo, una secuencia que codifica un profármaco, una secuencia que codifica una citocina u otro factor inmunoestimulante, un promotor específico del tumor, un promotor inducible, un potenciador, una secuencia homóloga a una célula huésped, entre otros, pueden estar en el genoma de oHSV. Secuencias ejemplares codifican IL12, IL15, OX40L, un bloqueante de PD-L1 o un bloqueante de PD-1. Para las secuencias que codifican un producto, están unidas operativamente a 60

una secuencia promotora y otras secuencias reguladoras (por ejemplo, potenciador, secuencia señal de poliadenilación) necesarias o deseables para la expresión.

La región reguladora de los genes virales puede modificarse para comprender elementos de respuesta que afecten a la expresión. Los elementos de respuesta ejemplares incluyen elementos de respuesta para NF- κ B, Oct-3/4-SOX2, potenciadores, silenciadores, elementos de respuesta de cAMP, secuencias de unión potenciadoras de CAAT y aislantes. También se pueden incluir otros elementos de respuesta. Un promotor viral puede sustituirse con un promotor diferente. La elección del promotor dependerá de una serie de factores, tales como el uso propuesto del vector HSV, el tratamiento del paciente, el estado o condición de la enfermedad y la facilidad de aplicar un inductor (para un promotor inducible). Para el tratamiento del cáncer, generalmente cuando se sustituye un promotor será con un promotor específico de la célula, específico del tejido o específico del tumor. Se conocen en la técnica promotores específicos de tumores, específicos de células y específicos de tejidos. También se pueden modificar otros elementos genéticos. Por ejemplo, la 5'UTR del gen viral puede sustituirse por una UTR exógena.

B. Moléculas inmunoestimulantes

El vector oHSV comprende secuencias de ácido nucleico que codifican una o más moléculas inmunoestimulantes (por ejemplo, IL-12, IL-15 e IL-15R α). Las secuencias de aminoácidos de IL-12, IL-15 e IL-15R α ejemplares se presentan en el Listado de secuencias (SEQ ID NOs: 1-6). Cualquier secuencia de DNA que codifique la secuencia de aminoácidos es adecuada, aunque generalmente se elegirán codones para la expresión preferencial en las especies en cuestión programadas para recibir el oHSV.

1. IL-12

La interleucina 12 (IL-12) es producida principalmente por células dendríticas, macrófagos y monocitos en respuesta a bacterias (por ejemplo, lipopolisacáridos), patógenos o células T activadas. La IL-12 puede inducir la producción de IFN gamma, la proliferación celular y activar las células asesinas naturales y las células T. También es fundamental para la diferenciación de células T en células Th1. La IL-12 también puede suprimir el crecimiento tumoral. La IL-12 murina es igualmente activa tanto para células murinas como humanas, y cualquiera de ellas es adecuada para su uso en el vector oHSV.

La IL-12 biológicamente activa es una molécula heterodimérica compuesta por una subunidad de 35 kDa (p35) y una de 40 kDa (p40) que están unidas covalentemente por un puente disulfuro. Es necesaria la expresión simultánea de las dos subunidades para producir el heterodímero. En el vector oHSV, la expresión de IL-12 se puede lograr de diversas formas. Las dos subunidades pueden expresarse en constructos separados, cada uno con un promotor, o expresarse en un constructo a partir de un promotor bidireccional, o expresarse a partir de un constructo con elementos tales como IRES o péptidos autoescindibles entre las regiones codificantes. Alternativamente, las subunidades se pueden expresar como una cadena única. Por ejemplo, se puede producir una proteína de fusión de IL-12 monocatenaria funcional uniendo las regiones codificantes para p40 y p35 con enlazadores, normalmente compuestos de Ser o Gly o una combinación de Ser y Gly, tal como Ser₅, (Gly₄Ser)₃ o Gly₆Ser (por ejemplo, Lieschke et al. Nature Biotechnology 15:35, 1997; Lode et al. PNAS 95:2475, 1998; véase también el documento de Patente WO 2015/095249 para un constructo de fusión alternativo). La secuencia y longitud de los enlazadores generalmente se eligen para permitir la máxima flexibilidad de los dominios (Chen et al, Adv Drug Deliv Rev. 65: 1357, 2013). Se puede utilizar un programa informático para elegir la secuencia del enlazador. Uno de dichos programas se llama LINKER (Crauto and Feng, Protein Eng Design & Selection 13:309). Una IL-12 monocatenaria ejemplar tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1. Se pueden realizar sustituciones, inserciones y eliminaciones de aminoácidos siempre que la IL-12 conserve su función.

2. IL-15

IL-15 es una citocina que regula la activación y proliferación de las células asesinas naturales y de las células T y puede tener otras actividades biológicas. Existen al menos dos isoformas que se diferencian en la secuencia del péptido señal y tienen secuencias de proteínas maduras idénticas. La secuencia de la isoforma con el péptido señal más largo (a veces denominado LSP-IL15) tiene el número de acceso de GenBank (NCBI) NP 000576, y el que tiene el péptido señal más corto (a veces denominado SSP-IL15) tiene el número de acceso NP 751915. Cualquiera de las isoformas es adecuada para su uso en el vector oHSV. Las inserciones, eliminaciones y sustituciones de aminoácidos, tales como las que se encuentran en los polimorfismos, pueden estar presentes siempre que la proteína se una a la IL-15.

En algunas realizaciones, IL-15 e IL-15R α tienen cada una un péptido C-terminal que son bobinas enrolladas que se dimerizarán selectivamente. Se han enseñado varios péptidos adecuados (véase, por ejemplo, Tripet et al. Protein Engineering 9:1029, 1996; Aronsson et al, Sci Rep 5:14063, 2015). Normalmente, la secuencia de aminoácidos de las bobinas enrolladas tiene una repetición heptada de residuos hidrofóbicos (**h**) y polares (**p**) en un patrón **hpphppp**. Dos bobinas enrolladas ejemplares son la bobina K (KVSALKE, SEQ ID NO. 7) y la bobina E (EVSALKEK, SEQ ID NO. 8). Generalmente se utilizan de 3 a 6 copias en tándem. En algunas realizaciones de la presente memoria, se utilizan 5 copias en tándem de cada una. K5 (KVSALKEKVSALKEKVSALKEKVSALKEKVSALKE, SEQ ID NO. 9) y E5 (EVSALKEKEVSALKEKEVSALKEKEVSALKEKEVSALKEK, SEQ ID NO. 10). La bobina K y la bobina E se diseñaron para

tener cargas opuestas, así IL-15 se fusiona con una bobina enrollada e IL-15R α se fusiona con una bobina enrollada con carga opuesta. Un dominio Sushi ejemplar fusionado con E5 se muestra en SEQ ID NO: 12, una variante 4 de IL-15R α ejemplar fusionada con E5 se muestra en SEQ ID NO: 13, una variante 1 de IL-15R α ejemplar fusionada con E5 se muestra en SEQ ID NO: 14, y una IL-15 ejemplar fusionada a K5 se muestra en SEQ ID NO: 15.

5 3. Subunidad IL-15R α

La subunidad alfa del receptor de interleucina-15 (IL-15R α) es una de las tres subunidades del complejo que se une a la IL-15. La subunidad alfa se une a la IL-15 con alta afinidad y puede unirse a ella independientemente de las otras subunidades. Existen al menos cuatro variantes (isoformas), en la presente memoria denominadas variante 1 (NP 002180.1) (SEQ ID NO: 3); variante 2 (NP 751950.2) (SEQ ID NO: 4); variante 3 (NP 001230468.1) (SEQ ID NO: 5); y variante 4 (NP_001243694) (SEQ ID NO: 6). La subunidad alfa contiene un dominio Sushi (también conocido como proteína de control del complemento (CCP), repeticiones de consenso cortas (SCRs) o repeticiones SUSHI) que es la región más corta que conserva la actividad de unión a IL-15. Un dominio Sushi típico tiene aproximadamente de 60 a 70 aminoácidos y contiene cuatro cisteínas que forman dos enlaces disulfuro y es un motivo común en las interacciones proteína-proteína. El dominio Sushi de IL-15R α abarca del residuo 31 al aproximadamente 95 (en referencia a la variante 1) (SEQ ID NO: 11). Se conoce la localización del dominio Sushi en las demás variantes. La sustitución de aminoácidos de cualquiera de las cisteínas en sIL-15R α elimina su capacidad para inhibir la inflamación aguda y la respuesta de las células T a antígenos alogénicos in vivo (Wei et al. J Immunol. 167:277, 2001).

El vector oHSV comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica IL-15R α , una variante de IL-15R α o un dominio Sushi. Generalmente, la proteína se expresa con un péptido líder y, en algunas realizaciones, el péptido líder es de IL-15R α . Se conocen en la técnica otros péptidos líderes. Pueden estar presentes sustituciones de aminoácidos siempre que la proteína se una a la IL-15. Se conocen sustituciones naturales, polimorfismos.

4. Péptido bloqueante de PD-L1

El ligando 1 de muerte programada (PD-L1) desempeña un papel en la supresión del sistema inmunológico, probablemente como un efecto de la unión del receptor de PD-1. Se ha demostrado que bloquear la interacción proteína-proteína mejora la terapia contra el cáncer.

El vector oHSV puede expresar péptidos bloqueantes de PD-L1. Los péptidos adecuados incluyen TAHPSPPRSAGQF (SEQ ID NO: 16), EYRMSPSNQT (SEQ ID NO: 17), YYRMSPSNQT (SEQ ID NO: 18), TRYPSPSPKPEGRF (SEQ ID NO: 19) y WNRLSPSNQT (SEQ ID NO: 20). Otros péptidos adecuados incluyen aquellos de la Tabla 4 (SEQ ID NO: 21-500). Generalmente, los péptidos bloqueantes se expresan con una secuencia líder. Las secuencias líderes son bien conocidas en la técnica. Incluyen la secuencia líder de la cadena kappa de inmunoglobulina (METDTLLLWVLLLWVPGSTG; SEQ ID NO: 501) y la secuencia líder de IL-2 (MYRMQLLSIALSLALVTNS; SEQ ID NO: 502). Cuando está presente más de un péptido bloqueante, normalmente los péptidos estarán separados por un péptido enlazador que confiere flexibilidad. Los enlazadores normalmente son ricos en Gly, Ser o Gly/Ser. Se muestran ejemplos de enlazadores adecuados en (SEQ ID NO: 503-519) (véase también, Chichili et al. Protein Science 22: 153, 2013). Puede haber una copia de un péptido, o dos copias, o tres copias o más. Suele haber varias copias en tandem y pueden tener un enlazador entre las copias. Los constructos de péptidos bloqueantes también pueden comprender una secuencia Fc en el extremo C-terminal del péptido, o una secuencia Fc de inmunoglobulina con o sin la región bisagra. Si bien cualquiera de las regiones Fc es adecuada, en general, la Fc será de una de las subclases de IgG, por ejemplo, IgG1 humana, IgG2 humana, IgG3 humana e IgG4 humana o sus homólogos murinos.

C. Organización de elementos

Las moléculas IL-12, IL-15 e IL-15R α pueden estar en una variedad de configuraciones diferentes en el vector oHSV. Por ejemplo, cada una de las moléculas puede expresarse individualmente a partir de una región promotora/reguladora separada o co-expresarse a partir de una o dos regiones promotoras/reguladoras separadas.

En determinadas realizaciones, dos o tres de las moléculas se expresan en un único transcrito a partir de un promotor y sus secuencias codificantes están separadas por secuencias de IRES (sitio de entrada al ribosoma interno). Las regiones IRES atraen un complejo de iniciación de la traducción ribosómica eucariótica y, por lo tanto, permiten el inicio de la traducción en medio de un mRNA e independientemente de la estructura de tapa 5'-terminal comúnmente utilizada. Las secuencias de IRES adecuadas son bien conocidas y muchas se pueden encontrar en la base de datos de IRESite de secuencias de IRES verificadas experimentalmente (véase, por ejemplo, <http://iresite.org/IRESite> web.php?page=browse_plasmids; entrada el 26 de mayo de 2016).

En diversas realizaciones, los tres genes están presentes en cualquier orden y separados por una o más secuencias de IRES. Las secuencias de IRES pueden ser idénticas o no. Pueden estar presentes secuencias adicionales en la unión gen/IRES o en una unión IRES/IRES.

En determinadas realizaciones, dos o tres de las moléculas se expresan en un único transcrito a partir de un promotor y sus secuencias codificantes están separadas por uno o más péptidos 2A autoescindibles. Estos péptidos son cortos (aproximadamente 18-22 aminoácidos) y se insertan en un marco entre secuencias codificantes. Durante la traducción,

los ribosomas omiten la síntesis del enlace peptídico glicilo-prolino en el extremo C-terminal de un péptido 2A, lo que lleva a la escisión entre un péptido 2A y su proteína inmediatamente posterior. Como resultado, producen niveles equimolares de múltiples productos genéticos a partir del mismo mRNA. La "escisión" se produce entre los residuos de gli-pro en el extremo C-terminal, lo que significa que al cistrón anterior se le añadirán residuos adicionales a su extremo C-terminal, mientras que el cistrón posterior comenzará con una prolina. Se muestran secuencias de péptidos p2A ejemplares en las SEQ ID NO: 520-535.

Otro medio para efectuar la co-expresión de las moléculas es utilizar un promotor bidireccional. Los promotores bidireccionales son una característica común del genoma humano (Trinklein et al. *Genome Res* 14:62, 2004). Un promotor bidireccional inicia la transcripción en ambas direcciones y normalmente contiene elementos compartidos que regulan ambos genes. Además de los promotores bidireccionales naturales, se han sintetizado promotores que son bidireccionales. Uno de dichos promotores es bi-CMV. pBI-CMV1 es un vector de expresión bidireccional de mamíferos que permite la expresión constitutiva de dos proteínas de interés. La expresión de proteínas está impulsada por uno de los dos promotores mínimos de citomegalovirus humanos constitutivamente activos, *PminCMV1* y *PminCMV2* en orientaciones opuestas. Una secuencia de DNA ejemplar de un promotor de CMV bidireccional es SEQ ID NO. 536.

El promotor bidireccional (por ejemplo, promotor bi-CMV) se utiliza principalmente para lograr la co-expresión de hIL15 e IL-15R α (o el dominio Sushi). Cuando dos moléculas se co-expresan usando secuencias de IRES o p2A, generalmente serán hIL15 e IL-15R α (o el dominio Sushi). En estos casos, los péptidos bloqueantes de IL-12 y PD-L1 pueden co-expresarse usando un promotor bidireccional o como un transcrito multicistrónico con secuencias de IRES o p2A, o pueden expresarse individualmente a partir de sus propios promotores/regiones reguladoras.

Pueden usarse otros promotores. Son adecuados promotores celulares, promotores virales y similares. Los promotores pueden ser constitutivos o inducibles o específicos de célula/tejido. Muchos promotores son bien conocidos. Un promotor particular que puede resultar útil es el promotor constitutivo EF-1 α .

Las secuencias se ensamblan en uno o más casetes de expresión. Los Ejemplos proporcionan versiones ejemplares de algunos casetes de expresión. El casete de expresión puede insertarse en el genoma del HSV en cualquier localización que no altere funciones críticas (por ejemplo, replicación). En determinadas realizaciones, el casete se inserta en la región de repetición interna o terminal después de eliminar primero la repetición. Otras áreas adecuadas para la inserción incluyen entre genes virales, tales como, por ejemplo, los genes virales UL3 y UL4, los genes UL50 y UL51, y entre US1 y US2.

En determinadas realizaciones, un casete que expresa péptidos bloqueantes de PD-L1 se inserta entre genes virales (por ejemplo, UL3 y UL4, UL50 y UL51 y/o US1 y US2). En otras realizaciones, se inserta un casete que expresa IL-12, IL-15 e IL-15R α en lugar de la región de repetición terminal y se inserta un casete que expresa péptidos de PD-L1 entre los genes UL3 y UL4.

D. Composiciones terapéuticas

Se proporcionan composiciones terapéuticas que pueden usarse para prevenir, tratar o mejorar los efectos de una enfermedad, tal como, por ejemplo, el cáncer. Más particularmente, se proporcionan composiciones terapéuticas que comprenden al menos un virus oncolítico como se describe en la presente memoria. Los ejemplos representativos incluyen un oHSV que tiene un casete de expresión para una o más de IL12, IL15 y/o la subunidad alfa del receptor de IL-15. En una realización, el casete de expresión expresa toda IL12, IL15 y la subunidad alfa del receptor de IL-15. En realizaciones preferidas, el casete de expresión comprende IL12, hIL15 y la unidad alfa del receptor de hIL15 murino o humano.

En determinadas realizaciones, las composiciones comprenderán además un vehículo farmacéuticamente aceptable. La frase "vehículo farmacéuticamente aceptable" pretende abarcar cualquier vehículo, diluyente o excipiente que no interfiera con la eficacia de la actividad biológica del virus oncolítico y que no sea tóxico para el sujeto al que se administra (véase en general Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, Lippincott Williams & Wilkins; 21st ed. (May 1, 2005 y en *The United States Pharmacopoeia: The National Formulary* (USP 40 - NF 35 y Suplementos).

En el caso de un virus oncolítico como se describe en la presente memoria, los ejemplos no limitantes de vehículos farmacéuticos adecuados incluyen soluciones salinas tamponadas con fosfato, agua, emulsiones (tales como emulsiones de aceite/agua), diversos tipos de agentes humectantes, soluciones estériles y otros. Vehículos farmacéuticamente aceptables adicionales incluyen geles, materiales de matriz bioadsorbibles, elementos de implantación que contienen el virus oncolítico o cualquier otro vehículo, medio o material de administración o dispensación adecuado. Dichos vehículos pueden formularse mediante métodos convencionales y pueden administrarse al sujeto en una dosis eficaz. Excipientes farmacéuticamente aceptables adicionales incluyen, pero no se limitan a, agua, solución salina, polietilenglicol, ácido hialurónico y etanol. También se pueden incluir en ellos sales farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, sales de ácidos minerales (tales como clorhidratos, bromhidratos, fosfatos, sulfatos y similares) y sales de ácidos orgánicos (tales como acetatos, propionatos, malonatos, benzoatos y similares). Dichos vehículos, diluyentes y excipientes farmacéuticamente aceptables (de calidad farmacéutica) que

pueden usarse para administrar el oHSV a una célula cancerosa objetivo preferiblemente no inducirán una respuesta inmune en el individuo (sujeto) que recibe la composición (y preferiblemente se administrarán sin toxicidad excesiva).

5 Las composiciones proporcionadas en la presente memoria se pueden proporcionar en una variedad de concentraciones. Por ejemplo, se pueden proporcionar dosis de virus oncolítico que oscilan de aproximadamente 10^6 a aproximadamente 10^9 pfu. En realizaciones adicionales, la forma de dosificación puede variar de aproximadamente 10^6 a aproximadamente 10^8 pfu/ml, inyectándose hasta 4 ml en un paciente con lesiones grandes (por ejemplo, > 5 cm) y cantidades más pequeñas (por ejemplo, hasta 0,1 ml) en pacientes con lesiones pequeñas (por ejemplo, < 0,5 cm) cada 2 - 3 semanas, de tratamiento.

10 En determinadas realizaciones de la invención, se pueden utilizar dosis más bajas que las estándar. Por lo tanto, en ciertas realizaciones se pueden administrar a un paciente menos de aproximadamente 10^6 pfu/ml (inyectándose hasta 4 ml a un paciente cada 2 a 3 semanas).

15 Las composiciones se pueden almacenar a una temperatura que conduzca a una vida útil estable, e incluye temperatura ambiente (aproximadamente 20°C), 4°C , -20°C , -80°C y en N_2 líquido. Debido a que las composiciones destinadas a su uso *in vivo* generalmente no tienen conservantes, el almacenamiento generalmente se realizará a temperaturas más frías. Las composiciones pueden almacenarse secas (por ejemplo, liofilizadas) o en forma líquida.

E. Administración

Además de las composiciones descritas en la presente memoria, se proporcionan diversos métodos para usar dichas composiciones para tratar o mejorar el cáncer, que comprenden la etapa de administrar una dosis o cantidad eficaz de un vector HSV como se describe en la presente memoria a un sujeto.

20 Los términos "dosis eficaz" y "cantidad eficaz" se refieren a cantidades del virus oncolítico que son suficientes para efectuar el tratamiento de un cáncer objetivo, por ejemplo, cantidades que son eficaces para reducir el tamaño o la carga de un tumor objetivo, o de otro modo impedir la tasa de crecimiento de las células tumorales objetivo. Más particularmente, dichos términos se refieren a cantidades de virus oncolítico que son eficaces, en las dosis y períodos de tratamiento necesarios, para lograr un resultado deseado. Por ejemplo, en el contexto del tratamiento de un cáncer, 25 una cantidad eficaz de las composiciones descritas en la presente memoria es una cantidad que induce la remisión, reduce la carga tumoral y/o previene la propagación del tumor o el crecimiento del cáncer. Las cantidades eficaces pueden variar según factores tales como el estado de la enfermedad, la edad, el sexo y el peso del sujeto, así como la formulación farmacéutica, la vía de administración y similares, pero, no obstante, un experto en la técnica puede determinarlas de forma rutinaria.

30 Las composiciones terapéuticas se administran a un sujeto diagnosticado con cáncer o del que se sospecha que tiene cáncer. Los sujetos pueden ser animales humanos o no humanos.

35 Las composiciones se usan para tratar el cáncer. Los términos "tratar" o "que tratan" o "tratamiento", tal y como se usan en la presente memoria, significan un enfoque para obtener resultados beneficiosos o deseados, incluyendo resultados clínicos. Los resultados clínicos beneficiosos o deseados pueden incluir, pero no se limitan a, alivio o mejora de uno o más síntomas o afecciones, disminución de la extensión de la enfermedad, estado estabilizado (es decir, no empeoramiento) de la enfermedad, prevención de la propagación de la enfermedad, retraso o desaceleración de la progresión de la enfermedad, mejora o paliación del estado de la enfermedad, disminución de la recurrencia de la enfermedad y remisión (ya sea parcial o total), ya sea detectable o indetectable. Los términos "que trata" y "tratamiento" 40 también pueden significar prolongar la supervivencia en comparación con la supervivencia esperada si no se recibe tratamiento.

45 Las formas representativas de cáncer incluyen carcinomas, leucemias, linfomas, mielomas y sarcomas. Otros ejemplos incluyen, pero no se limitan a, cáncer de vías biliares, cáncer de cerebro (por ejemplo, glioblastoma), mama, cuello uterino, colorrectal, del sistema nervioso central CNS (por ejemplo, neuroma acústico, astrocitoma, craneofaringioma, ependimoma, glioblastoma, hemangioblastoma, meduloblastoma, menangioma, neuroblastoma, oligodendroglioma, pinealoma y retinoblastoma), revestimiento endometrial, células hematopoyéticas (por ejemplo, leucemia y linfomas), riñón, laringe, pulmón, hígado, cavidad oral, ovarios, páncreas, próstata, piel (por ejemplo, melanoma y carcinoma de células escamosas) y tiroides. Los cánceres pueden comprender tumores sólidos (por ejemplo, sarcomas tales como fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma y sarcoma osteogénico), ser 50 difuso (por ejemplo, leucemia), o alguna combinación de estos (por ejemplo, un cáncer metastásico que tiene tanto tumores sólidos como células cancerosas diseminadas o difusas). Los cánceres también pueden ser resistentes al tratamiento convencional (por ejemplo, quimioterapia convencional y/o radioterapia).

También se pueden tratar tumores benignos y otras afecciones de proliferación de células no deseadas.

55 El oHSV como se describe en la presente memoria puede administrarse mediante una vía que es, por ejemplo, oral, tópica, parenteral, sistémica, intravenosa, intramuscular, intraocular, intratecal, intratumoral, subcutánea o transdérmica. En determinadas realizaciones, el virus oncolítico puede administrarse mediante una cánula, mediante un catéter o mediante inyección directa. El sitio de administración puede ser intratumoral o en un sitio distante del tumor. La vía de administración dependerá a menudo del tipo de cáncer al que se dirige.

El régimen de dosificación óptimo o apropiado del virus oncolítico es fácilmente determinable dentro de los conocimientos de la técnica, por el médico tratante basándose en los datos del paciente, las observaciones del paciente y diversos factores clínicos, incluyendo, por ejemplo, el tamaño del sujeto, el área superficial corporal, la edad, género y el virus oncolítico particular que se va a administrar, el momento y la vía de administración, el tipo de cáncer que se está tratando, la salud general del paciente y otras terapias farmacológicas a las que se está sometiendo al paciente. Según determinadas realizaciones, el tratamiento de un sujeto que utiliza el virus oncolítico descrito en la presente memoria se puede combinar con tipos adicionales de terapia, tal como quimioterapia utilizando, por ejemplo, un agente quimioterapéutico tal como etopósido, ifosfamida, adriamicina, vincristina, doxiciclina y otros.

El oHSV puede formularse como medicamentos y composiciones farmacéuticas para su uso clínico y puede combinarse con un vehículo, diluyente, excipiente o adyuvante farmacéuticamente aceptable. La formulación dependerá, al menos en parte, de la vía de administración. Las formulaciones adecuadas pueden comprender el virus y el inhibidor en un medio estéril. Las formulaciones pueden ser formas fluidas, en gel, en pasta o sólidas. Las formulaciones pueden proporcionarse a un sujeto o a un profesional médico.

Preferiblemente se administra una cantidad terapéuticamente eficaz. Esta es una cantidad que es suficiente para mostrar beneficio al sujeto. La cantidad real administrada y el tiempo de administración dependerán al menos en parte de la naturaleza del cáncer, la condición del sujeto, el sitio de administración y otros factores.

En otras realizaciones más de la invención, el virus oncolítico se puede administrar por vía intratumoral o después de la resección quirúrgica de un tumor.

Los siguientes ejemplos se ofrecen a modo de ilustración y no a modo de limitación.

EJEMPLOS

Todos los constructos se generan utilizando técnicas recombinantes estándar, incluyendo la síntesis química.

EJEMPLO 1

ESQUEMA DE VECTORES oHSV EJEMPLARES

Las Figuras 1A y 1B proporcionan un esquema ejemplar de vectores oHSV representativos.

EJEMPLO 2

CONSTRUCTOS EJEMPLARES

En este ejemplo, se presentan varios constructos y sus secuencias.

hVG161 comprende una región ICP34.5 modificada (Figura 2; SEQ ID NO.572), una región reguladora del promotor UL54 modificada (Figura 3; SEQ ID NO. 573), una inserción de un bloqueante de PD-L1 dentro de la región intergénica entre UL3 y UL4 (Figura 4; SEQ ID No. 574), y una región de repetición terminal (TR) modificada que lleva un casete de expresión que codifica IL-12, IL-15 y la subunidad alfa del receptor de IL-15 (Figura 5; SEC ID No. 575). Estos cuatro virus también tienen una región ICP 34.5 modificada y parcialmente eliminada.

mVG161 es una versión de ratón funcionalmente idéntica de hVG161, excepto que mVG161 lleva una versión de ratón de IL-12 y un bloqueante de PD-L1 de ratón en la misma localización en el genoma viral donde hVG161 lleva una IL-12 humana y un bloqueante de PD-L1 humano.

EJEMPLO 3

ABREVIATURAS UTILIZADAS EN EJEMPLOS POSTERIORES

TF-Fc: péptido bloqueante (TF) de PD-L1 fusionado a Fc y utilizado para la construcción de VG161.

IL-TF-Fc: plásmido que lleva IL-12, IL-15 y un bloqueante de PD-L1.

HSV-345: virus con ICP34.5 eliminado.

OS-ICP27 2-11: virus con ICP34.5 eliminado con un sitio de unión Oct4/Sox2 y un promotor de supervivencia (OS) insertado dentro de la región reguladora del promotor de ICP27 (OS-ICP27) que no se utilizó para la construcción de VG161.

OS-ICP27 5-7: virus con ICP34.5 eliminado y con mutación de OS-ICP27 que no se utilizó para la construcción de VG161.

NO-ICP27 1-4-4 (también conocido como NO-ICP27-145): virus con ICP34.5 eliminado con un elemento de respuesta NF-κB y un sitio de unión (NO) Oct4/Sox2 insertado dentro de la región reguladora del promotor de ICP27 (NO-ICP27)

en una localización 145 pb anterior del sitio de inicio de la transcripción de ICP27 y que se utilizó para la construcción de VG161.

NO-ICP27 5-2-2 (también conocido como NO-ICP27-99): virus con ICP34.5 eliminado con un elemento de respuesta NF-kB y un sitio de unión (NO) Oct4/Sox2 insertado dentro de la región reguladora del promotor de ICP27 (NO-ICP27) en una localización 99 pb anterior del sitio de inicio de la transcripción de ICP27 y que no se utilizó para la construcción de VG161.

VG001 (también conocido como VG160): virus principal que se usó para la construcción de VG161 (mutante NO-ICP27 1-4-4 que lleva un promotor exógeno y poli(A) que flanquea un MCS vacío dentro de una región de repetición terminal eliminada del genoma viral que posteriormente se utiliza para la inserción del casete de expresión IL-12/IL-15).

VG001-15h (también conocido como VG161-15h): VG001 que lleva IL-15 humana.

VG001-1215h (también conocido como VG161-1215h): VG001 que lleva IL-12 humana e IL-15 humana.

VG001-PLBh (también conocido como VG161-PLBh): VG001 que lleva un bloqueante de PD-L1 humano insertado dentro de la región intergénica entre UL3 y UL4.

8-8-15RA1-PDL1b: VG001 que lleva IL-15 humana y un bloqueante de PD-L1 humano.

VG161-1215PLBm (también conocido como mVG161): VG001 que lleva IL-12 de ratón, IL-15 humana y un bloqueante de PD-L1 de ratón.

VG161-1215PLBh (también conocido como hVG161 o VG161): VG001 que lleva IL-12 humana, IL-15 humana y un bloqueante de PD-L1 humana.

EJEMPLO 4

EXPRESIÓN DE IL-12 DESPUÉS DE LA INFECCIÓN DE CÉLULAS POR hVG161

En este ejemplo, se muestran datos de la transferencia Western y ELISA de la expresión de IL-12.

La Figura 6A muestra los resultados de la transferencia de Western después de la infección por el virus VG161-1215PLBh. Se infectaron células tumorales H460 con el virus VG161-1215PLB o VG001 (MOI = 1) durante 24 horas. Se prepararon lisados celulares, se procesaron en gel de SDS-PAGE al 12 % y se transfirieron a una membrana de PVDF. La membrana se transfirió con un anticuerpo anti-IL-12 humano seguido de un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado con HRP y la imagen se detectó y analizó utilizando el sistema Bio-Rad ImageLab.

Las Figuras 6B-6C muestran que la producción de IL-12 humana está regulada positivamente después de la infección por el virus VG161-1215PLBh. Se infectaron células tumorales LS174T o H460 con el virus VG161-1215PLB o VG001 (MOI = 1) durante 48 horas. Los sobrenadantes de células infectadas se recogieron y se unieron a una placa de fondo plano Immuno Maxisorp de 96 pocillos recubierta con anticuerpo de captura anti-IL-12 humana. La unión se detectó mediante un anticuerpo anti-IL-12 humano biotinilado, avidina-peroxidasa de rábano picante (HRP) y el sustrato 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB). Las mediciones de absorbancia se recogieron a 450 nm mediante un lector de placas. La concentración de IL-12 humana en sobrenadantes cultivados se calculó basándose en la curva estándar de IL-12 humana.

EJEMPLO 5

EXPRESIÓN DE IL-15 DESPUÉS DE LA INFECCIÓN DE CÉLULAS POR HVG161

En este ejemplo, se muestran los datos de la transferencia de Western y ELISA de la expresión de IL-15.

La Figura 7A muestra los resultados de la transferencia de Western después de la infección por el virus VG161-1215PLBh. Se infectaron células tumorales H460 con el virus VG161-1215PLB o VG001 (MOI = 1) durante 24 horas. Se prepararon lisados celulares, se procesaron en gel de SDS-PAGE al 12 % y se transfirieron a una membrana de PVDF. La membrana se transfirió con un anticuerpo anti-IL-15 humano seguido de un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado con HRP y la imagen se detectó y analizó utilizando el sistema Bio-Rad ImageLab.

Las Figuras 7B-7C muestran que la producción de IL-15 humana está regulada positivamente después de la infección por el virus VG161-1215PLBh. Se infectaron células tumorales LS174T o H460 con el virus VG161-1215PLB o VG001 (MOI = 1) durante 48 horas. Los sobrenadantes de células infectadas se recogieron y se unieron a una placa de fondo plano Immuno Maxisorp de 96 pocillos recubierta con anticuerpo de captura anti-IL-15 humana. La unión se detectó mediante un anticuerpo anti-IL-15 humano biotinilado, avidina-peroxidasa de rábano picante (HRP) y sustrato 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB). Las mediciones de absorbancia se recogieron a 450 nm mediante un lector de placas. La concentración de IL-15 humana en sobrenadantes cultivados se calculó basándose en la curva estándar de IL-15 humana.

EJEMPLO 6

EXPRESIÓN DE IGG4 DESPUÉS DE LA INFECCIÓN DE CÉLULAS POR HVG161

En este ejemplo, se muestran los datos de la transferencia de Western y ELISA de la expresión de IgG4.

5 La Figura 8A muestra los resultados de la transferencia de Western después de la infección por el virus VG161-1215PLBh. Se infectaron células tumorales H460 con el virus VG161-1215PLB o VG001 (MOI = 1) durante 24 horas. Se prepararon lisados celulares, se procesaron en gel de SDS-PAGE al 12 % y se transfirieron a una membrana de PVDF. La membrana se transfirió con anticuerpo anti-IgG humana conjugado con HRP y la imagen se detectó y analizó utilizando el sistema Bio-Rad ImageLab.

10 Las Figuras 8B-8C muestran que la producción del bloqueante de PD-L1 humano (fusionado con el dominio Fc humano) está regulada positivamente después de la infección por el virus VG161-1215PLBh. Se infectaron células tumorales LS174T o H460 con el virus VG161-1215PLB o VG001 (MOI = 1) durante 48 horas. Los sobrenadantes de células infectadas se recogieron y se unieron a una placa de fondo plano Immuno Maxisorp de 96 pocillos recubierta con anticuerpo de captura anti-IgG4 humana. La unión se detectó mediante un anticuerpo anti-IgG4 humano biotinilado, avidina-peroxidasa de rábano picante (HRP) y sustrato 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB). Las mediciones de absorbancia se recogieron a 450 nm mediante un lector de placas. La concentración de IgG4 humana en los sobrenadantes cultivados se calculó basándose en la curva estándar de IgG4 humana.

EJEMPLO 7

Constructos que comprenden péptidos bloqueantes de PD-L1

20 Los péptidos bloqueantes de PD-L1 se generan con una secuencia líder de cadena κ de Ig (SEQ ID NO: 501). Cuando dos o más péptidos bloqueantes están en el mismo constructo, se unen con una secuencia rica en Gly-Ser (Gly₄Ser)₃ (SEQ ID NO: 503). Se prepararon los siguientes constructos.

TF solo:

METDTLLLWVLLLWVPGSTGTAHPSPPRSAGQF (SEQ ID NO: 537);

ET+FT:

25 METDTLLLWVLLLWVPGSTGEYRMSPSNQTGGGGSGGGGSGGGGTAHPSPPRSAGQF (SEQ ID NO: 538);

YT+TF:

METDTLLLWVLLLWVPGSTGYRMSPSNQTGGGGSGGGGSGGGGTAHPSPPRSAGQF (SEQ ID NO: 539);

TF de ratón:

METDTLLLWVLLLWVPGSTGTRYPSPPKPEGRF (SEQ ID NO: 540);

30 WT+TF de ratón:

METDTLLLWVLLLWVPGSTGWNRLSPSNQTGGGGSGGGGSGGGGSTRYPSPPKPEGRF (SEQ ID NO: 541).

TF+ET triple:

METDTLLLWVLLLWVPGSTGTAHPSPPRSAGQFTAHPSPRSAGQFTAHPSPRSAGQFGGGGSGG
GGSGGGGSEYRMSPSNQTEYRMSPSNQTEYRMSPSNQT (SEQ ID NO: 542)

METDTLLLWVLLLWVPGSTGEYRMSPSNQTEYRMSPSNQTEYRMSPSNQTGGGGSGG

GGSGGGGTAHPSPPRSAGQFTAHPSPRSAGQFTAHPSPRSAGQF (SEQ ID NO: 543).

35 Otros constructos se prepararon usando una secuencia señal de IL-2 (MYRMQLLSICIALSLALVTNS (SEQ ID NO: 502), y la región Fc de IgG4 humana (con región bisagra) (SEQ ID NO: 544) o la región Fc de IgG1 murina (con región bisagra) (SEQ ID NO: 545) Los constructos son:

TF solo:

MYRMQLLSICIALSLALVTNSTAHPSPSPRSAGQFISAMVRSPPCSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR
TPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
NKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPP
VLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 546)

ET+FT:

MYRMQLLSICIALSLALVTNSEYRMSPSNQTGGGGSGGGGSGGGGSTAHPSPSPRSAG
QFISAMVRSPPCSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEE
MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV
MHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 547)

YT+TF:

MYRMQLLSICIALSLALVTNSYRMSPSNQTGGGGSGGGGSGGGGSTAHPSPSPRSAG
QFISAMVRSPPCSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEE
MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV
5 MHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 548)

TF de ratón:

MYRMQLLSICIALSLALVTNSTRYSPSPKPEGRFISAMVRSGCKPCICTVPEVSSVFIFPPK
PKDVLITLTPKVTCVVVDISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTQPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDWLNGK
EFKCRVNSAAFPAPIEKTIKTKGRPKAPQVYTIPPPKEQMAKDKVSLTCMITDFFPEDITVEWQWNGQPAE
NYKNTQPIMDTDGSYFVYSKLNQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTKSLSHSPGK (SEQ ID NO:
549)

WT+TF de ratón:

MYRMQLLSICIALSLALVTNSWNRLSPSNQTGGGGSGGGGSGGGGSTRYSPSPKPEGR
FISAMVRSGCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDVLITLTPKVTCVVVDISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTQ
PREEQFNSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTIKTKGRPKAPQVYTIPPPKEQMAKDK
VSLTCMITDFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMDTDGSYFVYSKLNQKSNWEAGNTFTCSVLHEG
10 LHNHHTKSLSHSPGK (SEQ ID NO: 550).

EJEMPLO 8

Constructos que comprenden IL-15 e IL-15Rα bajo el control de un promotor de CMV bidireccional

En este ejemplo, se generan una variedad de constructos para co-expresar IL-15 e IL-15Rα bajo el control de un promotor de CMV bidireccional.

15 En el constructo 1, el promotor bi-CMV dirige la expresión del dominio Sushi de IL-15Rα e IL-15 (Figura 9, SEQ ID No. 557).

En el constructo 2, el promotor bi-CMV dirige la expresión de IL-15 y la variante 4 de IL-15Rα (Figura 10, SEQ ID No. 558).

20 En el constructo 3, el promotor bi-CMV dirige la expresión de IL-15-K5 y del dominio Sushi-E5 de IL-15Rα. (Figura 11, SEQ ID No. 559).

En el constructo 4, el promotor bi-CMV dirige la expresión de IL-15-K5 y la variante 4-E5 de IL-15Rα (Figura 12, SEQ ID No. 560).

EJEMPLO 9

Constructos que comprenden los genes de IL-15 e IL-15R α bajo el control de un promotor EF1 α

5 En este ejemplo, se generan una variedad de constructos para expresar IL-15 e IL-15R α en un transcrito multicistónico bajo el control de un promotor EF1 α (SEQ ID NO: 551). IL-15 e IL-15R α están unidas mediante una secuencia de IRES ejemplar (SEQ ID NO: 552).

En el constructo 1, el promotor EF1 α controla la expresión del dominio Sushi de IL-15-IRES-IL-15R α . (Figura 13, SEQ ID No. 561.)

En el constructo 2, el promotor EF1 α controla la expresión de la variante 4 de IL-15-IRES-IL-15R α (Figura 14, SEQ ID No. 562).

10 En el constructo 3, el promotor EF1 α controla la expresión del dominio Sushi E5 de IL-15K5-IRES-IL-15R α . (Figura 15, SEQ ID No. 563.)

En el constructo 4, el promotor EF1 α controla la expresión de la variante 4E5 de IL-15K5-IRES-IL-15R α . (Figura 16, SEQ ID No. 564.)

EJEMPLO 10

15 **Constructos que comprenden genes de IL-12, IL-15 e IL-15R α bajo el control de un promotor de CMV**

En este ejemplo, se generan una variedad de constructos para expresar IL-12, IL-15 e IL-15R α en un transcrito multicistónico bajo el control de un promotor de CMV. IL-12, IL-15 e IL-15R α están unidos mediante una secuencia de p2A ejemplar (SEQ ID NO: 554).

20 En el constructo 1, el promotor de CMV (SEQ ID NO: 553) controla la expresión del dominio Sushi de IL-12-p2A-IL-15-p2A-IL-15R α . (Figura 17, SEQ ID Nos. 565, 569.)

En el constructo 2, el promotor de CMV controla la expresión de la variante 1 de IL-12-p2A-IL-15-p2AIL-15R α (Figura 18, SEQ ID Nos. 566, 570).

En el constructo 3, el promotor de CMV controla la expresión del dominio Sushi E5 de IL-12-p2A-IL-15K5-p2A-IL-15R α . (Figura 19, SEQ ID Nos. 567, 571.)

25 En el constructo 4, el promotor de CMV controla la expresión de la variante 1E5 de IL-12-p2A-IL-15K5-IRES-IL-15R α . (Figura 20, SEQ ID Nos. 568, 572.)

EJEMPLO 11

Constructos que comprenden el bloqueante de PD-L1 insertado entre UL3 y UL4

30 En este ejemplo, se genera un constructo para expresar el péptido bloqueante de PD-L1 dentro de la región intergénica entre UL3 y UL4 entre las bases 829 y 830. En SEQ ID NO: 556, bases 1-675: secuencia codificante de UL3; bases 676-829: región entre UL3 y UL4 y anterior al casete bloqueante de PD-L1; bases 830-833: región entre UL3 y UL4 y posterior al casete bloqueante de PD-L1; bases 834-1433: secuencia codificante de UL4.

EJEMPLO 12

Inhibición de la unión de PD-L1 humano a PD-1 mediante péptidos bloqueantes

35 Una placa de fondo plano de 96 pocillos se recubrió con una proteína PD-L1 Fc humana recombinante a 4°C durante la noche. Después de recubrir la placa durante la noche, se añadieron diferentes bloqueantes de PD-L1 a cada pocillo de la placa y se incubaron a temperatura ambiente durante 2 horas antes de la adición de la proteína PD-1 Fc humana recombinante. Posteriormente se añadieron a cada pocillo anticuerpo anti-IgG humano biotinilado y estreptavidina-HRP, y se detectó la unión de PD-1 humano a PD-L1 mediante la adición de sustrato TMB. El desarrollo del color se midió mediante un lector de microplacas a una longitud de onda de 450 nm. El porcentaje de inhibición se calculó comparándolo con el control sin péptido sintetizado. La Figura 21 muestra el porcentaje de inhibición por los péptidos ET, ET+TF, YT, YT+TF, TW, TW+TF, WT, WT+TF y TF a dos concentraciones diferentes (3 y 10 μ M). A 10 μ M, la inhibición osciló entre aproximadamente el 22 % y aproximadamente el 48 %.

40

EJEMPLO 13

45 **El bloqueo de la unión de PD-L1 mediante péptidos bloqueantes mejora la citotoxicidad contra las células tumorales**

Se estimularon células mononucleares de sangre periférica humana (PBMCs) con anticuerpo anti-CD3 más IL-2 humana durante 24 horas y posteriormente se incubaron con diferentes bloqueantes de PD-L1 sintetizados y células

objetivo marcadas con calceína-AM durante 4 horas. Los sobrenadantes de cultivos celulares se recogieron después de 4 horas de incubación y se midió la fluorescencia de calceína-AM liberada mediante un lector de microplacas. El porcentaje de citotoxicidad se calculó basándose en la siguiente fórmula: $[(\text{lectura de muestra} - \text{liberación mínima}) / (\text{Liberación máxima} - \text{liberación mínima})] \times 100$.

- 5 Las Figuras 22A-22D muestran resultados para cuatro células tumorales diferentes: células H460, U87, LS147T y MDA-MB-231. El aumento de la citotoxicidad fue estadísticamente significativo para todos los péptidos excepto para TF en algunas células tumorales.

EJEMPLO 14

Efecto sinérgico de IL-12 e IL-15 sobre la producción de citocinas.

- 10 Las PBMCs humanas se incubaron con medio de control, IL-12 sola, IL-15RA sola o IL-12, IL-15 e IL-15R α 1 combinadas más anticuerpo neutralizante anti-IL-12 o anti-IL-15 durante 48 horas. Se recogieron sobrenadantes de cultivos celulares para medir la producción de IFN γ y TNF α humanos mediante ELISA.

Las Figuras 23A y 23B muestran resultados de la producción de citocinas. La combinación de IL-12 e IL-15R α 1 provocó un aumento estadísticamente significativo de las citocinas IFN γ y TNF α humanas. La producción se inhibió con anticuerpo anti-IL-12.

EJEMPLO 15

Efecto sinérgico de IL-12 e IL-15 sobre la citotoxicidad contra células tumorales.

- 20 Se co-incubaron PBMCs humanas con células objetivo tumorales y medio de control, IL-12 sola, IL-15RA sola o IL-12, IL-15 e IL-15RA1 combinadas más anticuerpos anti-IL-12 o anti-IL-15 neutralizantes durante 24 horas. Se recogieron sobrenadantes de cultivos celulares para medir la citotoxicidad mediante el ensayo de LDH. El porcentaje de citotoxicidad se calculó basándose en la siguiente fórmula: $[(\text{lectura de muestra} - \text{liberación mínima}) / (\text{Liberación máxima} - \text{liberación mínima})] \times 100$.

Las Figuras 24A y 24B muestran que IL-12 e IL-15 juntas aumentaron la citotoxicidad de una manera estadísticamente significativa. En la línea celular MDA-MB-231, la adición de anticuerpos anti-IL-12 o IL-15 redujo significativamente el efecto.

EJEMPLO 16

EFICACIA IN VITRO DE LOS VIRUS VG161-PLBH Y VG161-15H

- 30 En este ejemplo, se sembraron 3×10^4 células tumorales H460 o LS174T en cada pocillo de una placa de 96 pocillos y se cultivaron a 37°C durante la noche. Al día siguiente, las células sembradas se infectaron con el virus principal VG001, VG161-PLBH o VG161-15h (MOI = 1) durante 24 horas y se evaluaron las producciones de IL-12 humana, IL-15 humana e IgG4 humana (Figuras 25A-C). Posteriormente se añadieron 3×10^5 PBMCs humanas al cultivo y se incubaron conjuntamente durante 24 horas para evaluar la citotoxicidad mediante el ensayo de LDH (Figura 25D) o 48 horas para la producción de IFN γ humana mediante ELISA (Figura 25E). Para el ensayo de citotoxicidad, el porcentaje de citotoxicidad se calculó basándose en la siguiente fórmula: $[(\text{lectura real} - \text{liberación mínima}) / (\text{Liberación máxima} - \text{liberación mínima})] \times 100\%$. El sobrenadante recogido de las células tumorales incubadas sólo con medio se utilizó como liberación mínima, y el sobrenadante recogido de las células tumorales incubadas con tampón de lisis se utilizó como liberación máxima.

EJEMPLO 17

EFICACIA IN VITRO DE DIVERSOS CONSTRUCTOS

- 40 Las Figuras 26A-26D muestran los resultados de ensayos in vitro para diversos constructos.

Las Figuras 26A-26B muestran los resultados de transfección celular con el plásmido IL-TF-Fc que lleva IL-12, IL-15 y un bloqueante de PD-L1. En las Figuras 26A-26B, se transfectaron diferentes líneas de células tumorales con DNA del plásmido IL-TF-Fc durante 24 horas y posteriormente se añadieron PBMCs humanas al cultivo. Los sobrenadantes celulares se recogieron después de 24 horas para la cuantificación de la citotoxicidad mediante el ensayo de LDH (Figura 26A), y después de 48 horas para la detección de la producción de IFN γ humana mediante el ensayo ELISA (Figura 26B).

Las Figuras 26C-26D muestran los resultados de infección celular con una variedad de virus mutantes incluyendo hVG161. IL12, IL15 y el bloqueante de PD-L1 codificados viralmente mejoran sinérgicamente la producción de IFN γ y la citotoxicidad. Se sembraron células tumorales H460 en cada pocillo de una placa de 96 pocillos y se cultivaron a 37°C durante la noche. Al día siguiente, las células sembradas se infectaron con los virus indicados a MOI = 1 durante 24 horas. Posteriormente se añadieron PBMCs humanas al cultivo y se incubaron conjuntamente durante 24 horas para evaluar la citotoxicidad mediante el ensayo de LDH (Figura 26C) o 48 horas para la producción de IFN γ humana

mediante ELISA (Figura 26D). Para el ensayo de citotoxicidad, el porcentaje de citotoxicidad se calculó basándose en la siguiente fórmula: $[(\text{lectura real} - \text{liberación mínima}) / (\text{Liberación máxima} - \text{liberación mínima})] \times 100\%$. El sobrenadante recogido de las células tumorales incubadas sólo con medio se utilizó como liberación mínima, y el sobrenadante recogido de las células tumorales incubadas con tampón de lisis se utilizó como liberación máxima.

- 5 En las Figuras 27A-27E, se infectó un panel de 9 líneas de células tumorales humanas diferentes (más células Vero) con los virus VG161-1212PLBh (VG161h) y HSV-345 en MOI 0, 0,04, 0,2, 1 y 5. La viabilidad celular fue cuantificado mediante el ensayo MTT a las 48 horas después de la infección.

- 10 Las Figuras 28A-28J muestran los resultados de ensayos in vitro para diversos constructos. Las Figuras 28A-28E muestran los resultados de ensayos de viabilidad celular para mVG161 y HSV-345 en líneas de células tumorales de ratón y línea celular Vero; las Figuras 28F-28J muestran la caracterización de la expresión transgénica después de la infección con mVG161 o VG001 de células tumorales de ratón CT26.

En las Figuras 28A-28E, se infectó un panel de 6 líneas de células tumorales de ratón diferentes (más células Vero) con los virus VG161m y HSV-345 a MOI 0, 0,04, 0,2, 1 y 5. La viabilidad celular se cuantificó usando el ensayo MTT a 48 horas después de la infección.

- 15 En las figuras 28F-28J, se sembraron 3×10^4 células tumorales CT26 en cada pocillo de una placa de 96 pocillos y se cultivaron a 37°C durante la noche. Al día siguiente, las células sembradas se infectaron con el virus principal VG001 o el virus VG161-1215PLBm (MOI = 1) durante 24 horas y se evaluó la producción de IL-12 de ratón, IL-15 humana e IgG de ratón. Posteriormente se añadieron 3×10^5 esplenocitos de ratón Balb/c al cultivo y se incubaron conjuntamente durante 24 horas para evaluar la citotoxicidad mediante el ensayo de LDH o 48 horas para la producción de IFN γ de ratón mediante ELISA. Para el ensayo de citotoxicidad, el porcentaje de citotoxicidad se calculó basándose en la siguiente fórmula: $[(\text{lectura real} - \text{liberación mínima}) / (\text{Liberación máxima} - \text{liberación mínima})] \times 100\%$. El sobrenadante recogido de células tumorales incubadas sólo con medio se utilizó como liberación mínima, y el sobrenadante recogido de células tumorales incubadas con tampón de lisis se utilizó como liberación máxima.
- 20

- 25 En las figuras 29A-29E, se sembraron 3×10^4 células tumorales H460, LS174T o UMUC3 en cada pocillo de una placa de 96 pocillos y se cultivaron a 37°C durante la noche. Al día siguiente, las células sembradas se infectaron con el virus principal VG001 y el virus VG161-1215h (MOI = 1) durante 24 horas y se evaluaron las producciones de IL-12 humana, IL-15 humana e IgG4 humana (18R). Posteriormente se añadieron 3×10^5 PBMCs humanas al cultivo y se incubaron conjuntamente durante 24 horas para evaluar la citotoxicidad mediante el ensayo de LDH (18S) o 48 horas para la producción de IFN γ humana mediante ELISA (18T). Para el ensayo de citotoxicidad, el porcentaje de citotoxicidad se calculó basándose en la siguiente fórmula: $[(\text{lectura real} - \text{liberación mínima}) / (\text{Liberación máxima} - \text{liberación mínima})] \times 100\%$. El sobrenadante recogido de células tumorales incubadas sólo con medio se utilizó como liberación mínima, y el sobrenadante recogido de células tumorales incubadas con tampón de lisis se utilizó como liberación máxima.
- 30

- 35 En las Figuras 30A-30G, se evaluó el efecto antitumoral del virus VG161-1215PLBh (hVG161) en una variedad de células cancerosas humanas que incluyen U87, MCF7, H460, LNCaP, LS174T, MDA y PC3 a las 72 h después de la infección y MOIs que varían de 0 a 5. El porcentaje de supervivencia celular se cuantificó mediante el ensayo MTT. El virus VG161-1215PLBh muestra una sólida capacidad de destrucción celular en todas las líneas de células tumorales humanas analizadas.

EJEMPLO 18

40 EFICACIA IN VIVO DE LOS CONSTRUCTOS VIRALES DE VG161

- En las Figuras 31A-31B, a ratones BALB/c que portaban tumores de linfoma de células B murinos A20 se les inyectó 5 veces por vía intratumoral con un total de 1×10^7 PFU/ratón del virus VG161-1215PLBm (mVG161) o del virus principal VG001 o con PBS (vehículo de control). Las mediciones del tamaño del tumor se realizaron en los momentos indicados después de la inyección. Los ratones tratados con VG161-1215PLBm mostraron una reducción significativa (P < 0,05) en el volumen del tumor en comparación con los ratones tratados con PBS.
- 45

- En las Figuras 31C-31D, a ratones BALB/c que portaban tumores de carcinoma de colon murino CT26 se les inyectó 5 veces por vía intratumoral con un total de 5×10^6 PFU/ratón del virus VG161-1215PLBm (mVG161) o del virus principal VG001 o con PBS (vehículo de control). Las mediciones del tamaño del tumor se realizaron en los momentos indicados después de la inyección. Los ratones tratados con VG161-1215PLBm mostraron una reducción significativa (P < 0,05) en el volumen del tumor en comparación con los ratones tratados con PBS.
- 50

- En las Figuras 31E-31G, se evaluó el tratamiento con oHSV de tumores de próstata humanos con xenoinjertos en ratones. A doce ratones se les implantaron con células tumorales de próstata humana LNCaP en el flanco inferior derecho. A los 35 días después de la implantación, a un grupo de 6 animales seleccionados al azar se les inyectó dos veces por vía intratumoral un total de 5×10^7 PFU/ratón del virus VG161-1215PLBh (hVG161), mientras que los 6 animales restantes sirvieron como vehículo de control y se les inyectó dos veces con un volumen equivalente de PBS. Las mediciones del tamaño del tumor se realizaron utilizando dos métodos diferentes. Las mediciones del calibrador se expresan como veces del cambio en el volumen del tumor en un momento dado en comparación con el volumen
- 55

del tumor en el momento de la inyección del virus o PBS (Figura 31E). Los ratones portadores de tumores tratados con el virus VG161-1215PLBh mostraron una fuerte contracción del tumor durante el transcurso del estudio con una reducción de más del 50% en el tamaño del tumor al final de los 15 días, mientras que los ratones tratados con vehículo mostraron aumentos de aproximadamente 3 veces en el volumen del tumor durante el mismo lapso de tiempo. El crecimiento del tumor también se controló utilizando un sistema de imágenes bioluminiscentes de animales completos (IVIS Imaging System; Xenogen, Mountain View, CA). Las intensidades de las señales se cuantificaron como la suma de todos los fotones detectados por segundo (Figura 31F). Las imágenes cuantitativas del crecimiento del tumor utilizando el sistema IVIS muestran una reducción aún más espectacular en el tamaño del tumor en los animales tratados con oHSV en comparación con los controles tratados con PBS, con una fluorescencia que cae a niveles indetectables 50 días después de la implantación del tumor (Figura 32G; dos vehículos de control en la izquierda y dos ratones tratados con oHSV en la derecha).

EJEMPLO 19

REPLICACIÓN DE HVG161 EN LÍNEAS CELULARES

La curva de crecimiento y los datos de citotoxicidad en las Figuras 32A-C, Figuras 33A-D y Figuras 34A-E muestran que los virus hVG161 se replican tan bien como el virus HSV-345 parental. Estos datos también muestran que los virus no crecen tan bien en líneas de células tumorales de ratón en comparación con líneas de células humanas, pero se sabe que el HSV-1 crece mal en células de ratón.

EJEMPLO 20

Evaluación de modificaciones de virus.

Las PBMCs humanas se estimularon con medio solo, IL-12 recombinante sola, IL-15 recombinante sola o IL-12 más diferentes formas del complejo IL-15/IL-15RA1 con o sin anticuerpo neutralizante anti-IL-12 (6 mg/ml) o anti-IL-15 (0,5 mg/ml) durante 48 horas. Posteriormente se recogieron los sobrenadantes cultivados para la producción de IFN γ humana y TNFa humana usando ensayos ELISA como se muestra en las Figuras 35 A y 35 B.

Para evaluar la citotoxicidad contra las células tumorales, se incubaron conjuntamente células tumorales marcadas con calceína-AM con PBMCs humanas estimuladas durante 24 horas. Se recogieron los sobrenadantes para medir la fluorescencia liberada. El sobrenadante recolectado de células tumorales marcadas con calceína incubadas solo con medio se usó como liberación mínima, y el sobrenadante recolectado de células tumorales marcadas con calceína incubadas con tampón de lisis se usó como liberación máxima. El porcentaje de citotoxicidad se calculó basándose en la fórmula: $[(\text{lectura real} - \text{liberación mínima}) / (\text{Liberación máxima} - \text{liberación mínima})] \times 100\%$. El resultado de citotoxicidad para las células tumorales U87 se muestra en la Figura 35C y las células tumorales MDA-MB-231 se muestran en la Figura 35D.

EJEMPLO 21

Datos de eficacia *in vitro*

Se estimularon células mononucleares de sangre periférica humana (PBMCs) con medio solo, IL-12 recombinante sola, IL-15 recombinante sola o complejo IL-12 más IL-15/IL-15RA1 con o sin anticuerpo neutralizante anti-IL-12 (6 mg/ml) o anti-IL-15 (0,5 mg/ml) durante 48 horas. Posteriormente se recogieron los sobrenadantes cultivados para la producción de IFN γ humana y TNFa humana usando ensayos ELISA como se muestra en las Figuras 36A y B.

Para evaluar la citotoxicidad contra células tumorales, 1×10^4 células tumorales marcadas con calceína-AM se incubaron conjuntamente con 1×10^5 PBMCs humanas estimuladas durante 24 horas. Se recogieron los sobrenadantes para medir la fluorescencia liberada. El sobrenadante recolectado de las células tumorales marcadas con calceína incubadas solo con medio se usó como liberación mínima, y el sobrenadante recolectado de las células tumorales marcadas con calceína incubadas con tampón de lisis se usó como liberación máxima. El porcentaje de citotoxicidad se calculó basándose en la fórmula: $[(\text{lectura real} - \text{liberación mínima}) / (\text{Liberación máxima} - \text{liberación mínima})] \times 100\%$. Los resultados de citotoxicidad para las células tumorales U87 se muestran en la Figura 36C y los resultados para las células tumorales MDA-MB-231 se muestran en la Figura 36D.

EJEMPLO 22

Las células tumorales infectadas con VG161h producen IL-12 humana, IL-15/IL15Ra humana e IgG4 humana.

Brevemente, se implantaron células LNCaP en ratones nude y se les inyectó un vehículo, el virus ICP27- o VG161h. Se recogieron muestras de suero y tumor 120 horas después de la inyección y se evaluaron mediante ELISA las producciones de IL-12 humana, IL-15/IL-15Ra humana e IgG4 humana. Los resultados se muestran en la Figura 37 A.

Se implantaron células Fadu en ratones nude y se les inyectó el vehículo, el virus VG160 o VG161h. Se recogieron muestras de tumores 24 horas después de la inyección y se evaluaron mediante ELISA las producciones de IL-12 humana, IL-15/IL-15Ra humana e IgG4 humana. Los resultados se muestran en la Figura 37B.

EJEMPLO 23

Efecto de VG161m en la respuesta inmune.

5 Se implantaron células de cáncer de colon CT26 en ratones balb/c y recibieron una inyección de PBS, virus VG160 o VG161m. Se recogieron muestras de tumores 24 horas después de la inyección y se evaluó mediante citometría de flujo el porcentaje de células T CD8+, células T CD4+ o células NK. Los resultados se muestran en las Figuras 38A-C.

REIVINDICACIONES

1. Un vector oncolítico HSV que comprende uno o más casetes de expresión para IL12, IL15 y una subunidad alfa del receptor IL15.
- 5 2. El vector HSV de la reivindicación 1, en donde una secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido 2A autoexcindible se sitúan en un marco entre secuencias codificantes para IL12, IL15 y una subunidad alfa del receptor IL15.
- 10 3. El vector HSV de la reivindicación 2, en donde la secuencia de ácido nucleico codifica un péptido 2A autoescindible seleccionado del grupo que consiste en VKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP, QCTNYALLKLAGDVESNPGP, ATNF-SLLKQAGDVEENPGP, HYAGYFADLLIHDIETNPGP, GIFN-AHYAGYFADLLIHDIETNPGP, KAVRGYHADYYKQRLIHDVEMNPGP, GATNF-SLLKLAGDVELNPGP, EGRGSLTTCGDVEENPGP, AARQMLLLLSGDVETNPGP, FLRKRTQLLMSGDVESNPGP, GSWTDILLLLSGDVETNPGP, TRAEUEDELIRAGIESNPGP, AKFQIDKILISGDVELNPGP, SKFQIDKILISGDIELNPGP, SSIIRTKMLVSGDVEENPGP y CDAQRQKLLLSGDIEQNPGP.
- 15 4. El vector HSV de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde una o más secuencias de IRES están situadas entre las secuencias codificantes para IL12, IL15 y/o una subunidad alfa del receptor IL15.
5. El vector HSV de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la IL15 y una subunidad alfa del receptor IL15 se expresan mediante un promotor bidireccional.
6. El vector HSV de la reivindicación 5, en donde el promotor bidireccional es bi-CMV.
- 20 7. El vector HSV de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde la subunidad alfa del receptor IL15 se selecciona del grupo que consiste en la variante 1, la variante 2, la variante 3 y la variante 4.
8. El vector HSV de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende además un casete de expresión para uno o más péptidos bloqueantes de PD-L1.
9. El vector HSV de la reivindicación 8, que comprende además una secuencia que codifica un enlazador peptídico entre múltiples péptidos bloqueantes de PD-L1.
- 25 10. El vector HSV de la reivindicación 8, que comprende además una secuencia que codifica un dominio Fc unido al extremo 3' del péptido bloqueante de PD-L1.
11. El vector HSV de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, donde el casete de expresión se inserta en una región de repetición interna, una región de repetición terminal, entre los genes US1 y US2, los genes virales UL3 y UL4, o los genes UL50 y UL51.
- 30 12. El vector HSV de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, que comprende además un NFkB y un elemento potenciador de OCT4/SOX2 en las regiones reguladoras ICP4 o ICP27.
y/o en donde los genes ICP34.5 están eliminados,
y/o en donde el casete de expresión comprende al menos un promotor celular,
y/o en donde el HSV es HSV-1 o HSV-2,
- 35 y/o en donde el gen ICP34.5 está regulado por una 3'UTR que contiene secuencias objetivo de miRNAs que están infraexpresadas en células tumorales.
13. Una composición farmacéutica que comprende un vector HSV según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 40 14. Un vector HSV según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, o una composición farmacéutica según la reivindicación 13 para su uso en un método de tratamiento del cáncer, que comprende administrar a un paciente el vector HSV o la composición farmacéutica.
15. El vector HSV o la composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 14, en donde dicho cáncer se selecciona del grupo que consiste en carcinomas, leucemias, linfomas, mielomas y sarcomas.

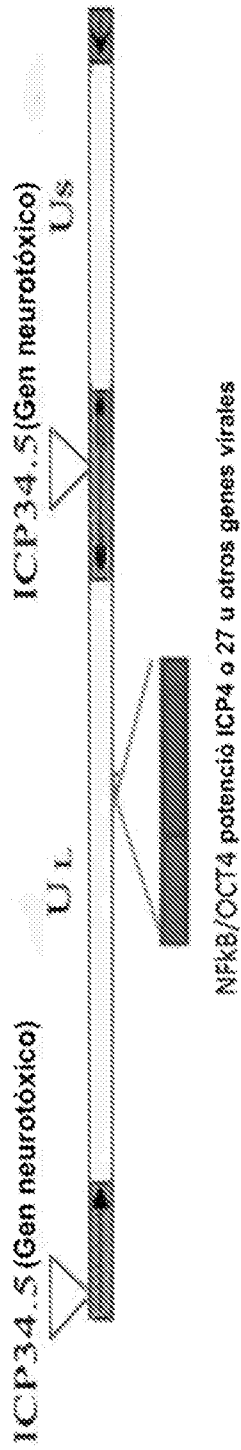


FIG. 1A

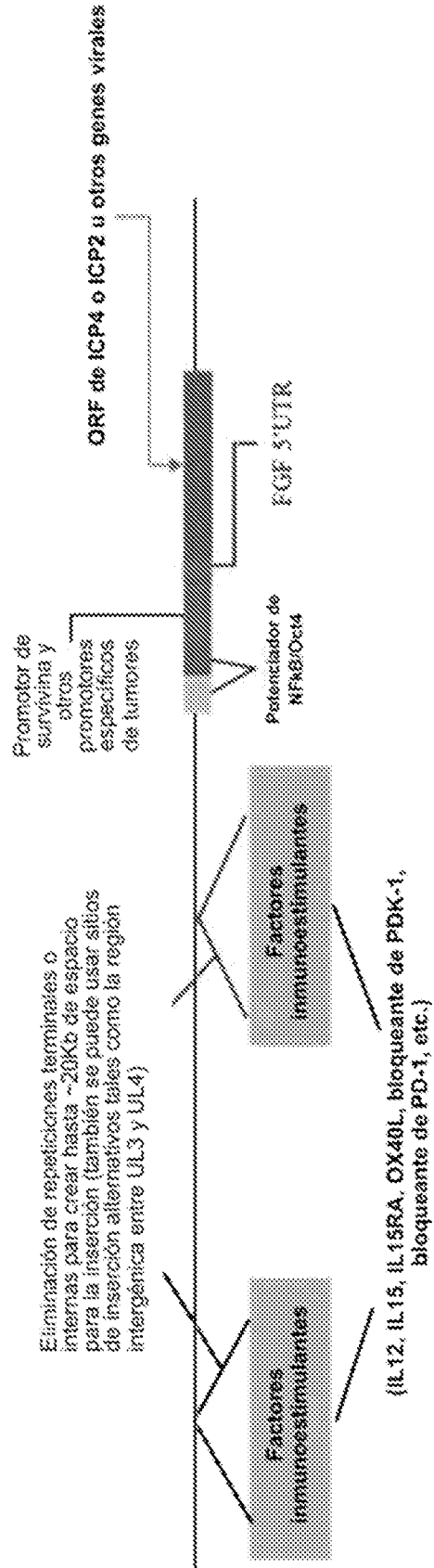


FIG. 1B

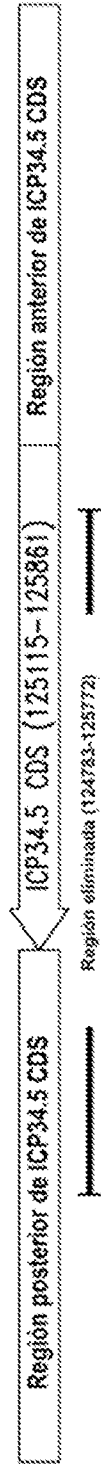


FIG. 2

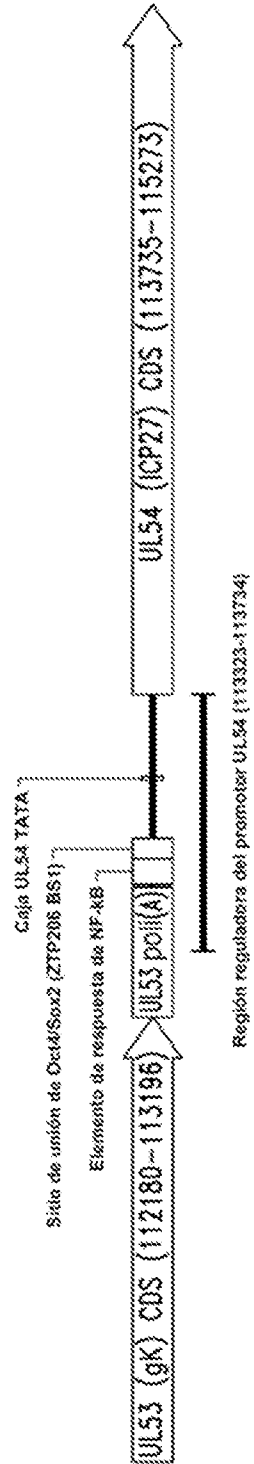


FIG. 3

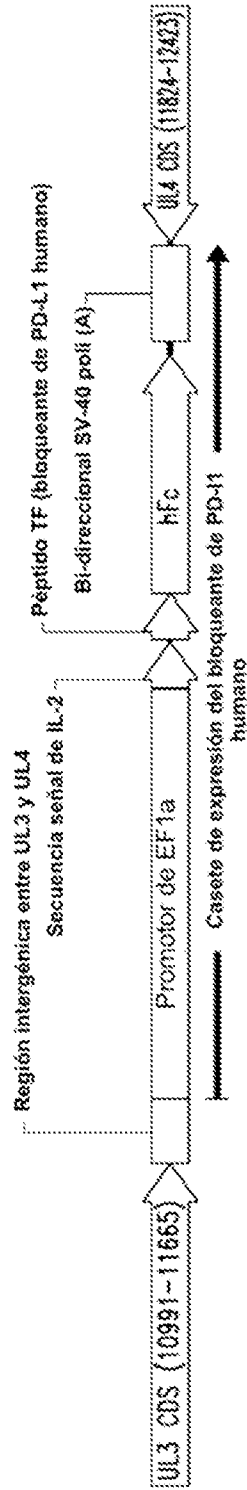


FIG. 4

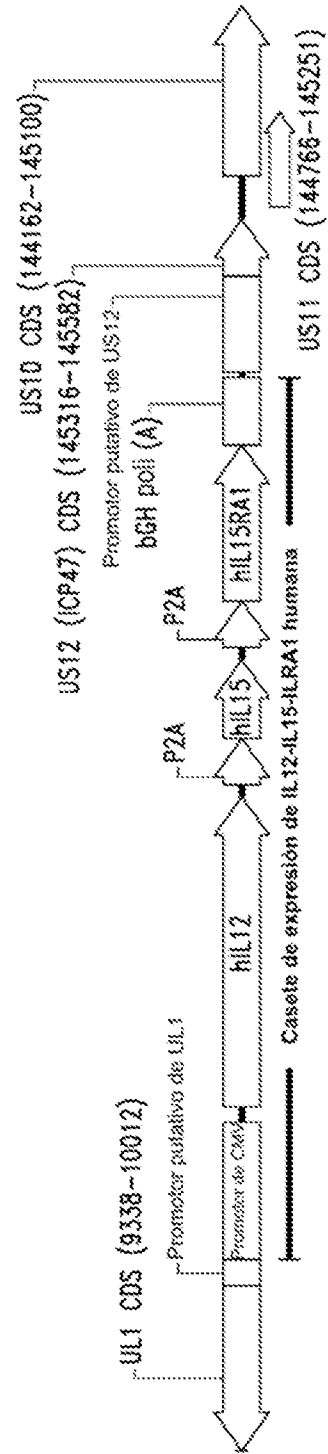


FIG. 5

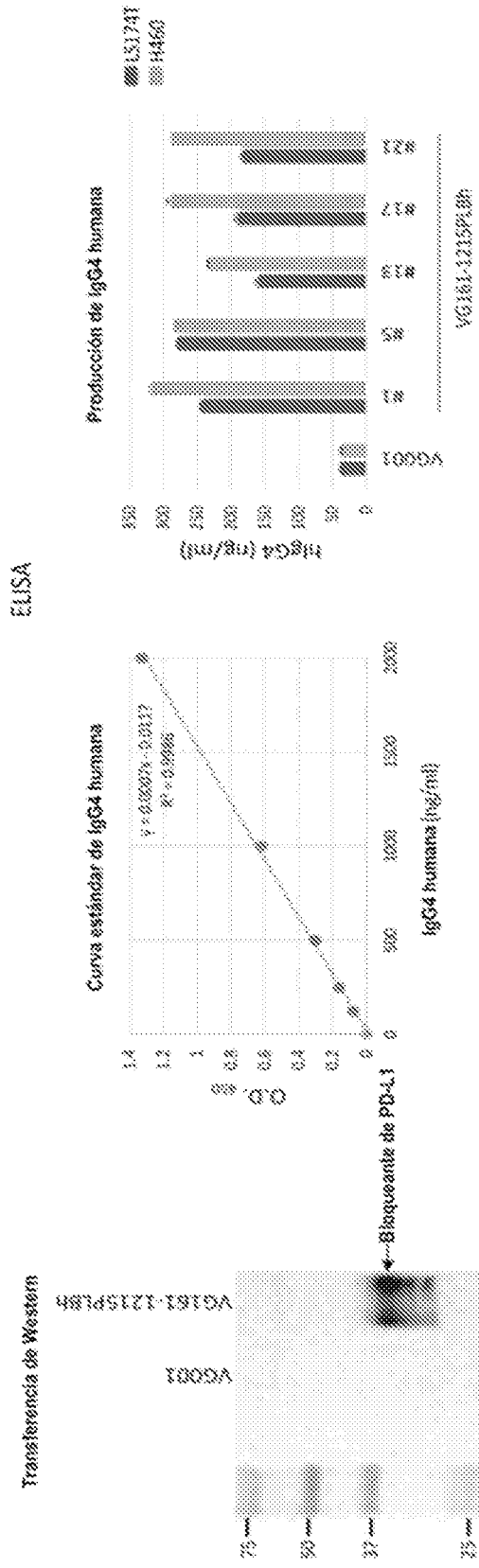


FIG. 8C

FIG. 8B

FIG. 8A

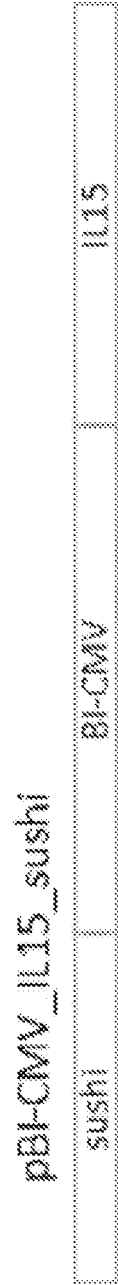


FIG. 9A

*** 2A
K5
E5

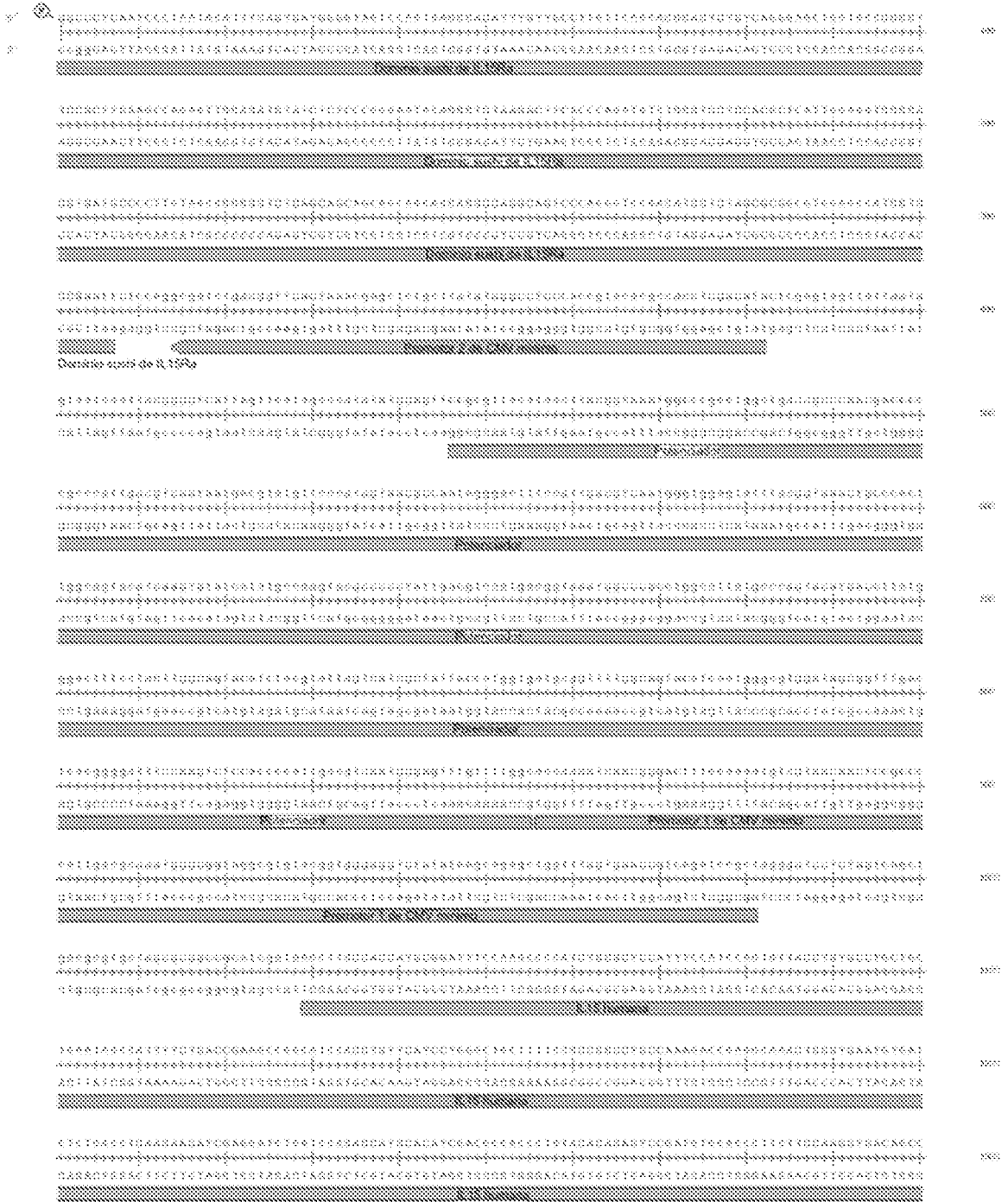


FIG. 9B

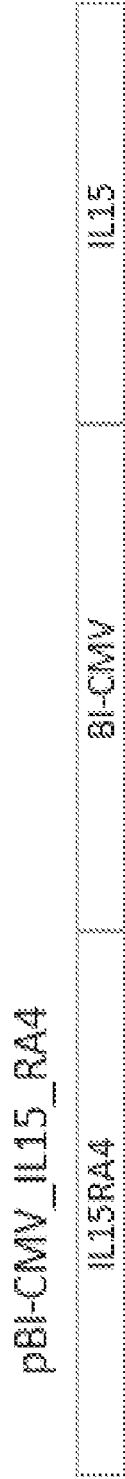


FIG. 10A

*** 2A

K5

E5

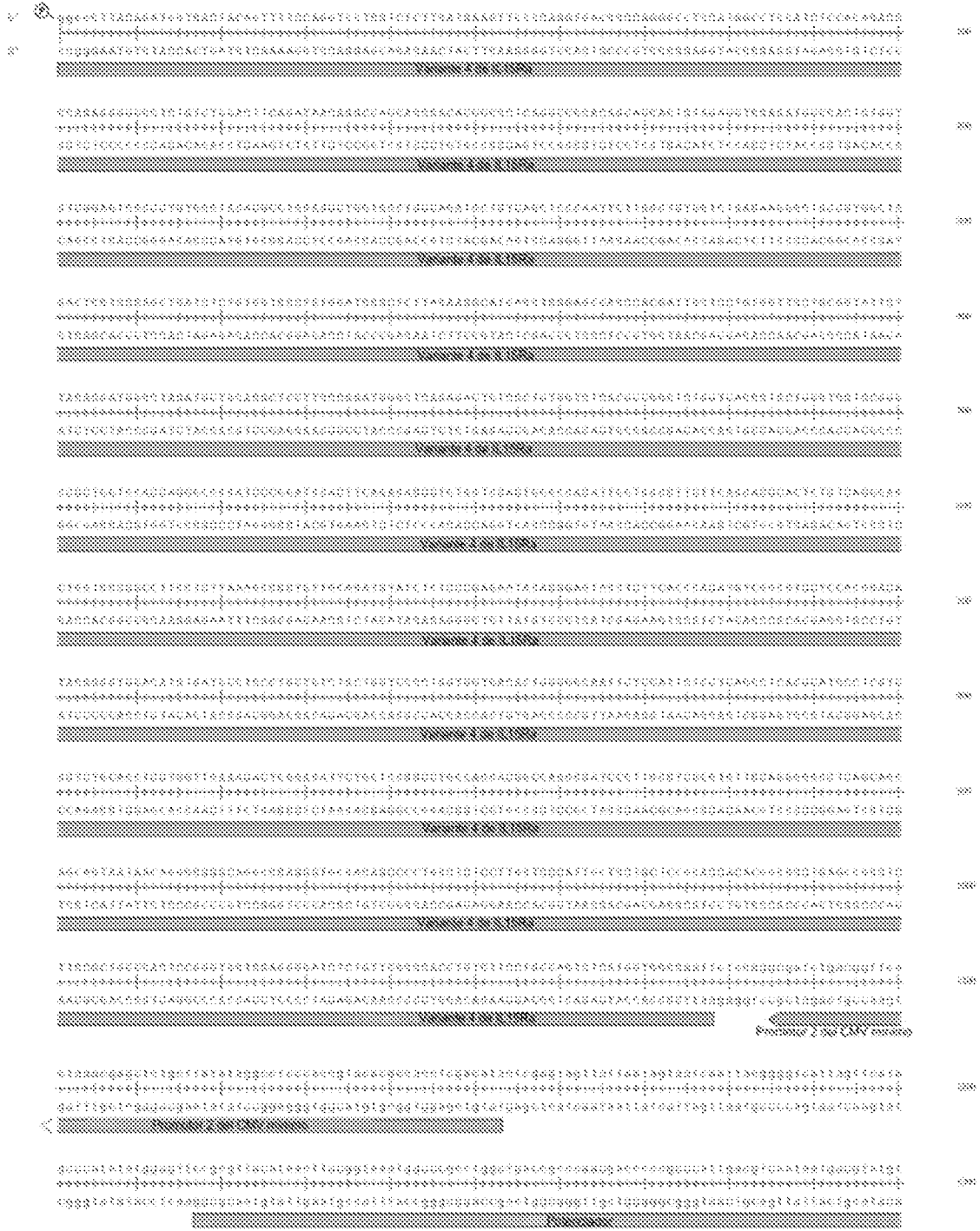


FIG. 10B

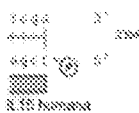
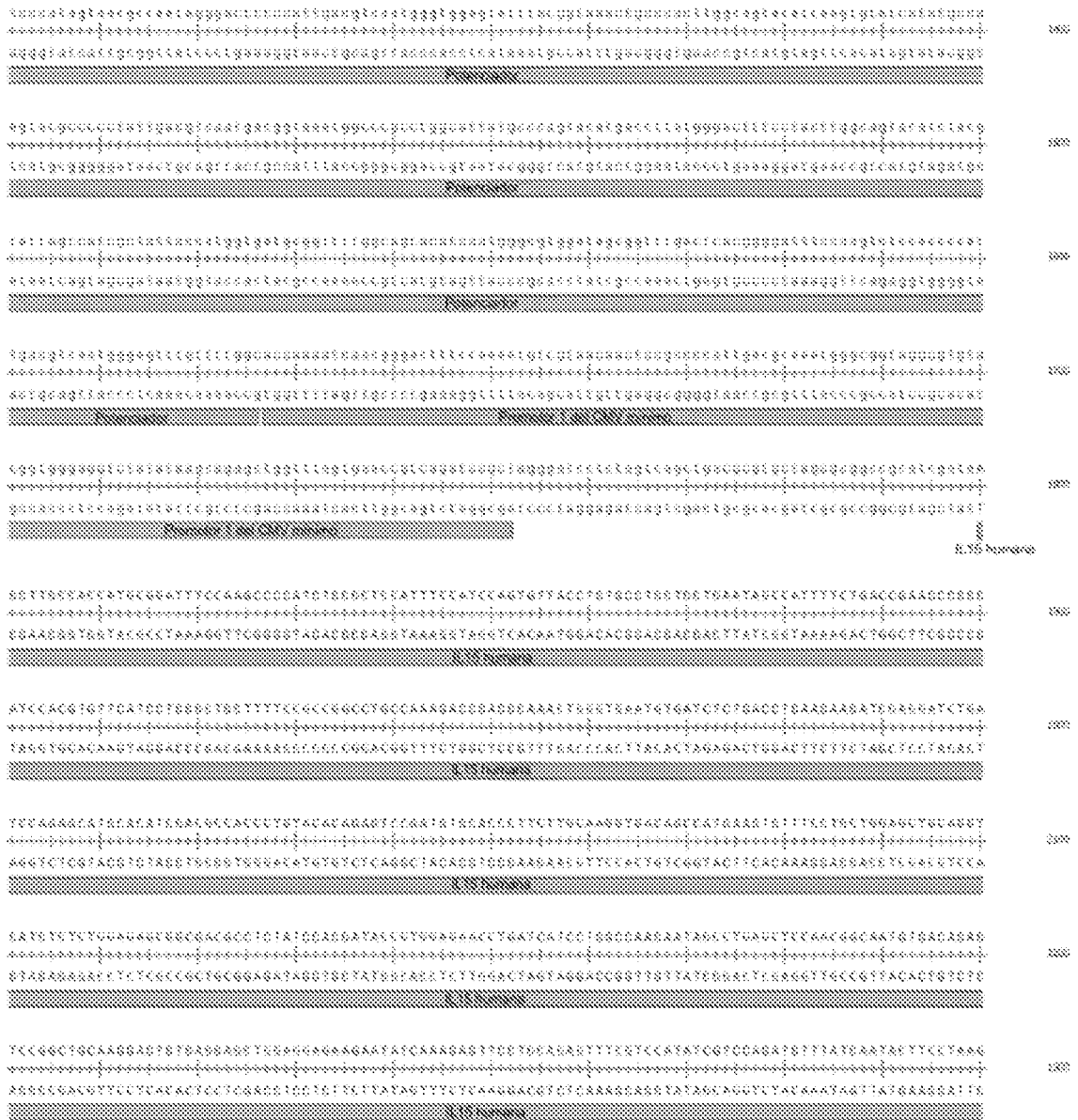


FIG. 10C

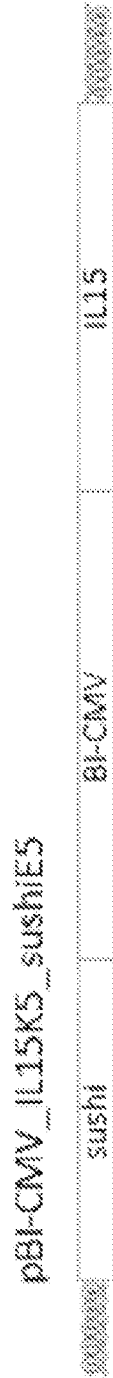


FIG. 11A

- *** 2A
- ##### K5
- ##### E5

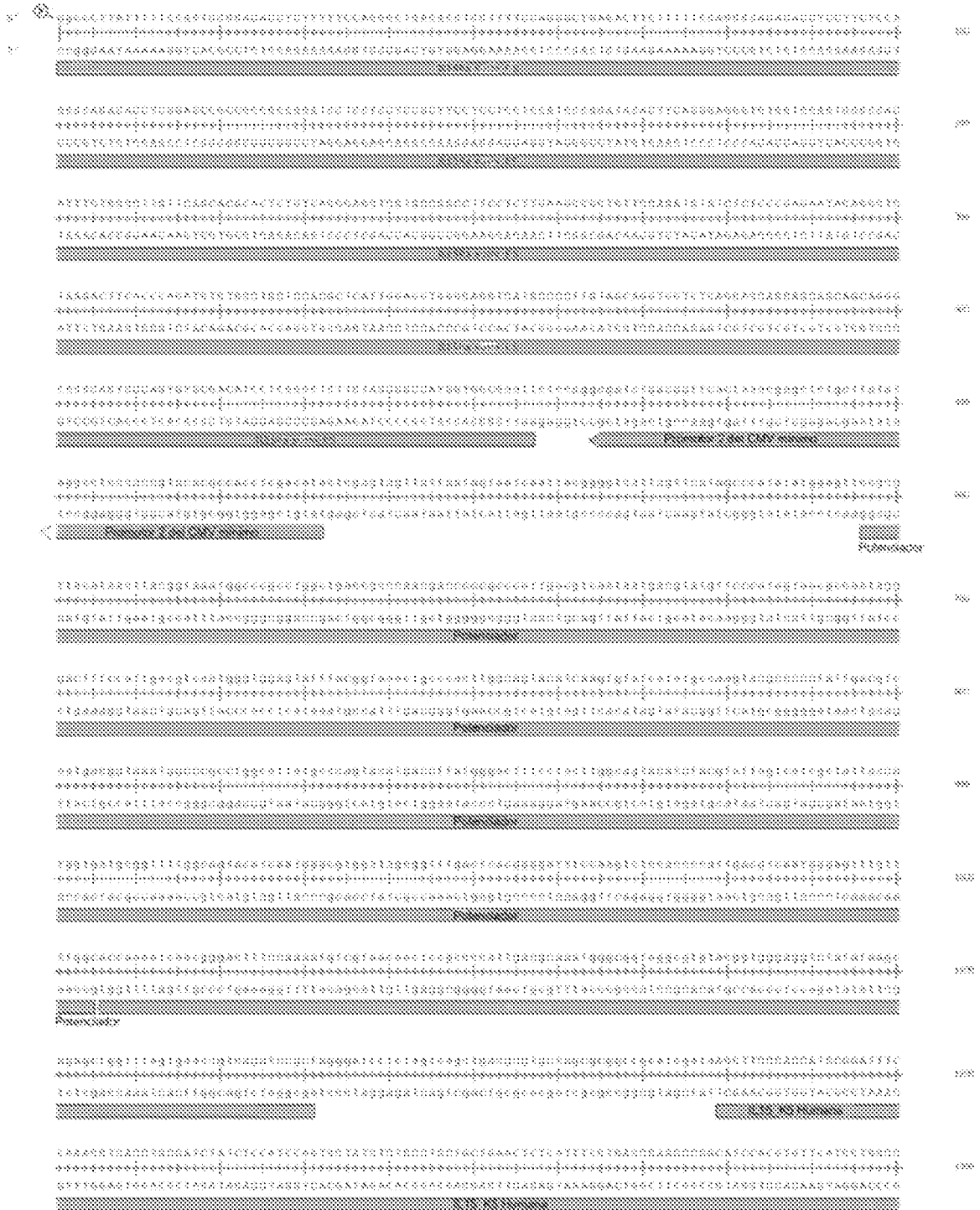


FIG. 11B

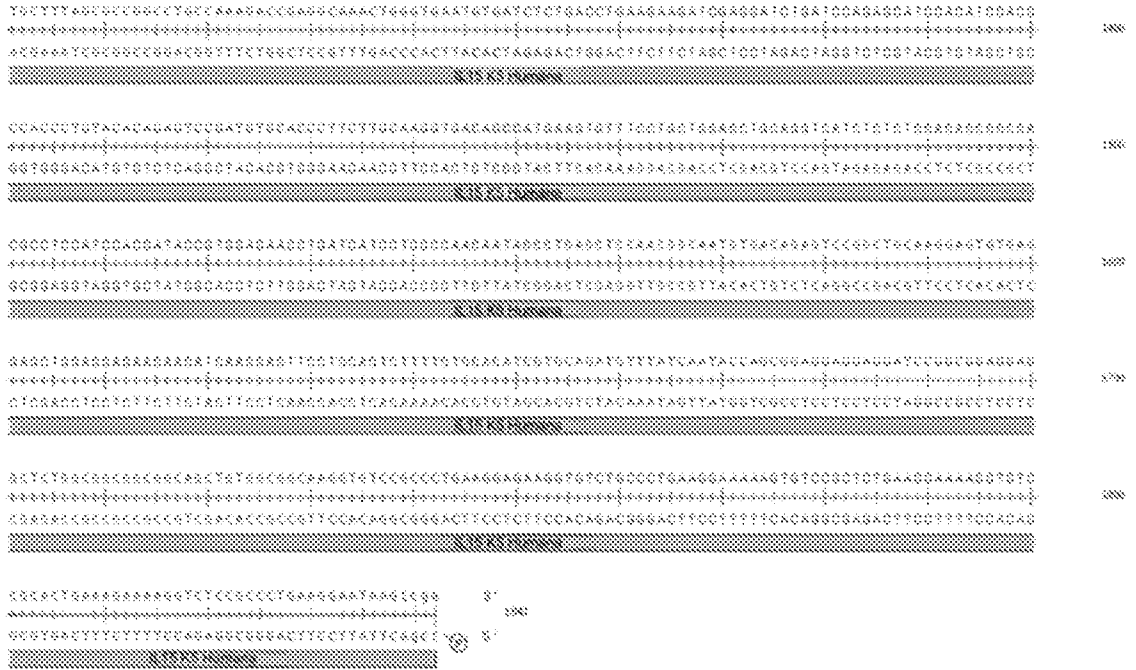


FIG. 11C

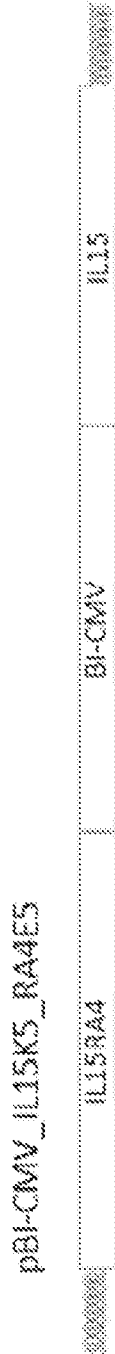


FIG. 12A

*** 2A
K5
E5

57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 101 102 103 104 105 106 107 108 109 110 111 112 113 114 115 116 117 118 119 120 121 122 123 124 125 126 127 128 129 130 131 132 133 134 135 136 137 138 139 140 141 142 143 144 145 146 147 148 149 150 151 152 153 154 155 156 157 158 159 160 161 162 163 164 165 166 167 168 169 170 171 172 173 174 175 176 177 178 179 180 181 182 183 184 185 186 187 188 189 190 191 192 193 194 195 196 197 198 199 200 201 202 203 204 205 206 207 208 209 210 211 212 213 214 215 216 217 218 219 220 221 222 223 224 225 226 227 228 229 230 231 232 233 234 235 236 237 238 239 240 241 242 243 244 245 246 247 248 249 250 251 252 253 254 255 256 257 258 259 260 261 262 263 264 265 266 267 268 269 270 271 272 273 274 275 276 277 278 279 280 281 282 283 284 285 286 287 288 289 290 291 292 293 294 295 296 297 298 299 300 301 302 303 304 305 306 307 308 309 310 311 312 313 314 315 316 317 318 319 320 321 322 323 324 325 326 327 328 329 330 331 332 333 334 335 336 337 338 339 340 341 342 343 344 345 346 347 348 349 350 351 352 353 354 355 356 357 358 359 360 361 362 363 364 365 366 367 368 369 370 371 372 373 374 375 376 377 378 379 380 381 382 383 384 385 386 387 388 389 390 391 392 393 394 395 396 397 398 399 400 401 402 403 404 405 406 407 408 409 410 411 412 413 414 415 416 417 418 419 420 421 422 423 424 425 426 427 428 429 430 431 432 433 434 435 436 437 438 439 440 441 442 443 444 445 446 447 448 449 450 451 452 453 454 455 456 457 458 459 460 461 462 463 464 465 466 467 468 469 470 471 472 473 474 475 476 477 478 479 480 481 482 483 484 485 486 487 488 489 490 491 492 493 494 495 496 497 498 499 500 501 502 503 504 505 506 507 508 509 510 511 512 513 514 515 516 517 518 519 520 521 522 523 524 525 526 527 528 529 530 531 532 533 534 535 536 537 538 539 540 541 542 543 544 545 546 547 548 549 550 551 552 553 554 555 556 557 558 559 560 561 562 563 564 565 566 567 568 569 570 571 572 573 574 575 576 577 578 579 580 581 582 583 584 585 586 587 588 589 590 591 592 593 594 595 596 597 598 599 600 601 602 603 604 605 606 607 608 609 610 611 612 613 614 615 616 617 618 619 620 621 622 623 624 625 626 627 628 629 630 631 632 633 634 635 636 637 638 639 640 641 642 643 644 645 646 647 648 649 650 651 652 653 654 655 656 657 658 659 660 661 662 663 664 665 666 667 668 669 670 671 672 673 674 675 676 677 678 679 680 681 682 683 684 685 686 687 688 689 690 691 692 693 694 695 696 697 698 699 700 701 702 703 704 705 706 707 708 709 710 711 712 713 714 715 716 717 718 719 720 721 722 723 724 725 726 727 728 729 730 731 732 733 734 735 736 737 738 739 740 741 742 743 744 745 746 747 748 749 750 751 752 753 754 755 756 757 758 759 760 761 762 763 764 765 766 767 768 769 770 771 772 773 774 775 776 777 778 779 780 781 782 783 784 785 786 787 788 789 790 791 792 793 794 795 796 797 798 799 800 801 802 803 804 805 806 807 808 809 810 811 812 813 814 815 816 817 818 819 820 821 822 823 824 825 826 827 828 829 830 831 832 833 834 835 836 837 838 839 840 841 842 843 844 845 846 847 848 849 850 851 852 853 854 855 856 857 858 859 860 861 862 863 864 865 866 867 868 869 870 871 872 873 874 875 876 877 878 879 880 881 882 883 884 885 886 887 888 889 890 891 892 893 894 895 896 897 898 899 900 901 902 903 904 905 906 907 908 909 910 911 912 913 914 915 916 917 918 919 920 921 922 923 924 925 926 927 928 929 930 931 932 933 934 935 936 937 938 939 940 941 942 943 944 945 946 947 948 949 950 951 952 953 954 955 956 957 958 959 960 961 962 963 964 965 966 967 968 969 970 971 972 973 974 975 976 977 978 979 980 981 982 983 984 985 986 987 988 989 990 991 992 993 994 995 996 997 998 999 1000

FIG. 12B



FIG. 12C

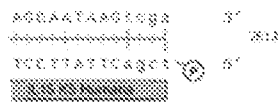


FIG. 12D

pEF1α-IL15-IRES-sushi



FIG. 13A

- 2A
- ////// 2B
- |||||| 2C

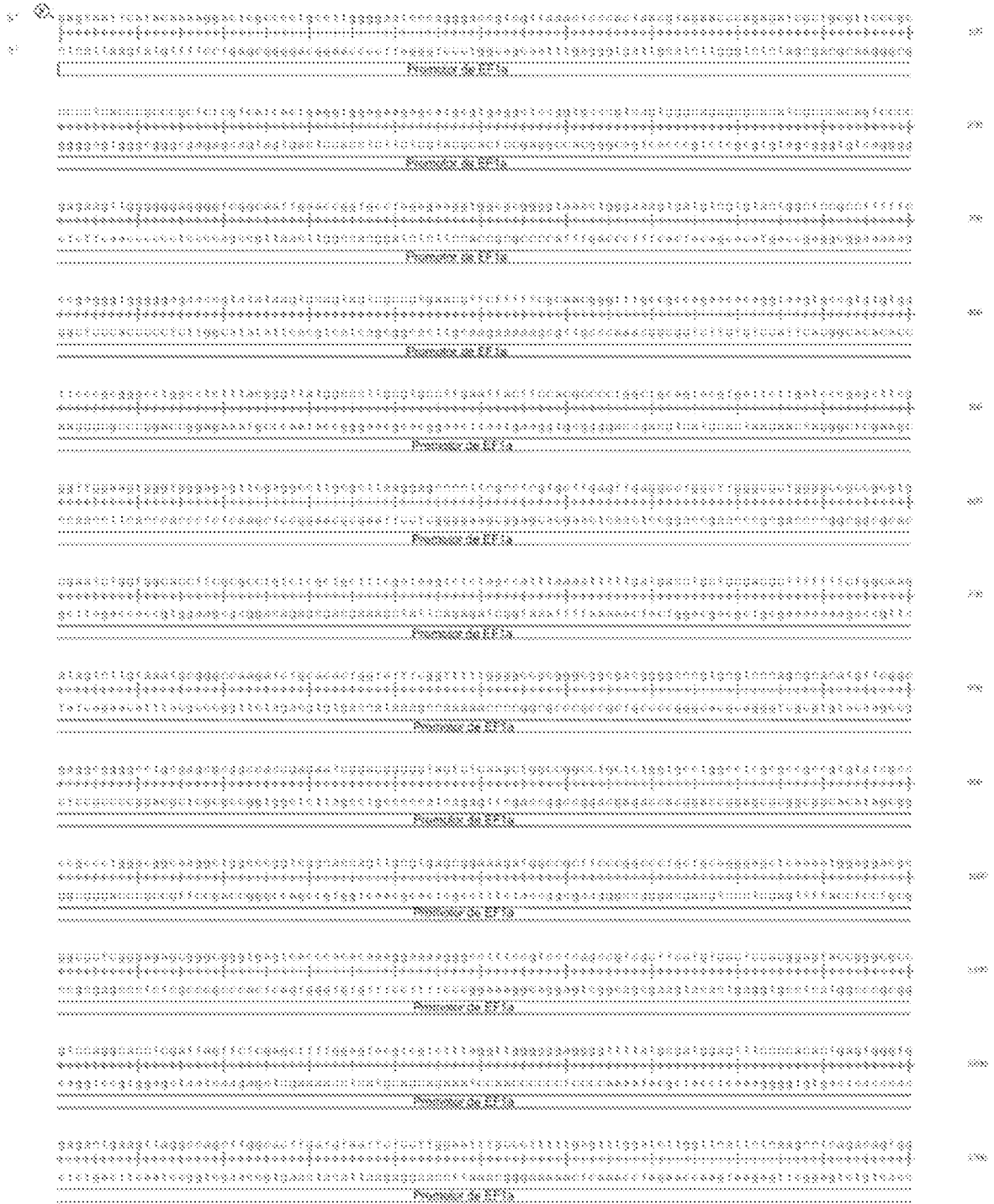


FIG. 13B

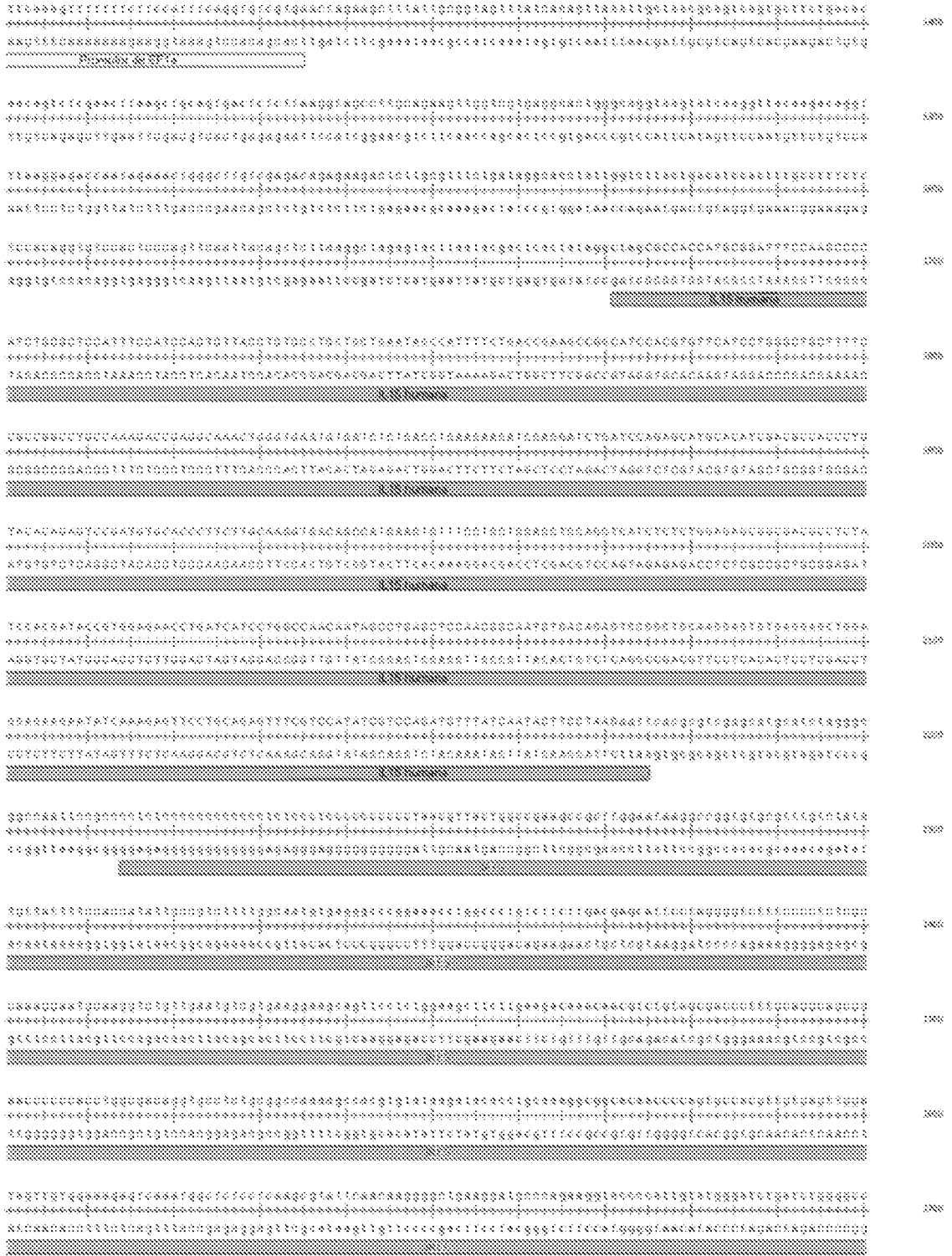


FIG. 13C

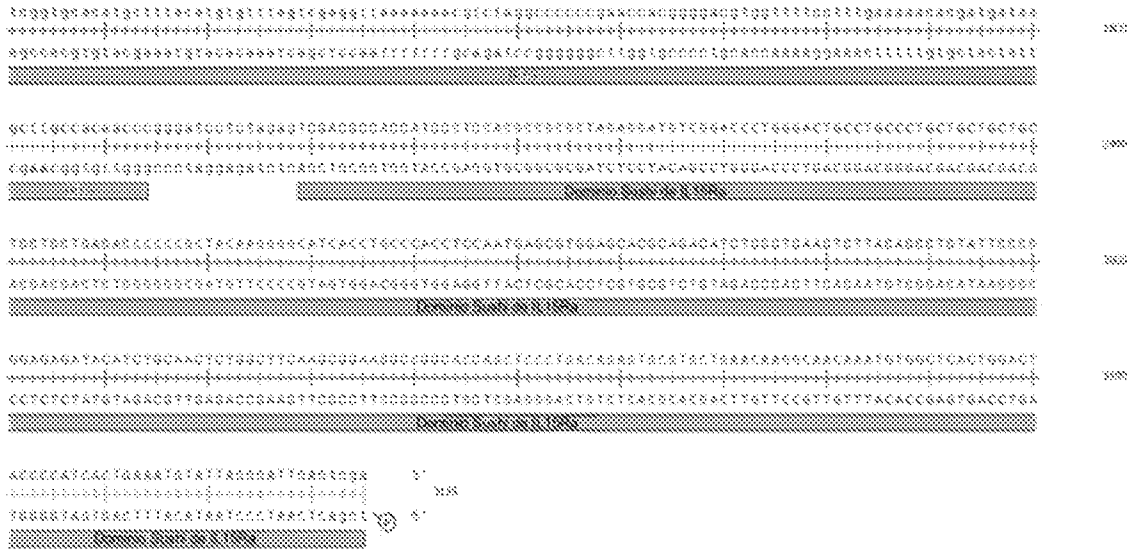


FIG. 13D

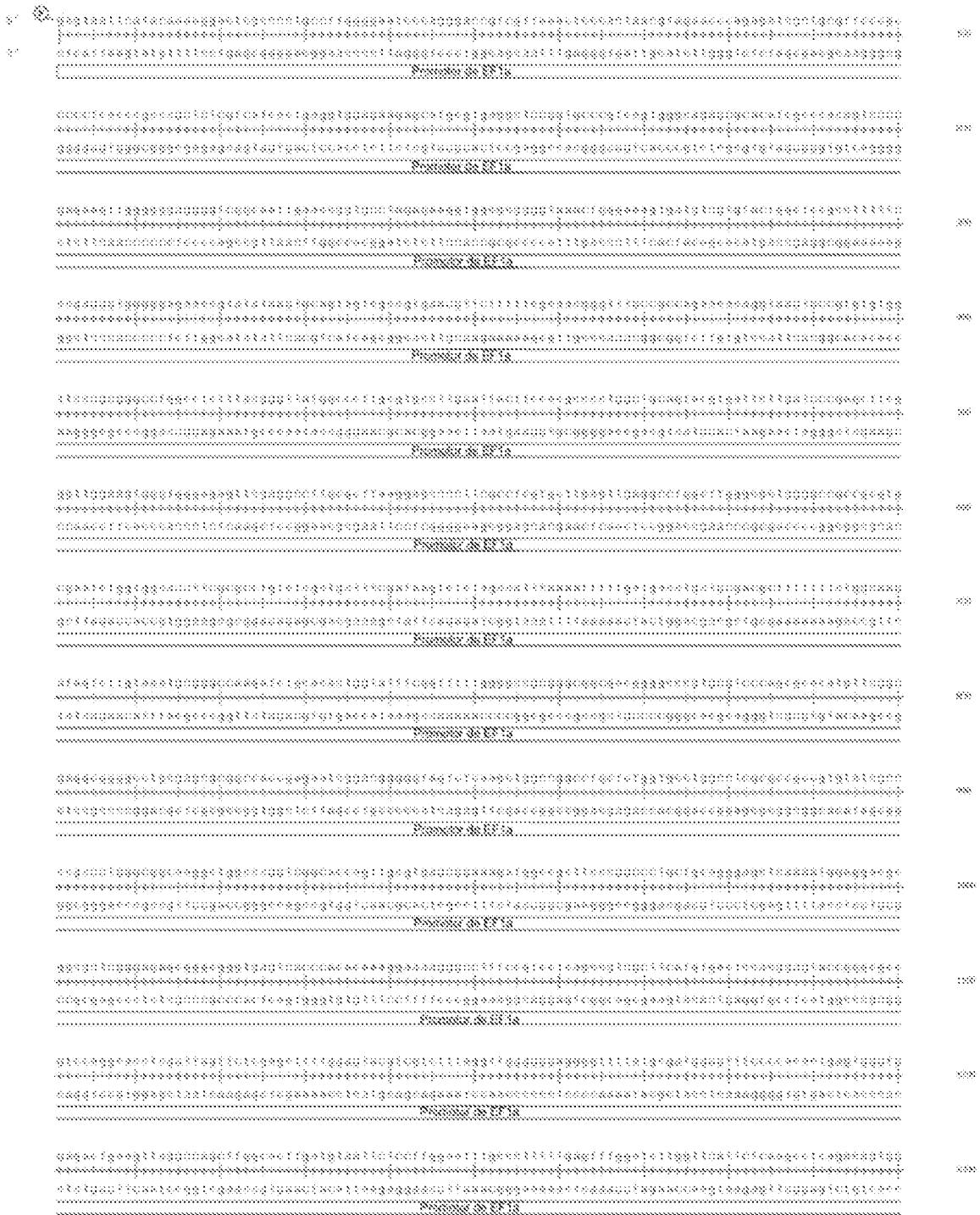


FIG. 14B

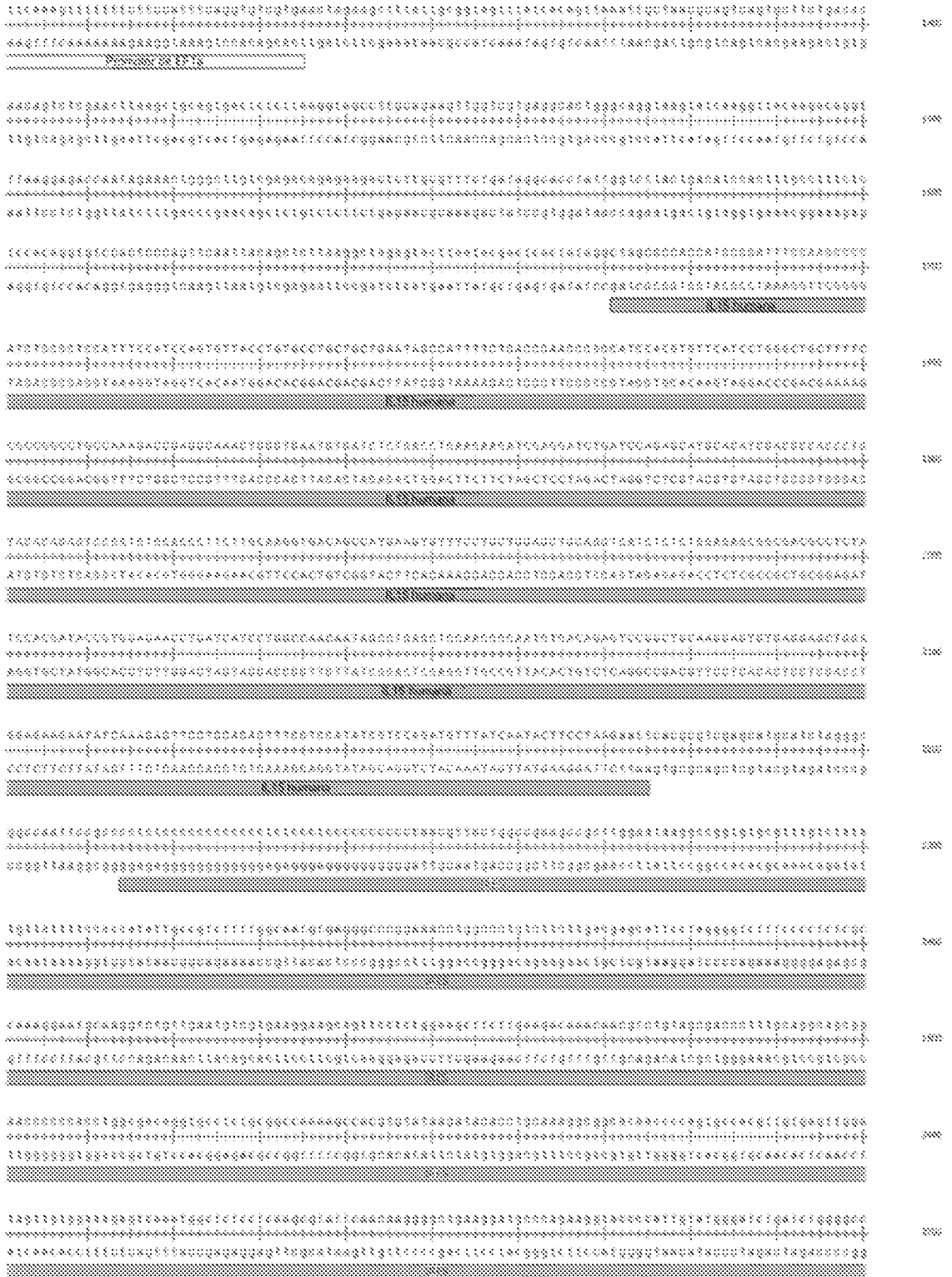


FIG. 14C

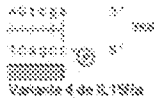
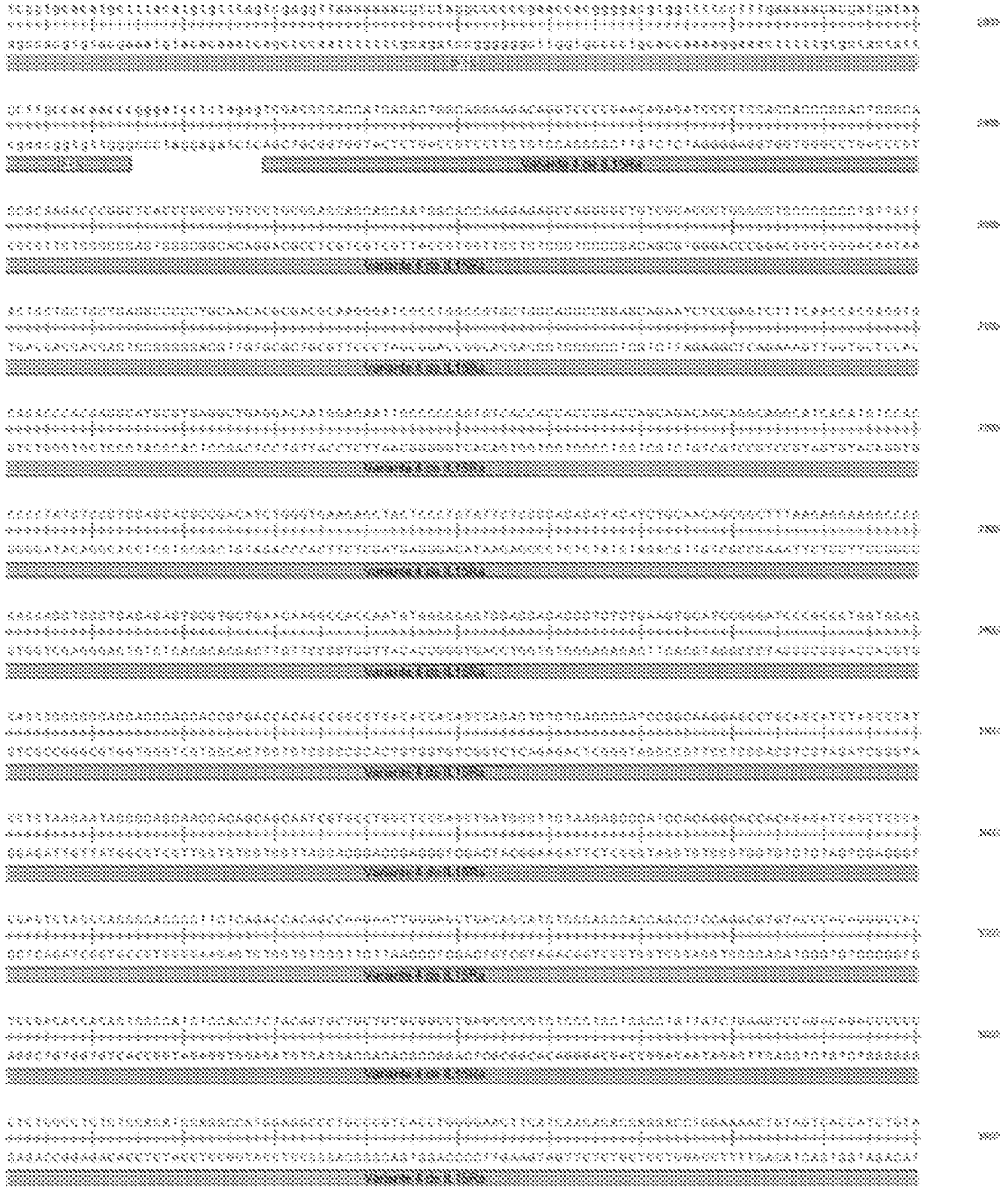


Figura 4 de la 125a

FIG. 14D

pEF1a-IL15K5-RES-sush1ES



FIG. 15A

*** 2/4
K5
E5

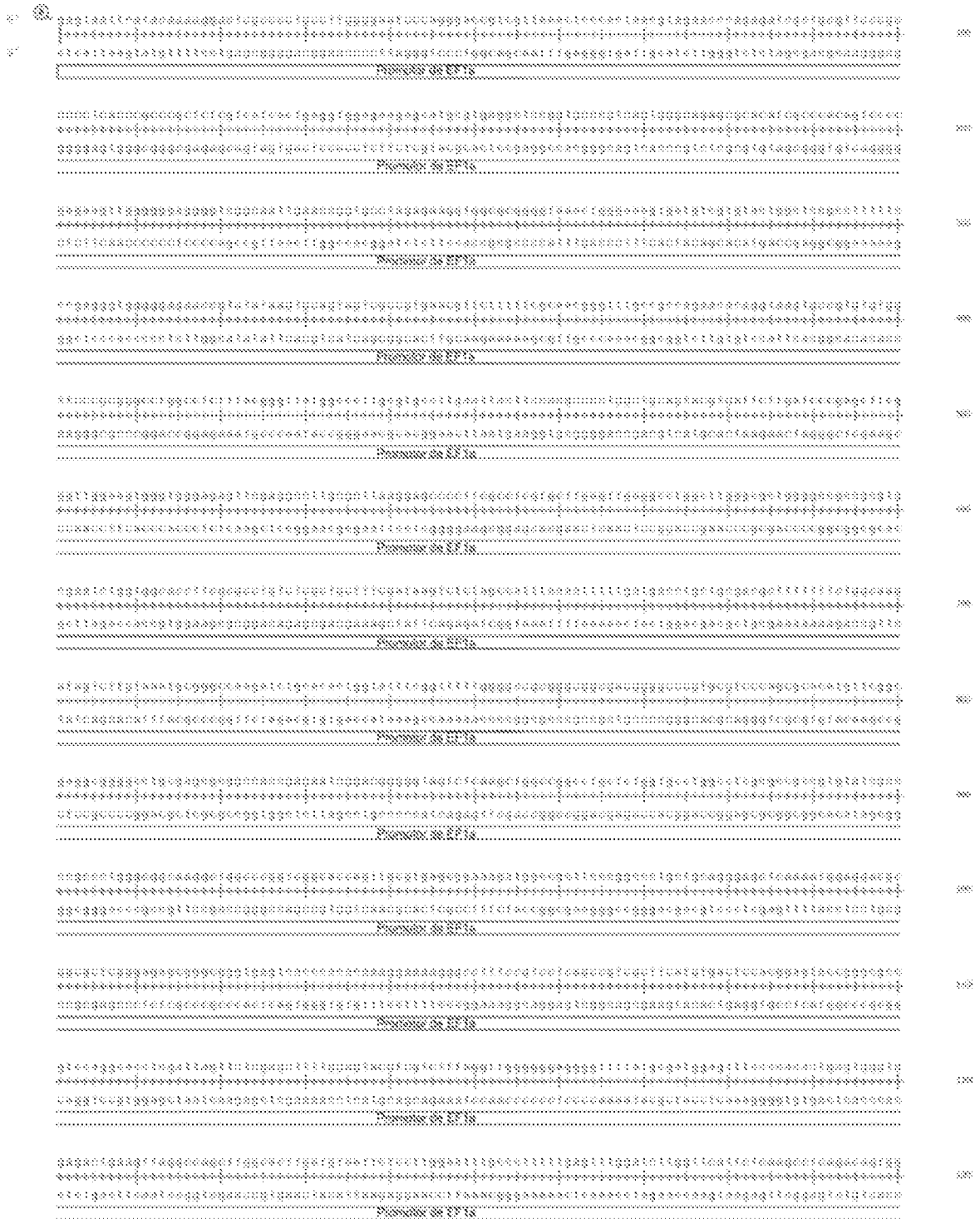


FIG. 15B

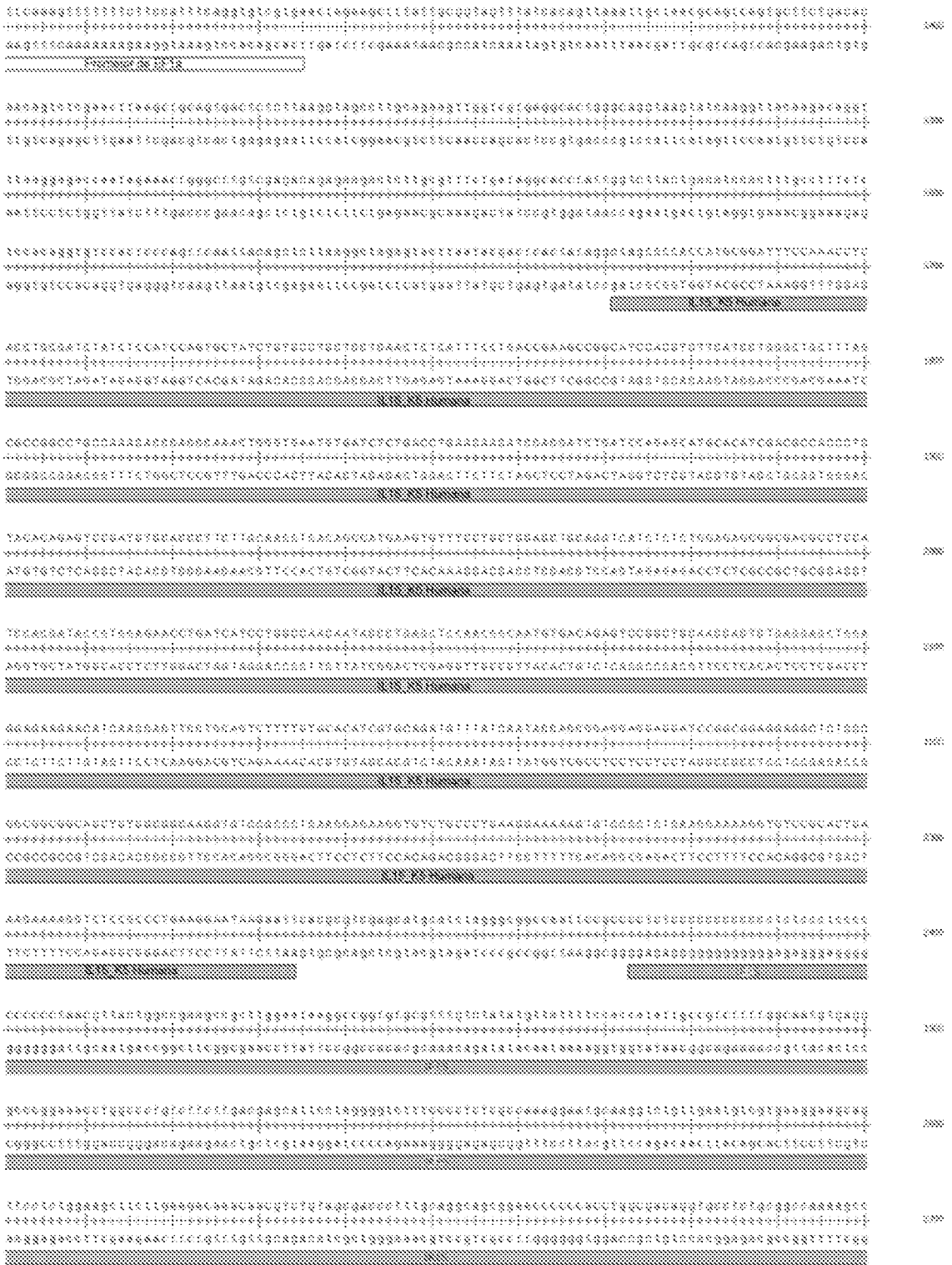


FIG. 15C

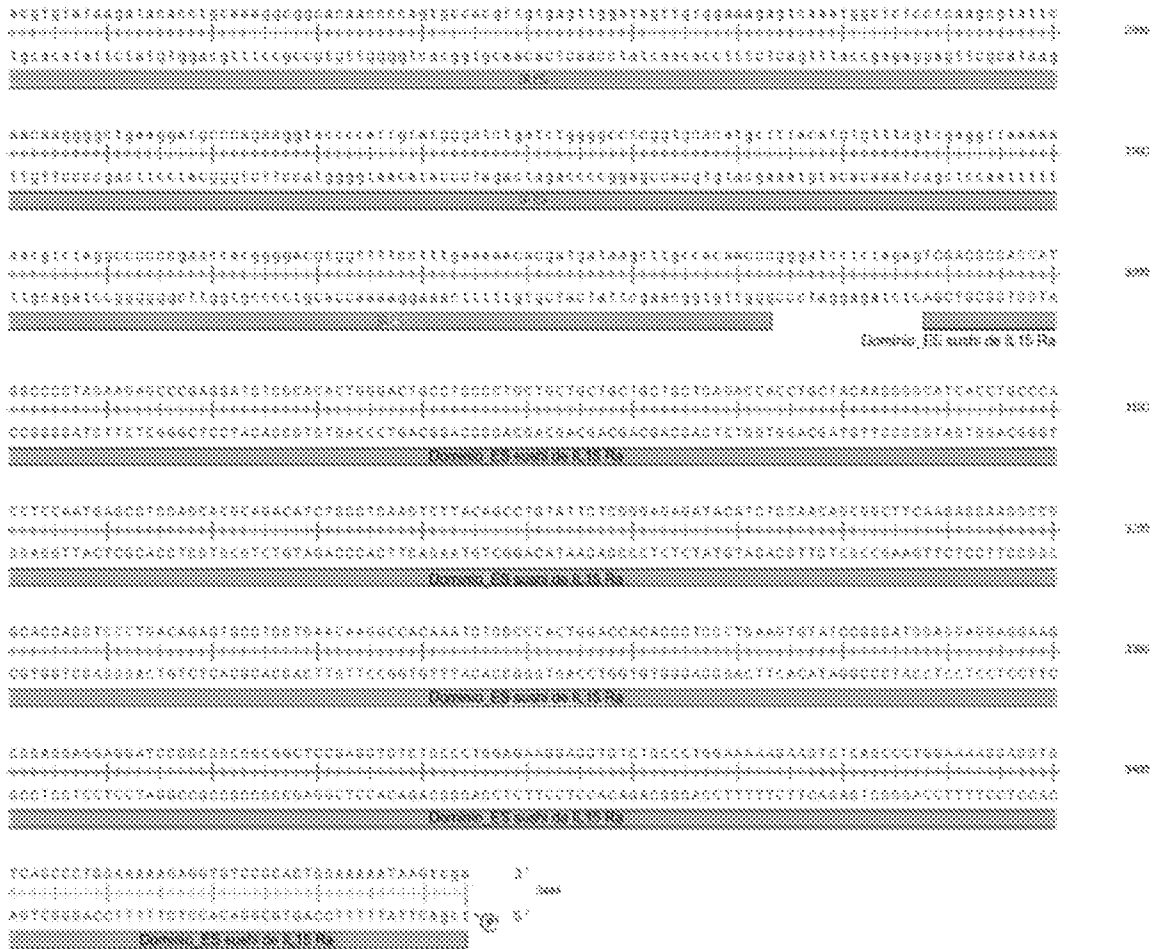


FIG. 15D

pEF1a-IL15-K5IRES-R4E5



FIG. 16A

*** 2A

K5

E5

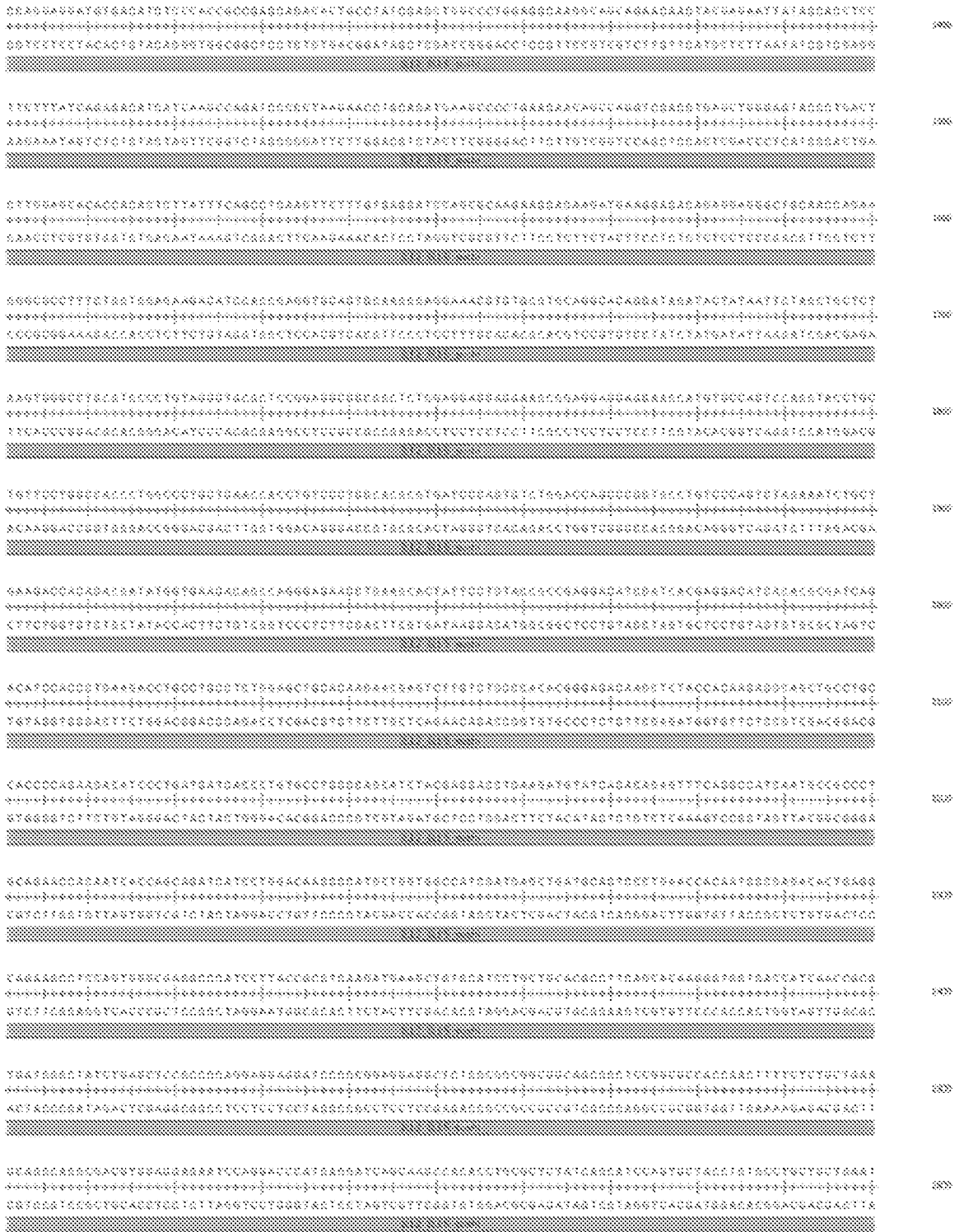


FIG. 16C



FIG. 16D



FIG. 17A



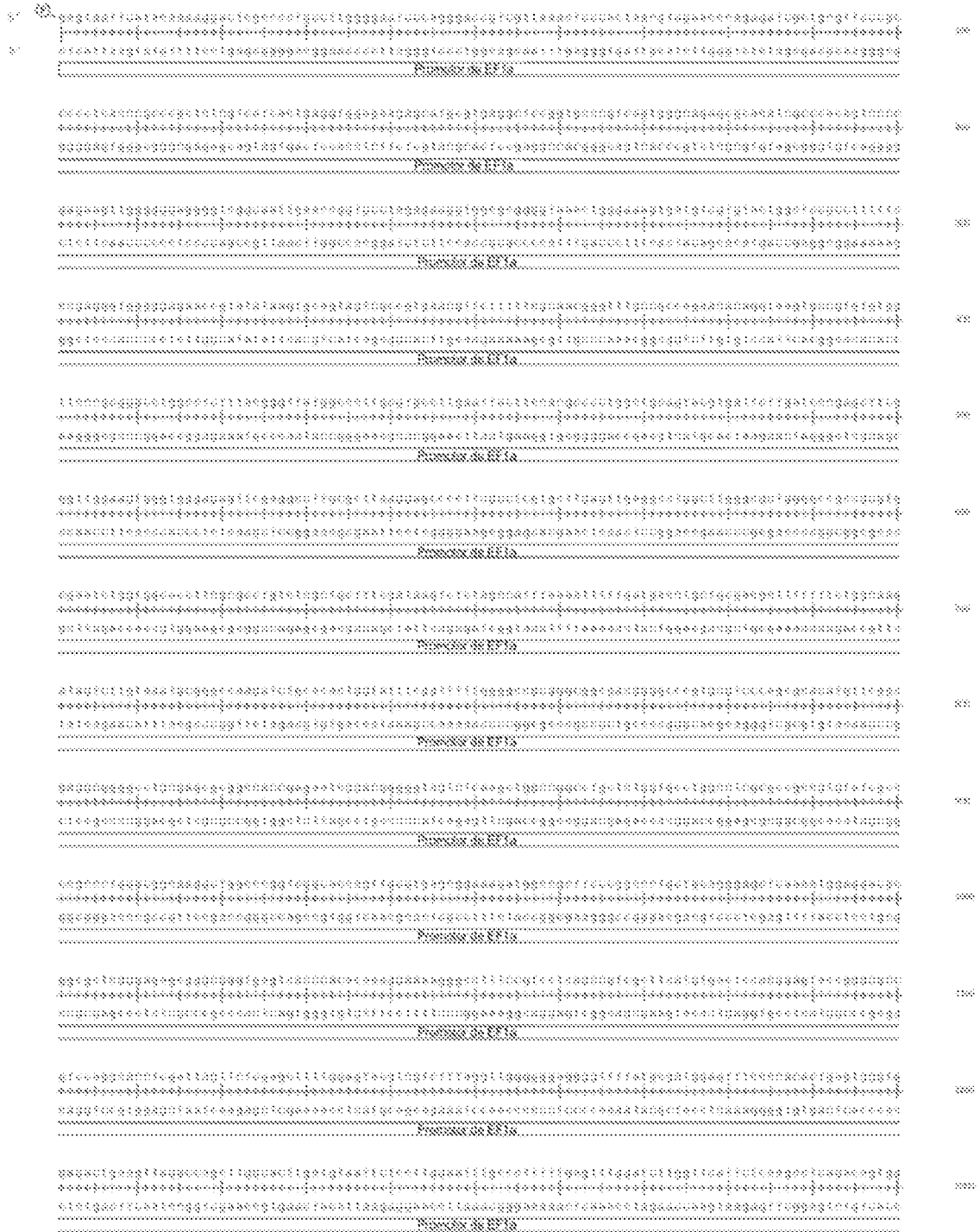


FIG. 17B

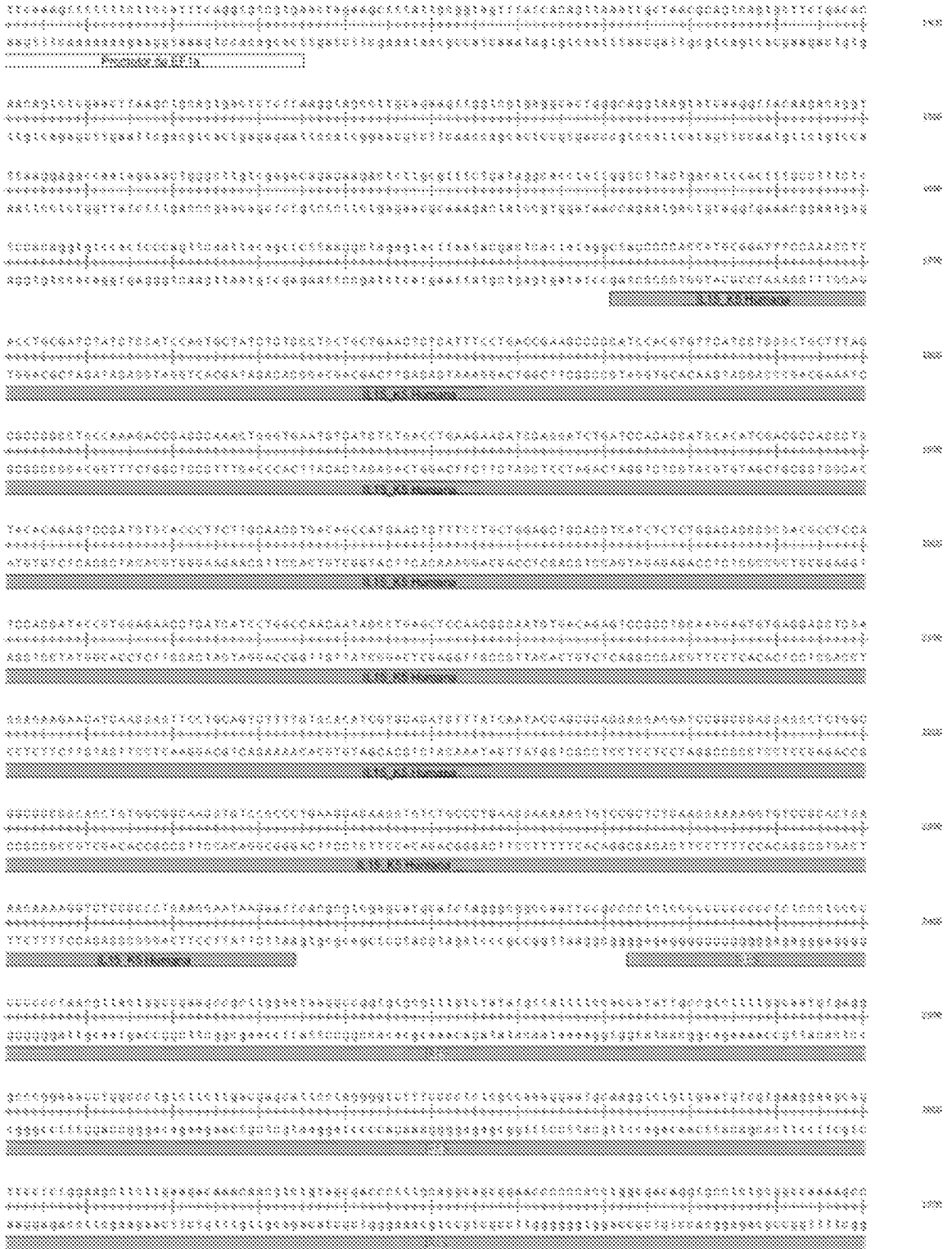


FIG. 17C



FIG. 18A

- *** 2A
- ▨ 2B
- ▨ 2C



FIG. 18D



FIG. 19A



1800
1820
1840
1860
1880
1900
1920
1940
1960
1980
2000
2020
2040
2060
2080
2100
2120
2140
2160
2180
2200
2220
2240
2260
2280
2300
2320
2340
2360
2380
2400
2420
2440
2460
2480
2500
2520
2540
2560
2580
2600
2620
2640
2660
2680
2700
2720
2740
2760
2780
2800
2820
2840
2860
2880
2900
2920
2940
2960
2980
3000
3020
3040
3060
3080
3100
3120
3140
3160
3180
3200
3220
3240
3260
3280
3300
3320
3340
3360
3380
3400
3420
3440
3460
3480
3500
3520
3540
3560
3580
3600
3620
3640
3660
3680
3700
3720
3740
3760
3780
3800
3820
3840
3860
3880
3900
3920
3940
3960
3980
4000
4020
4040
4060
4080
4100
4120
4140
4160
4180
4200
4220
4240
4260
4280
4300
4320
4340
4360
4380
4400
4420
4440
4460
4480
4500
4520
4540
4560
4580
4600
4620
4640
4660
4680
4700
4720
4740
4760
4780
4800
4820
4840
4860
4880
4900
4920
4940
4960
4980
5000
5020
5040
5060
5080
5100
5120
5140
5160
5180
5200
5220
5240
5260
5280
5300
5320
5340
5360
5380
5400
5420
5440
5460
5480
5500
5520
5540
5560
5580
5600
5620
5640
5660
5680
5700
5720
5740
5760
5780
5800
5820
5840
5860
5880
5900
5920
5940
5960
5980
6000
6020
6040
6060
6080
6100
6120
6140
6160
6180
6200
6220
6240
6260
6280
6300
6320
6340
6360
6380
6400
6420
6440
6460
6480
6500
6520
6540
6560
6580
6600
6620
6640
6660
6680
6700
6720
6740
6760
6780
6800
6820
6840
6860
6880
6900
6920
6940
6960
6980
7000
7020
7040
7060
7080
7100
7120
7140
7160
7180
7200
7220
7240
7260
7280
7300
7320
7340
7360
7380
7400
7420
7440
7460
7480
7500
7520
7540
7560
7580
7600
7620
7640
7660
7680
7700
7720
7740
7760
7780
7800
7820
7840
7860
7880
7900
7920
7940
7960
7980
8000
8020
8040
8060
8080
8100
8120
8140
8160
8180
8200
8220
8240
8260
8280
8300
8320
8340
8360
8380
8400
8420
8440
8460
8480
8500
8520
8540
8560
8580
8600
8620
8640
8660
8680
8700
8720
8740
8760
8780
8800
8820
8840
8860
8880
8900
8920
8940
8960
8980
9000
9020
9040
9060
9080
9100
9120
9140
9160
9180
9200
9220
9240
9260
9280
9300
9320
9340
9360
9380
9400
9420
9440
9460
9480
9500
9520
9540
9560
9580
9600
9620
9640
9660
9680
9700
9720
9740
9760
9780
9800
9820
9840
9860
9880
9900
9920
9940
9960
9980
10000

FIG. 19C

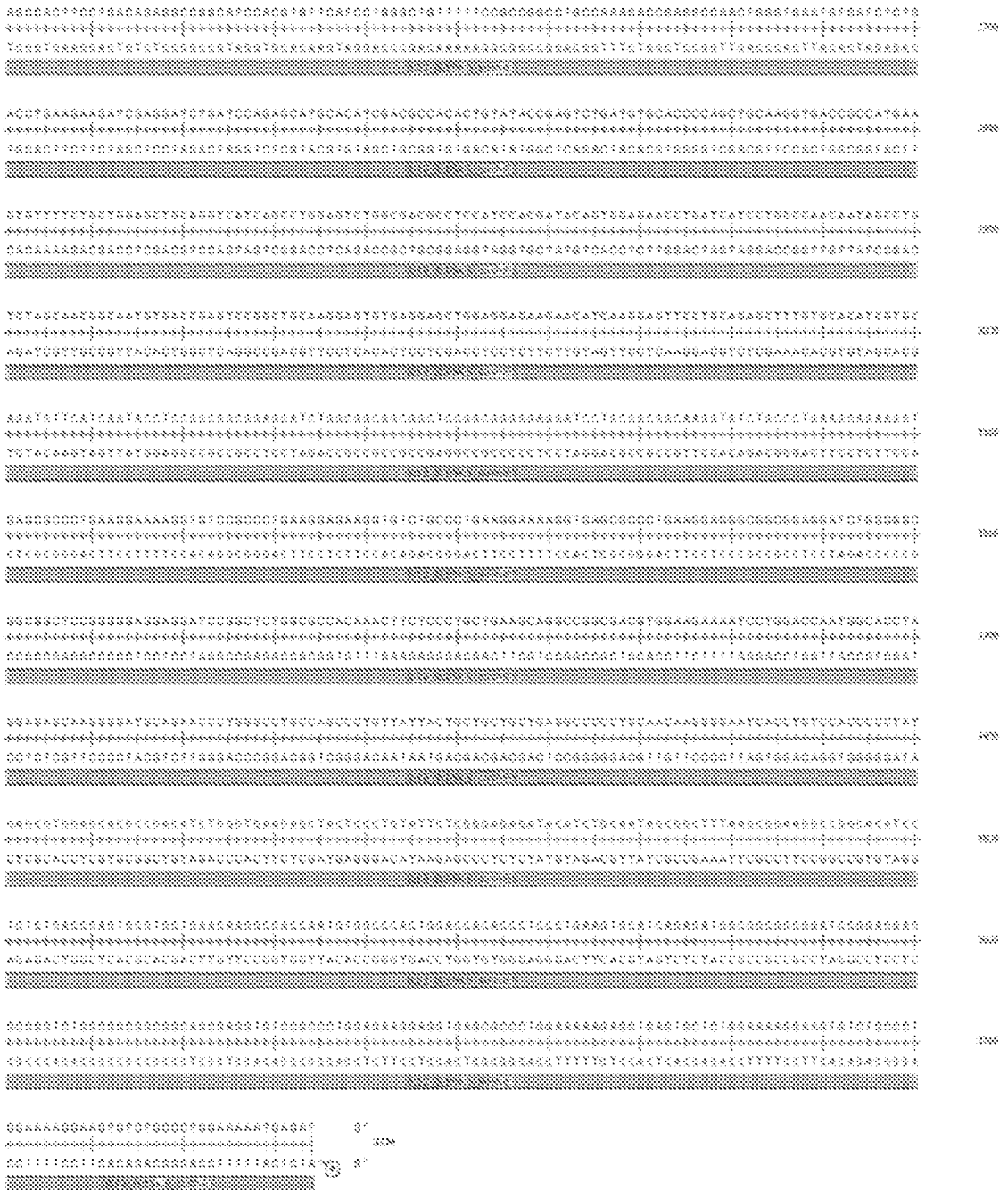


FIG. 19D



FIG. 20A

*** 2A
K5
E5

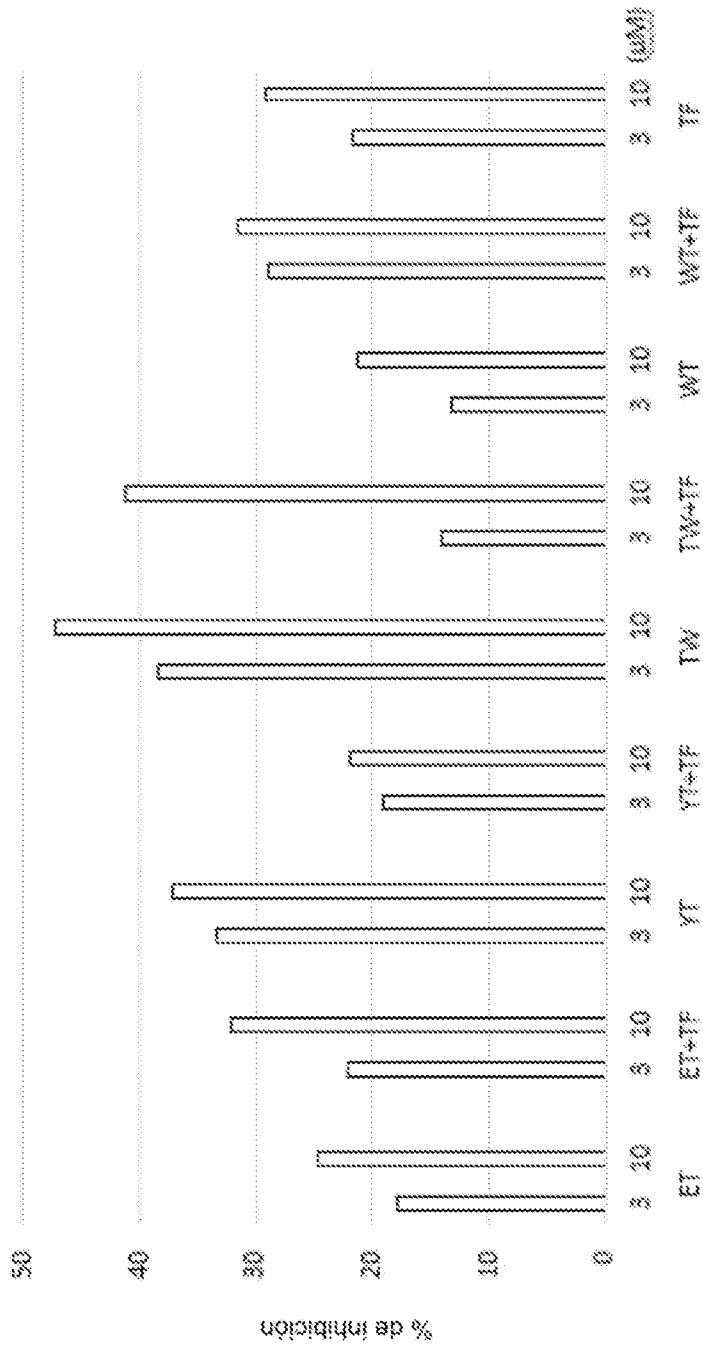


FIG. 21

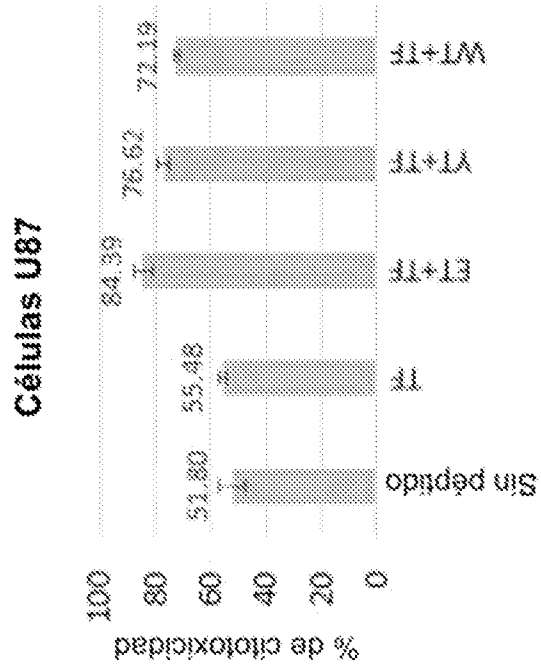


FIG. 22B

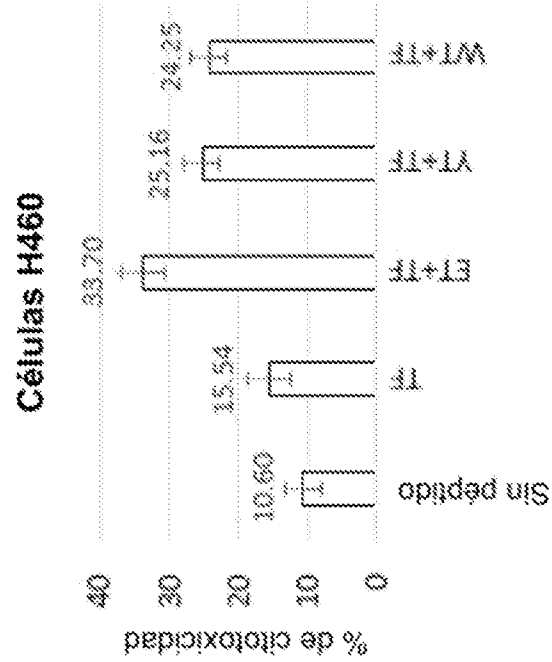
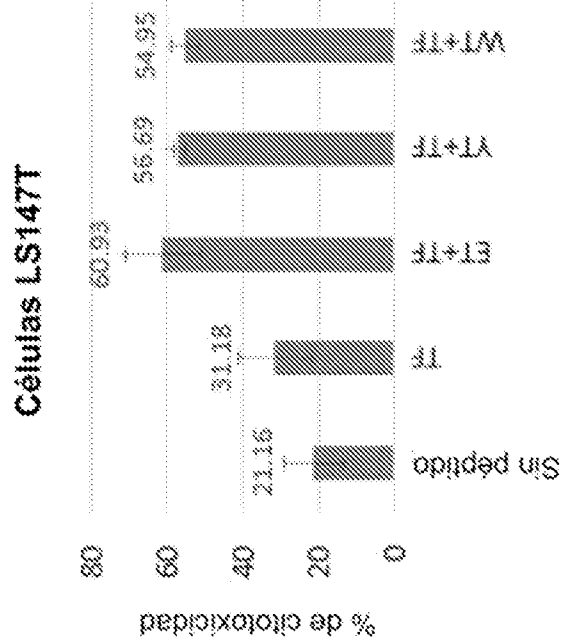
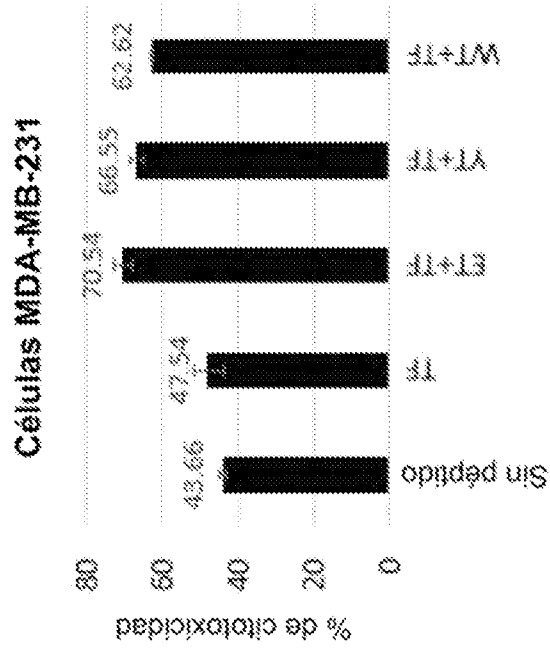


FIG. 22A



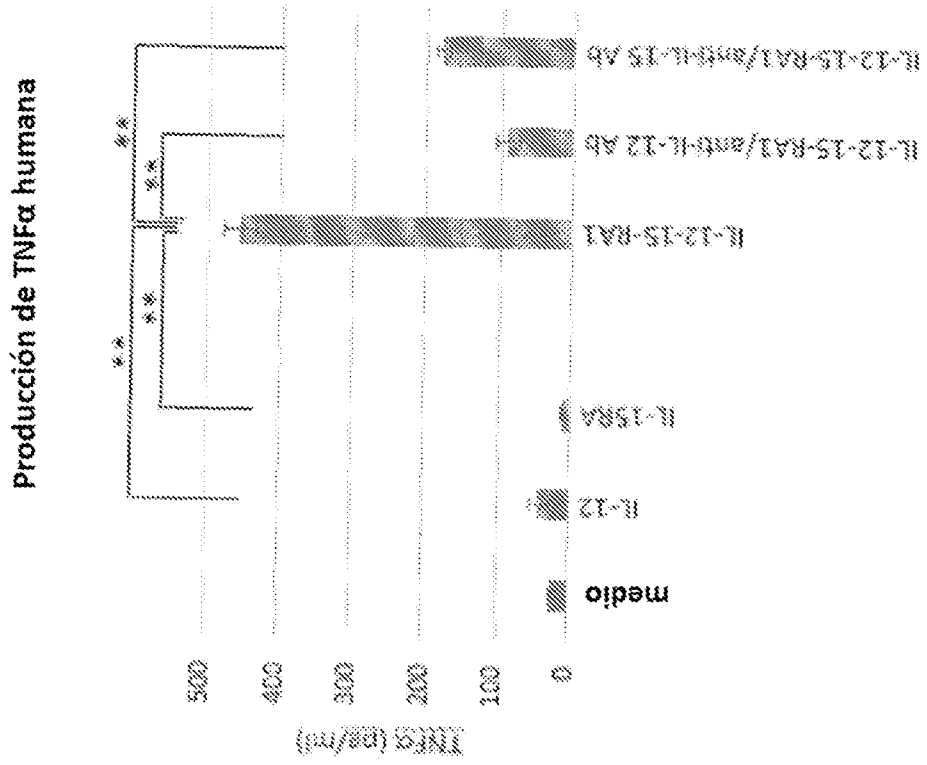


FIG. 23B

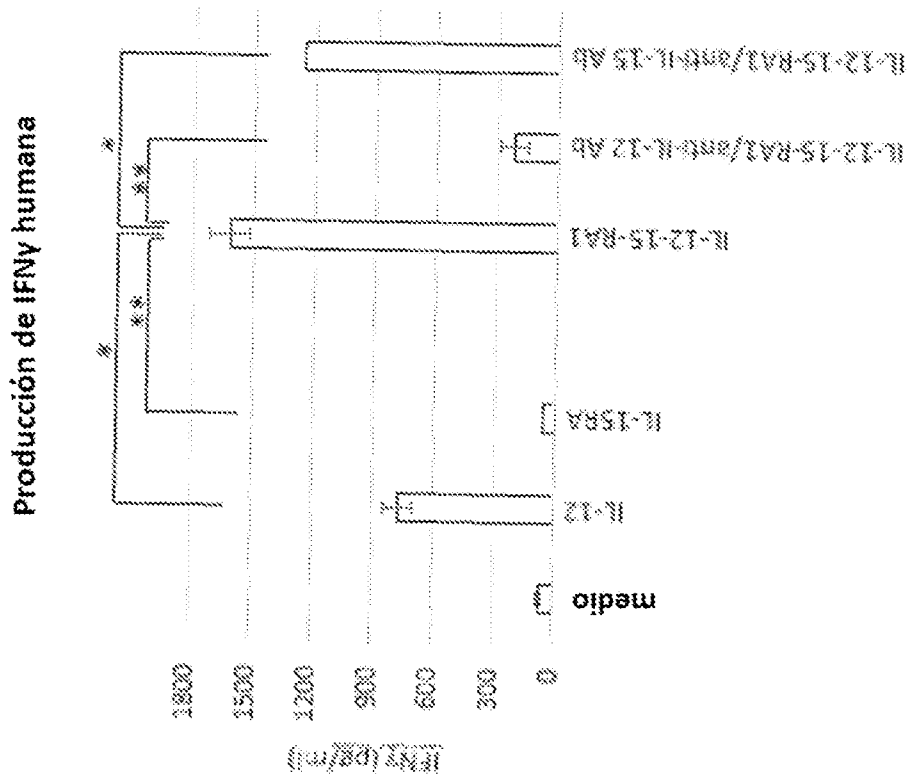


FIG. 23A

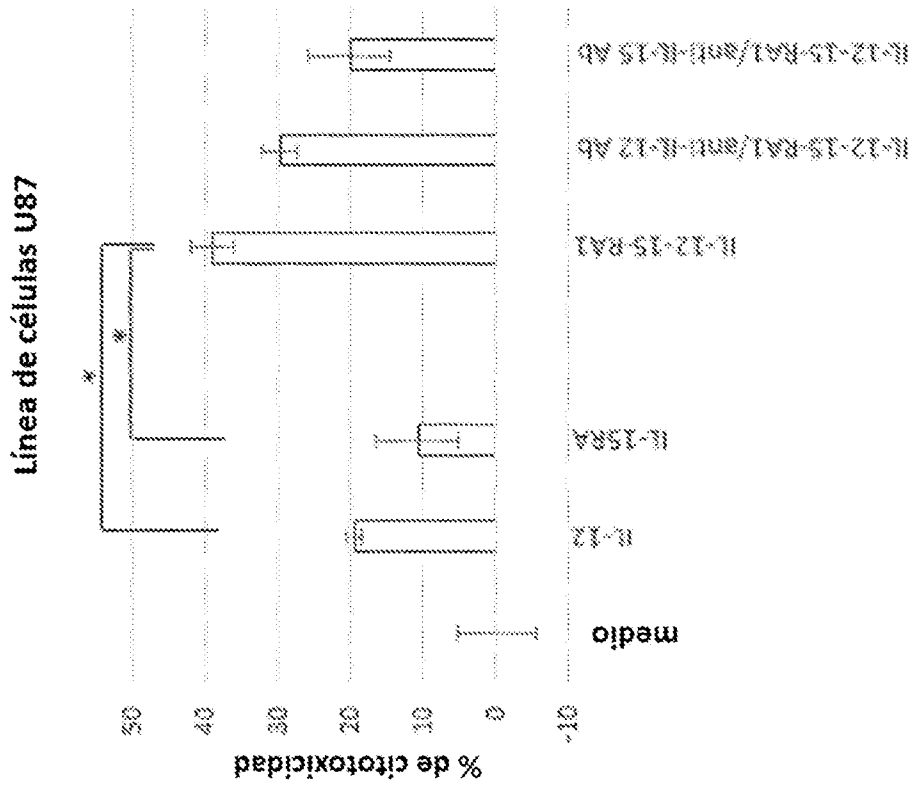
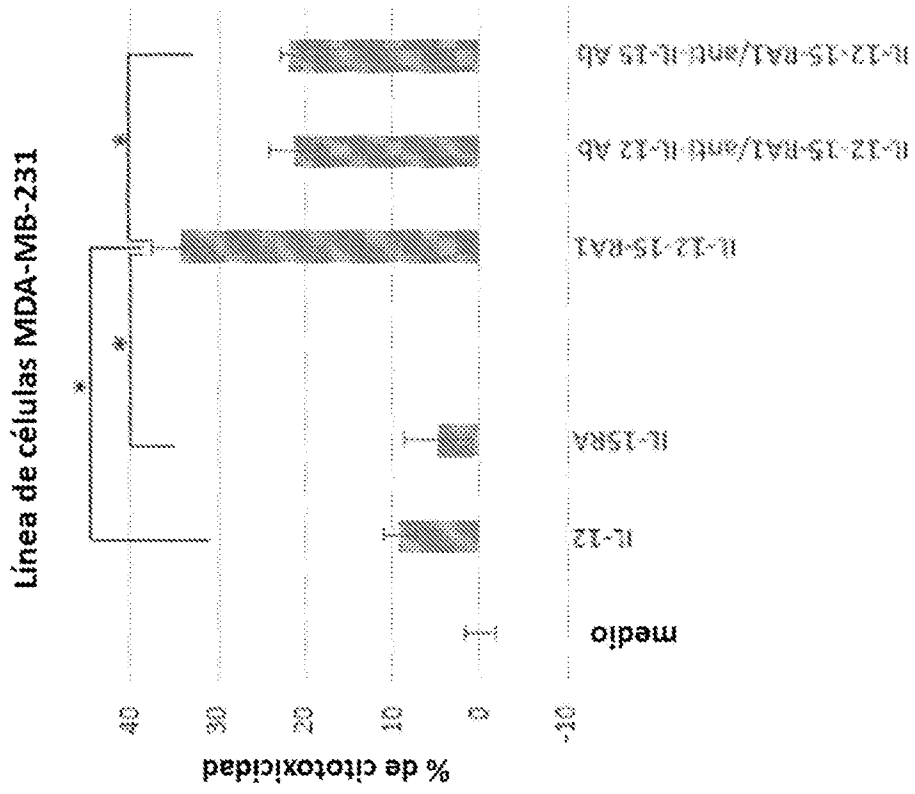


FIG. 24B

FIG. 24A

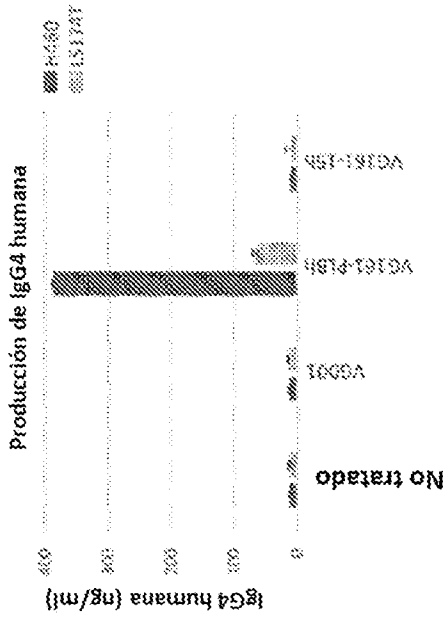


FIG. 25C

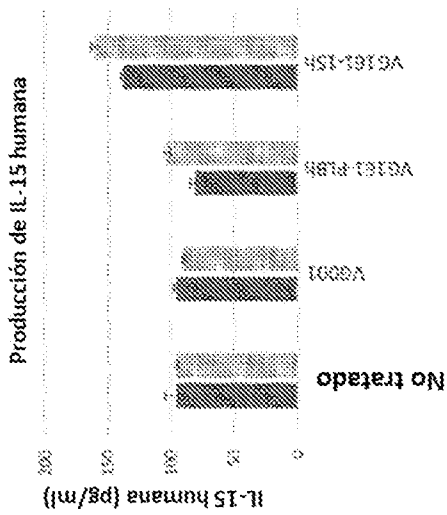


FIG. 25B

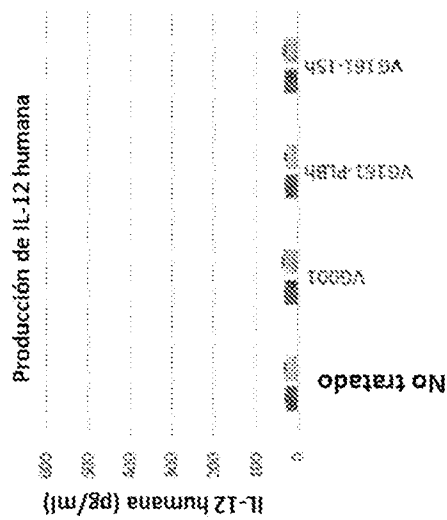


FIG. 25A

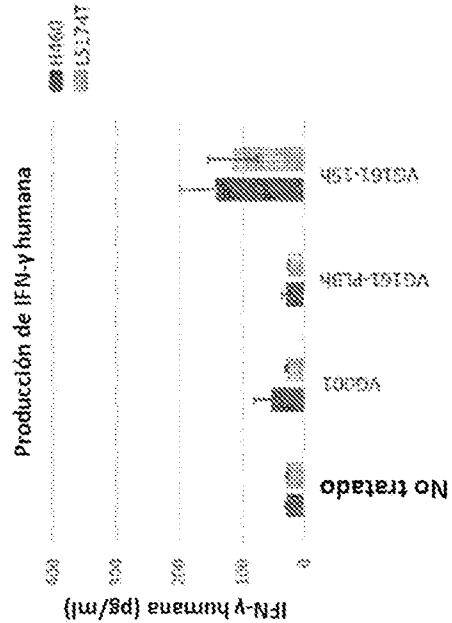


FIG. 25E

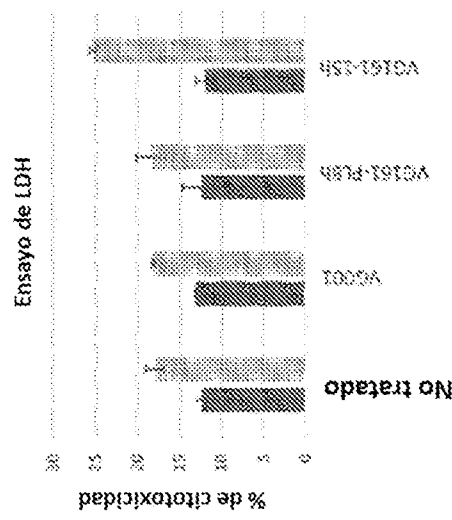


FIG. 25D

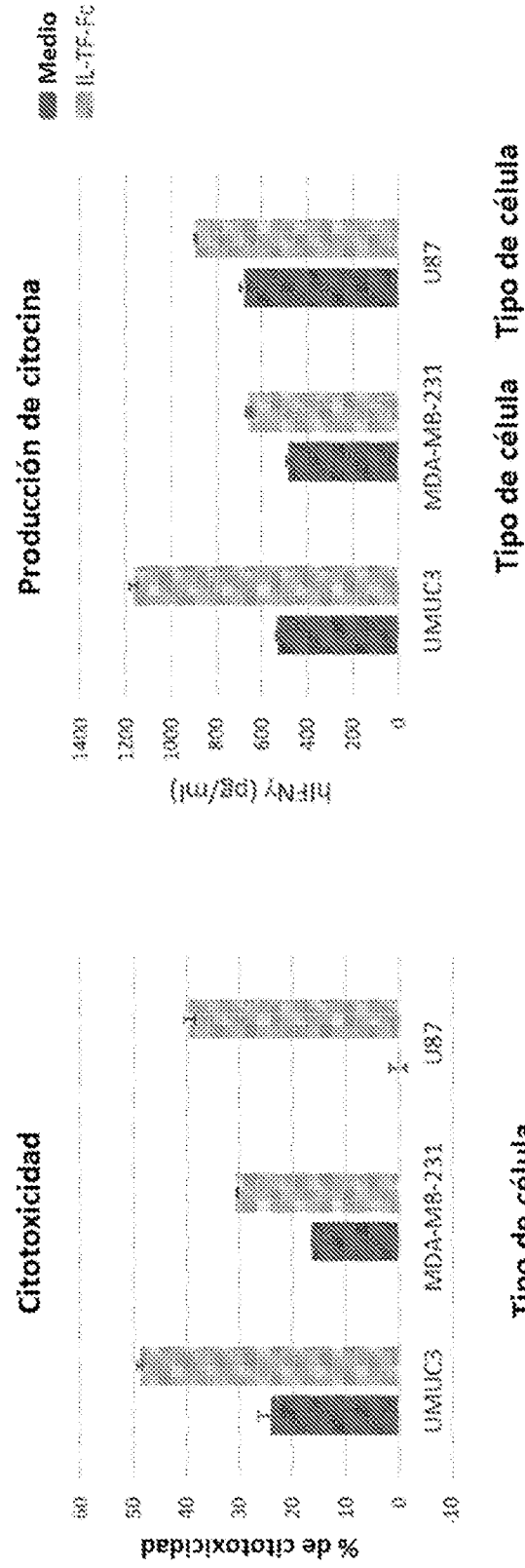


FIG. 26A

FIG. 26B

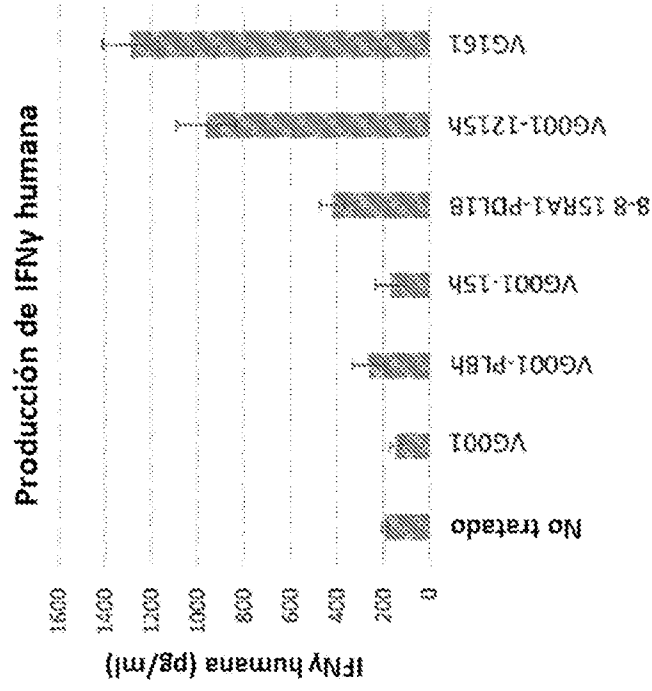


FIG. 26D

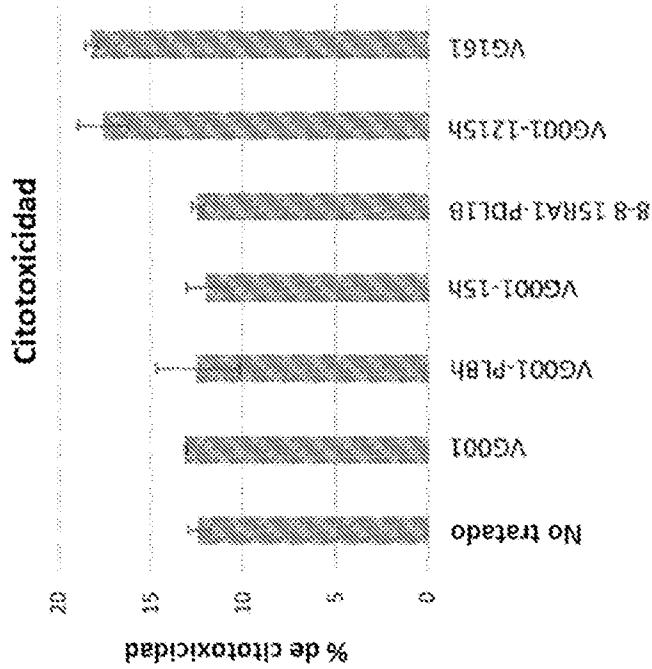
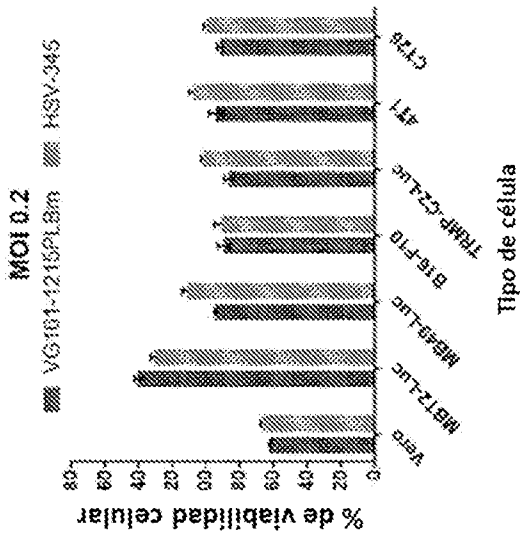
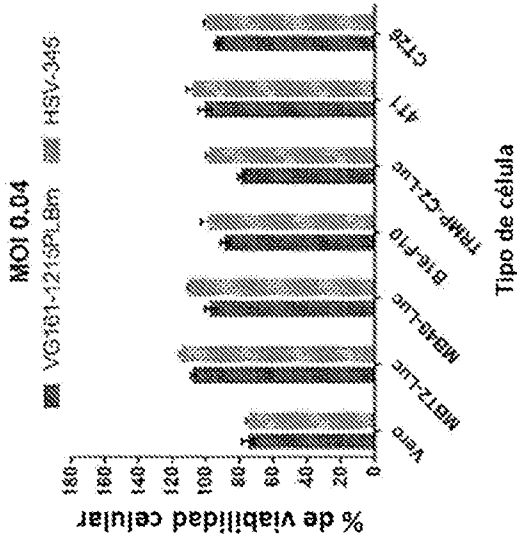


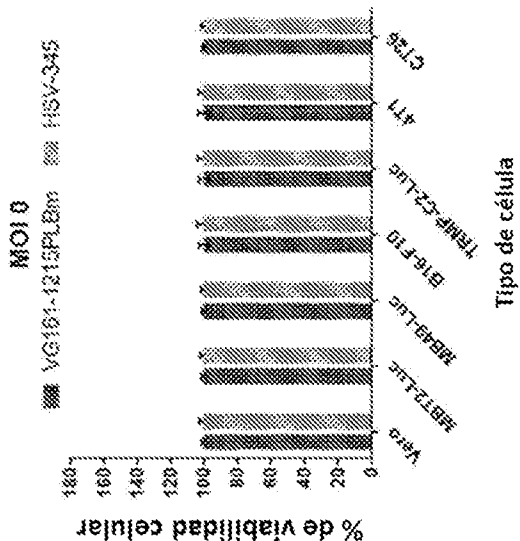
FIG. 26C



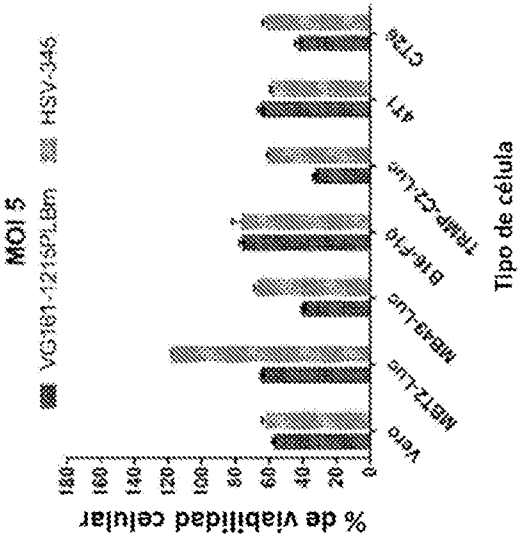
Tipo de célula
FIG. 28C



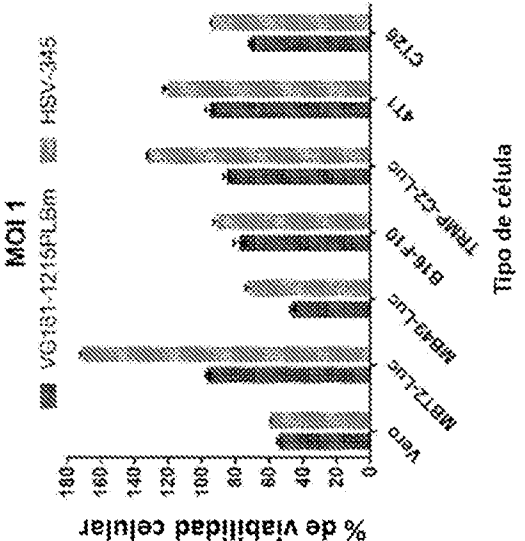
Tipo de célula
FIG. 28B



Tipo de célula
FIG. 28A



Tipo de célula
FIG. 28E



Tipo de célula
FIG. 28D

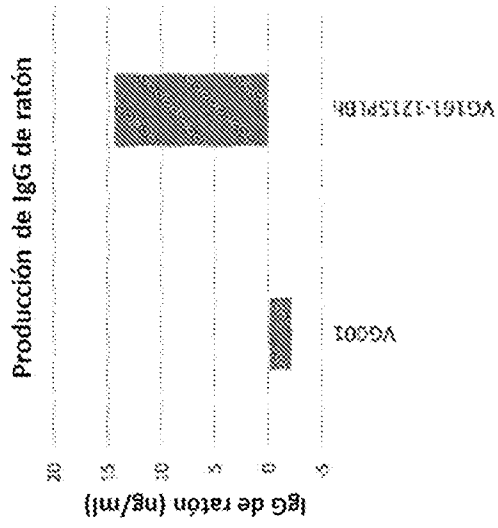


FIG. 28H

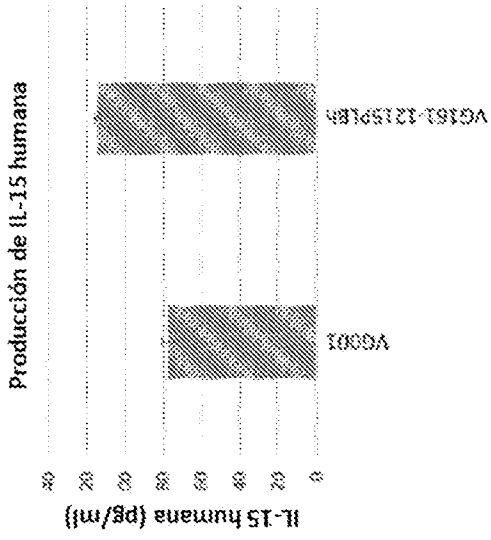


FIG. 28G

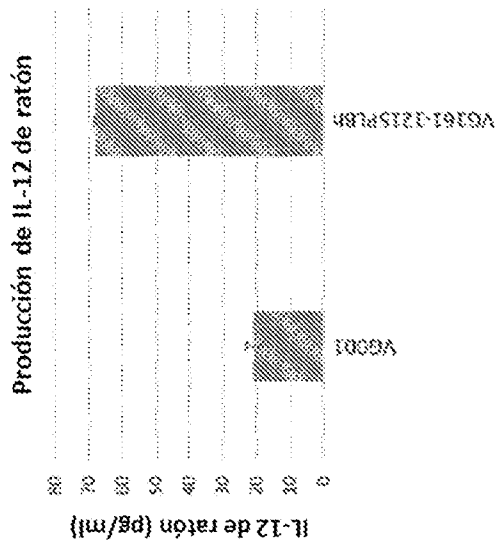


FIG. 28F

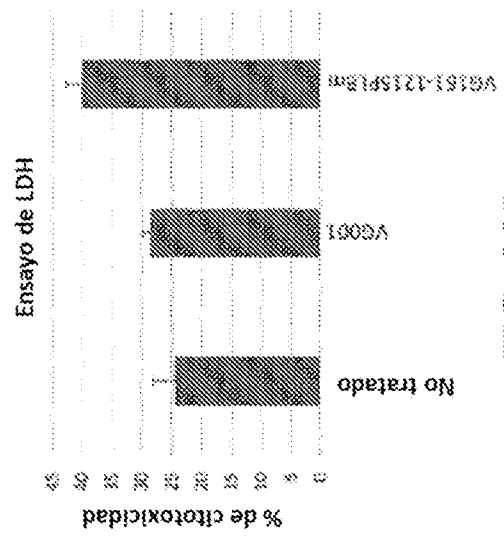


FIG. 28J

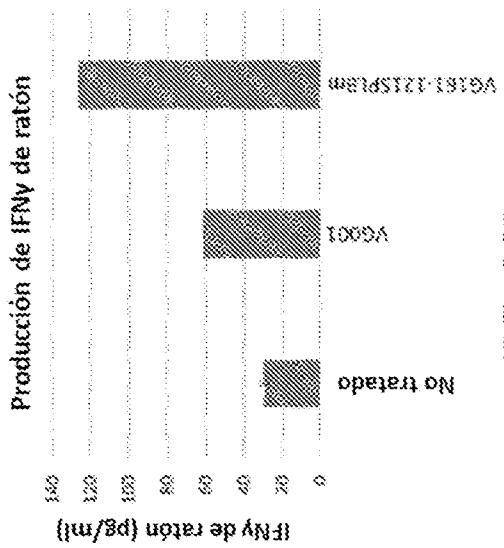


FIG. 28I

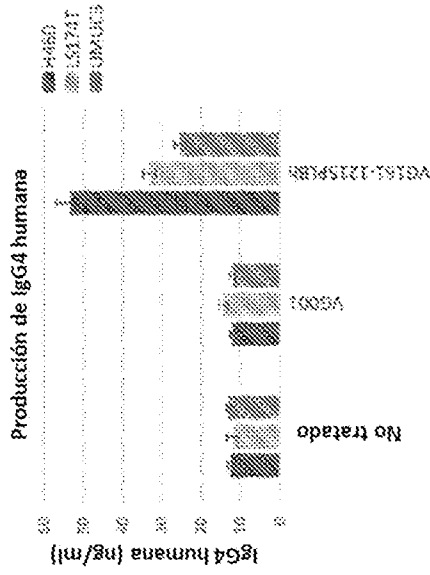


FIG. 29C

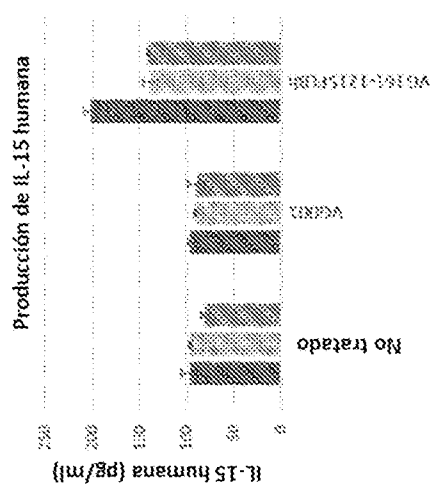


FIG. 29B

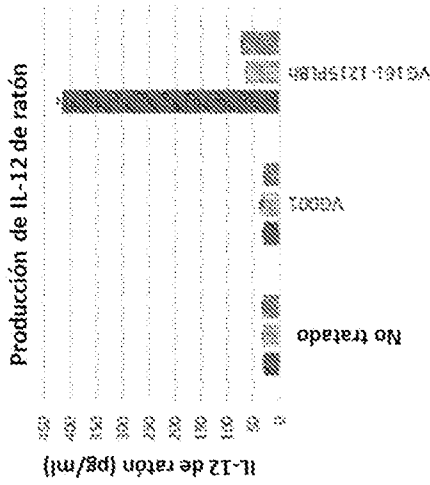


FIG. 29A

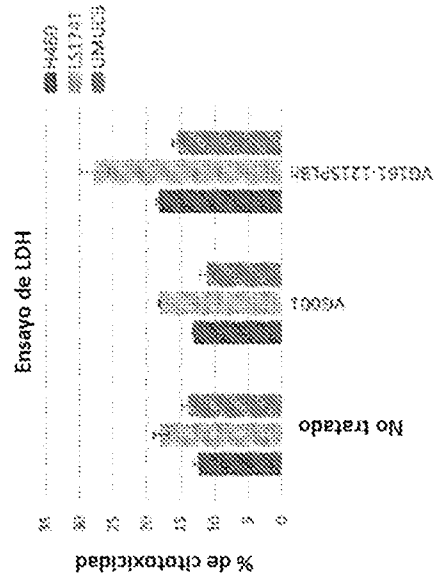


FIG. 29E

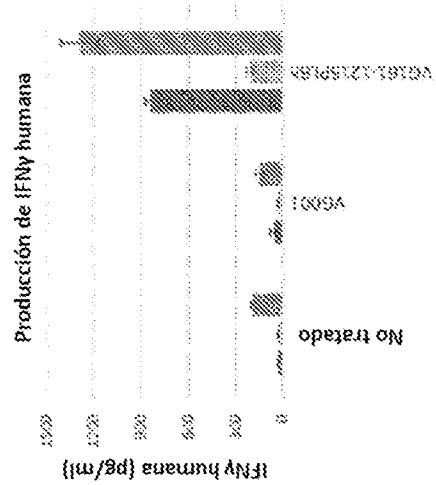


FIG. 29D

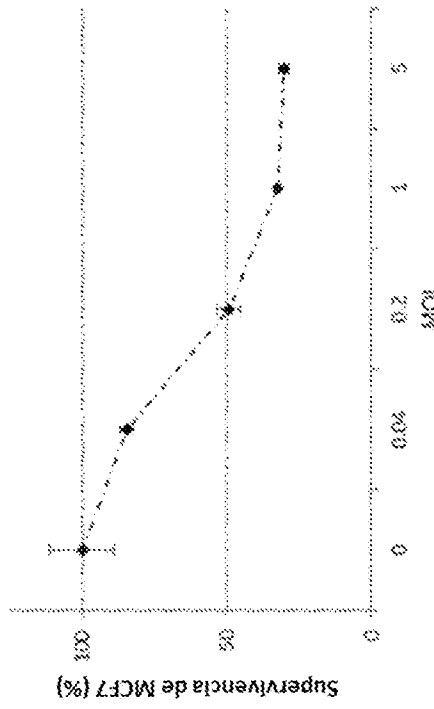


FIG. 30B

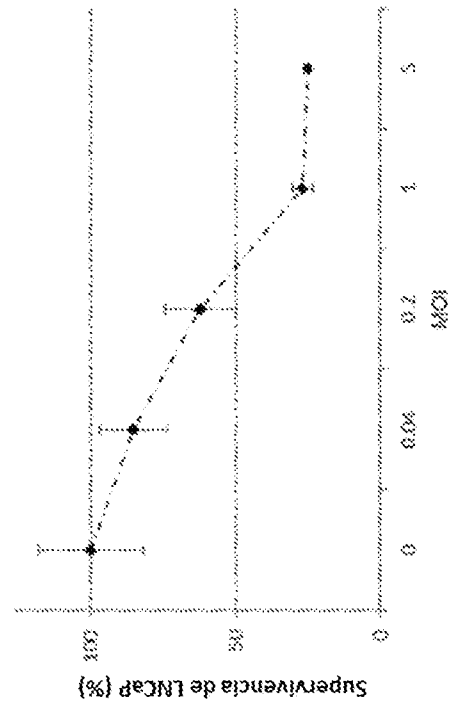


FIG. 30D

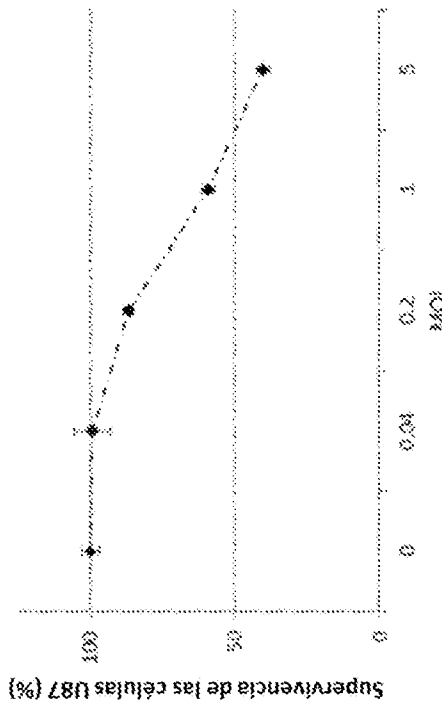


FIG. 30A

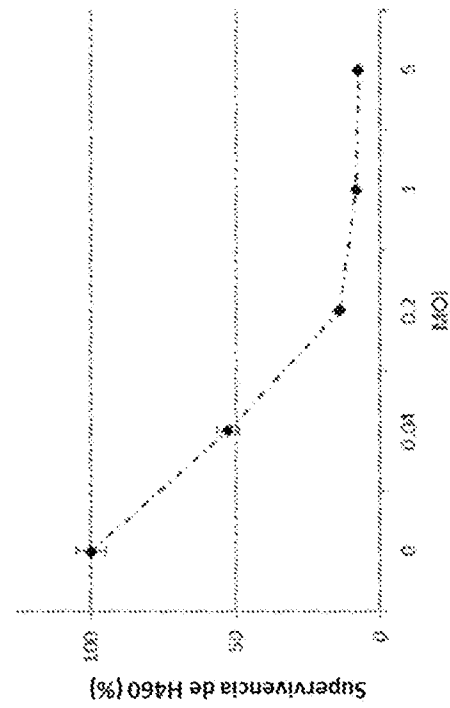


FIG. 30C

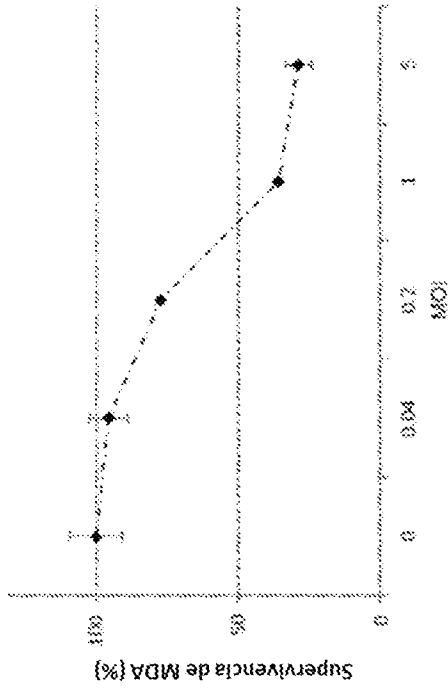


FIG. 30F

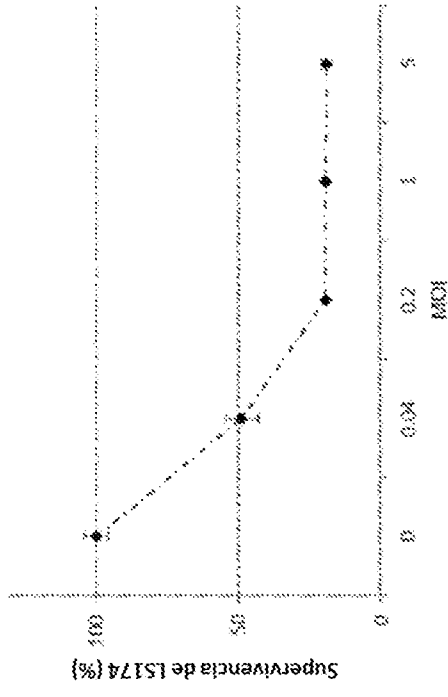


FIG. 30E

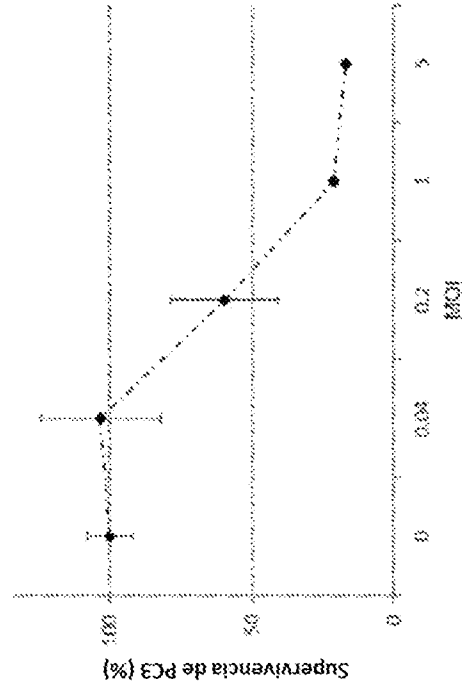


FIG. 30G

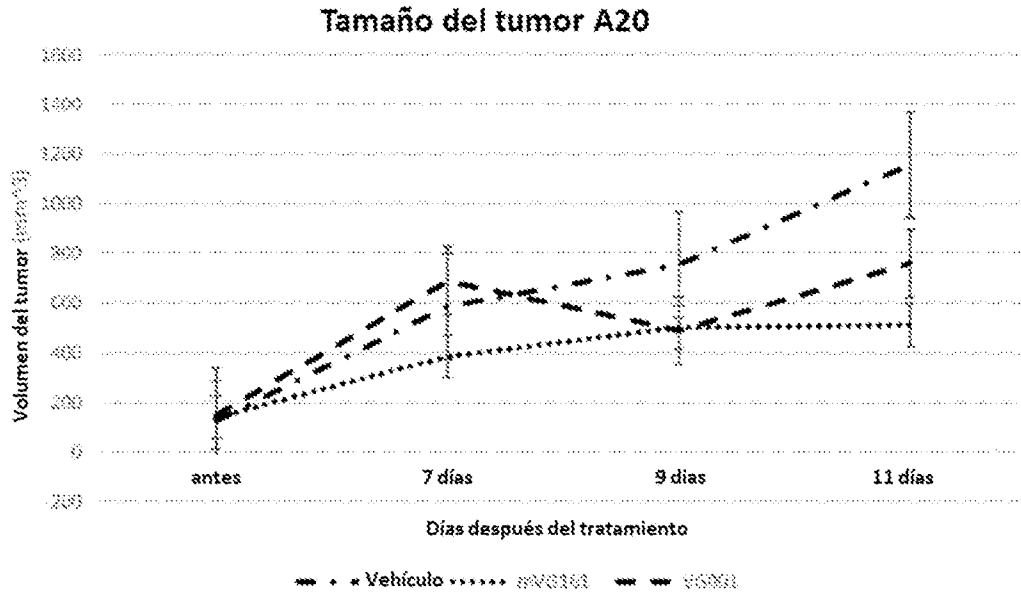


FIG. 31A

Curva de supervivencia de mVG161 y VG001 en un modelo de tumor A20

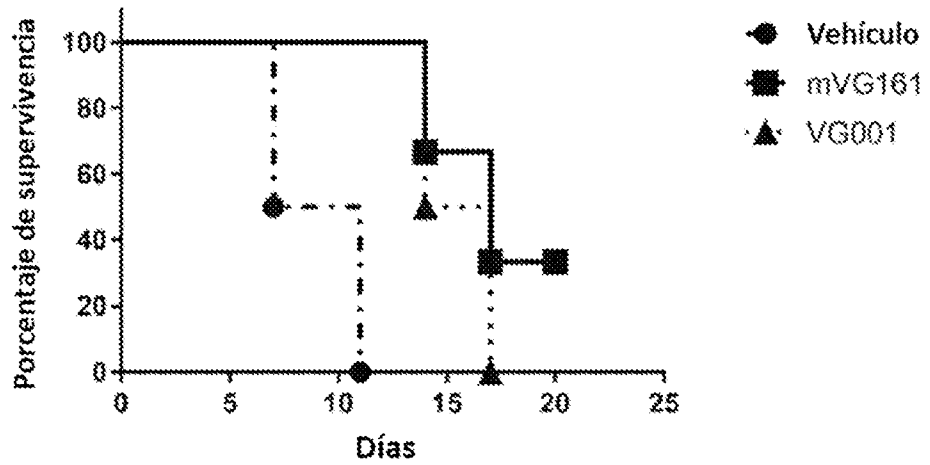


FIG. 31B

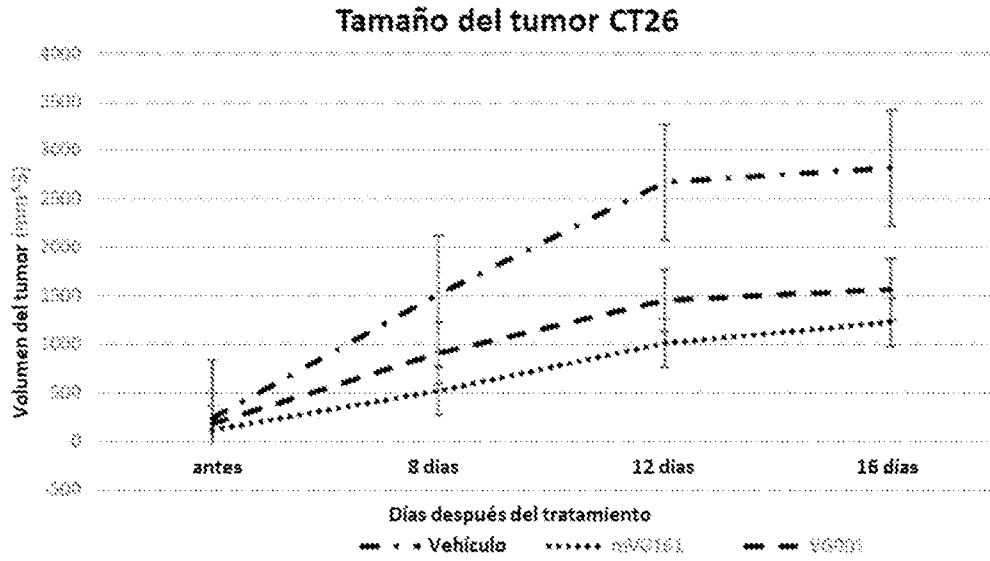


FIG. 31C

Curva de supervivencia de mVG161 y VG001 en un modelo de tumor CT26

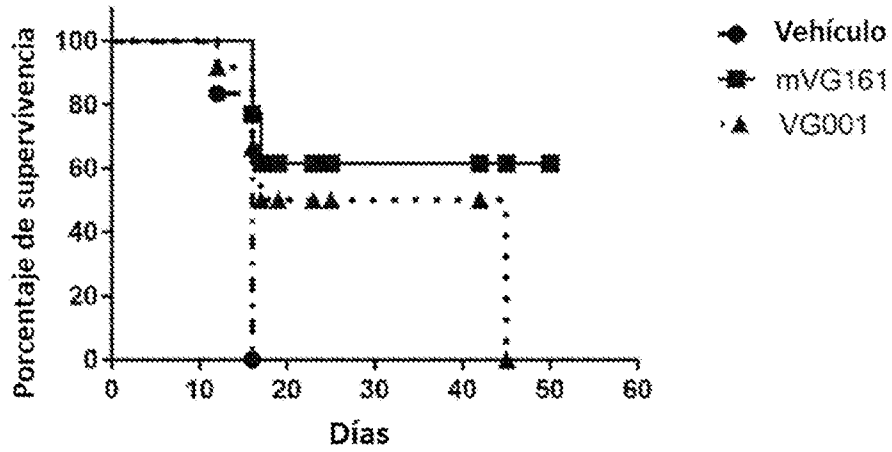


FIG. 31D

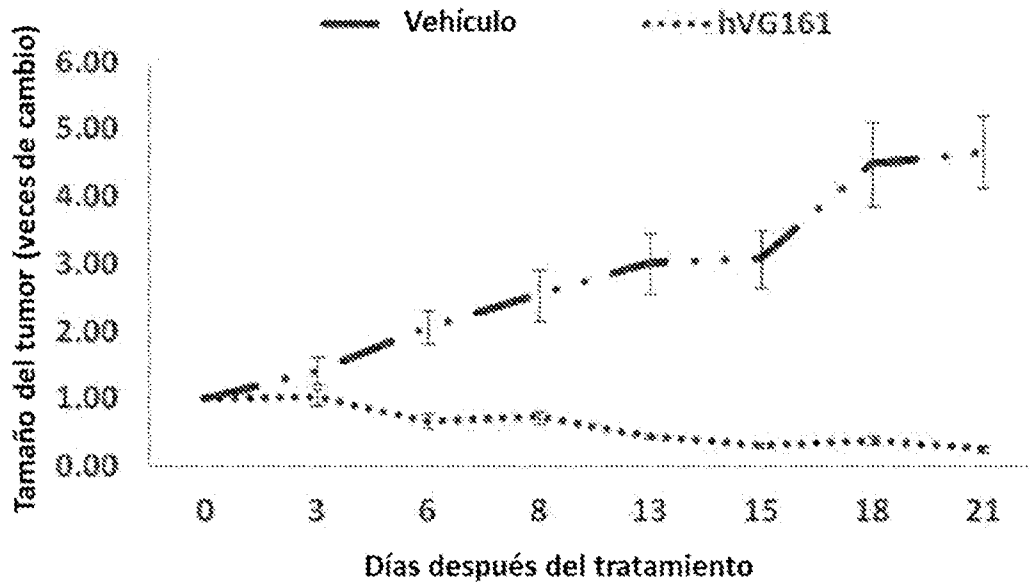


FIG. 31E

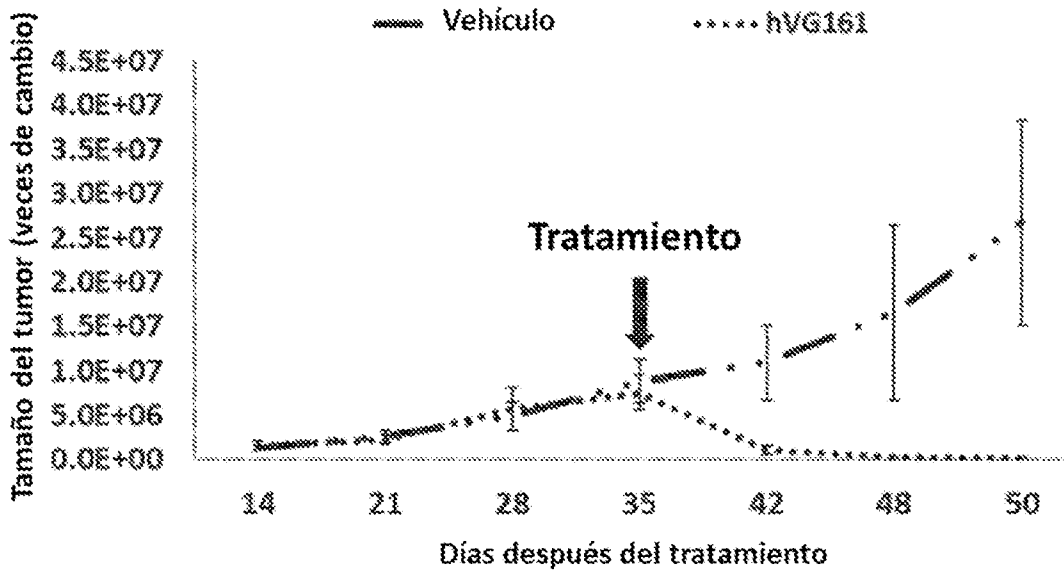


FIG. 31F

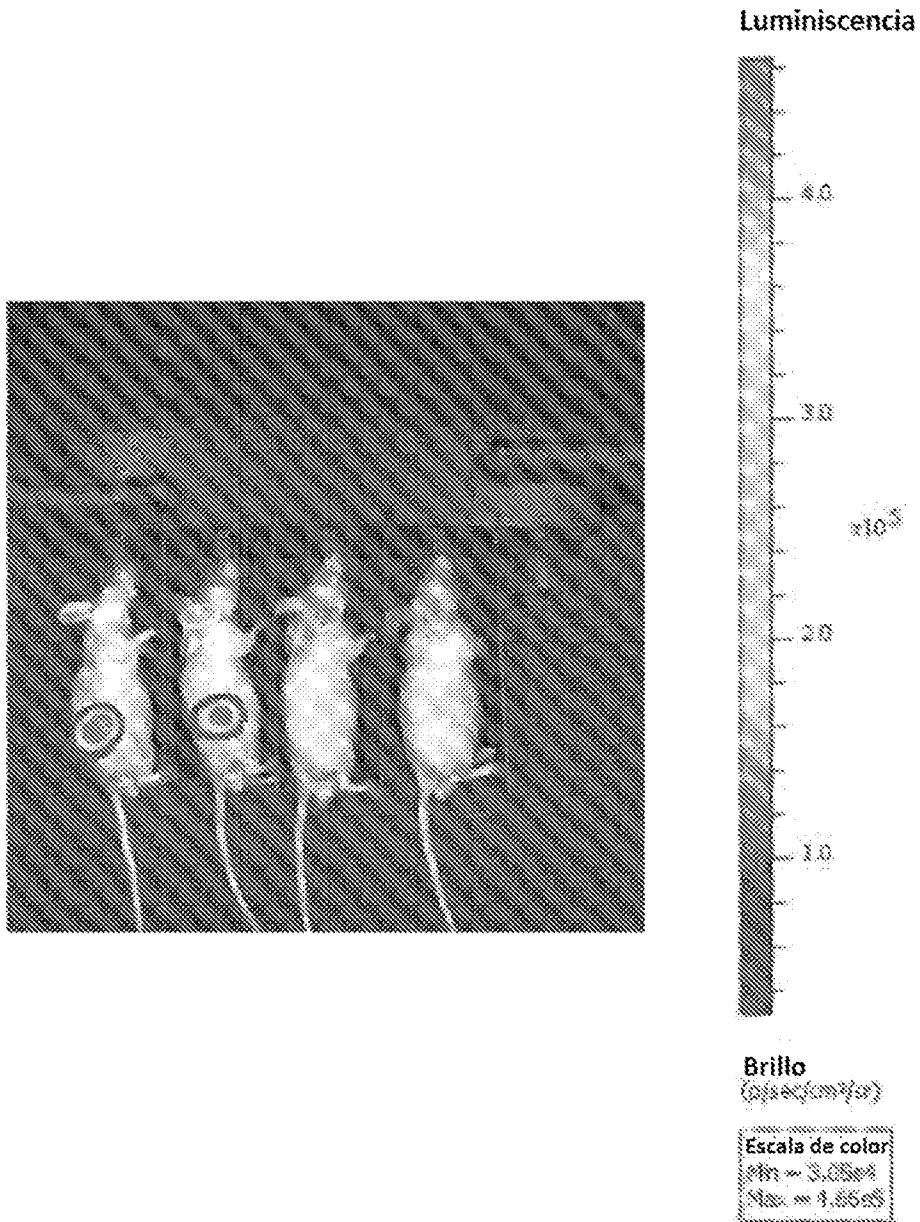


FIG. 31G

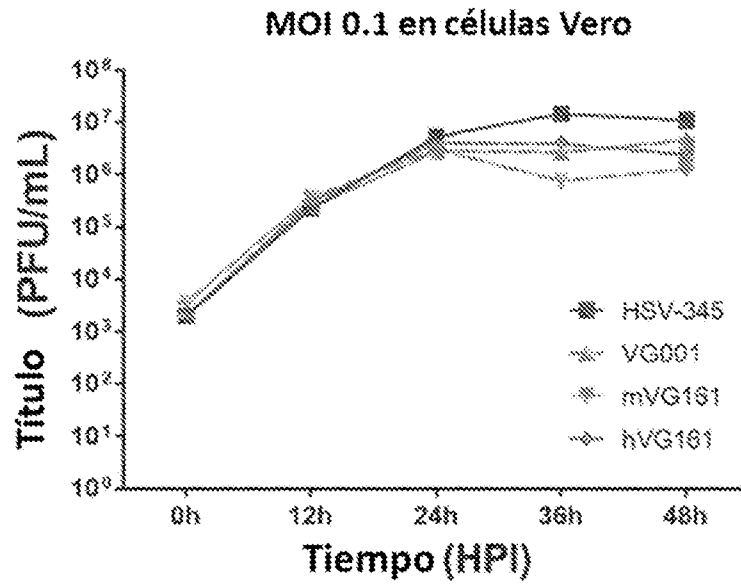


FIG. 32A

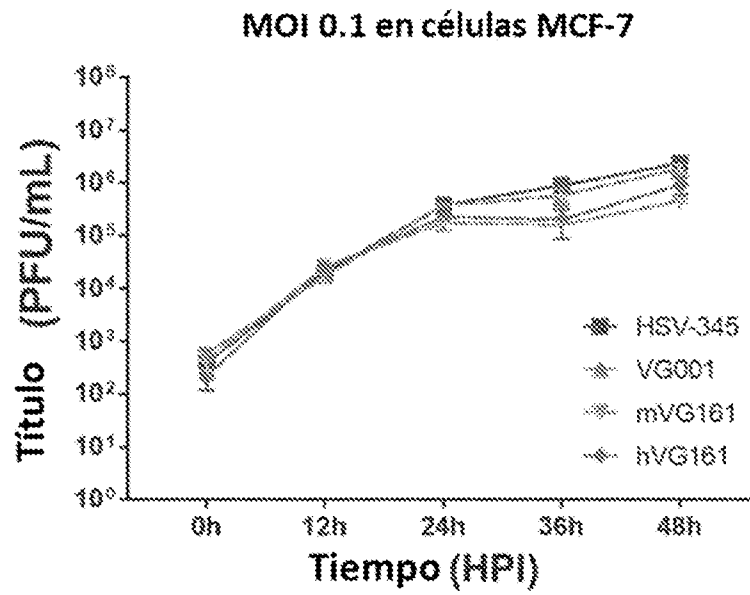


FIG. 32B

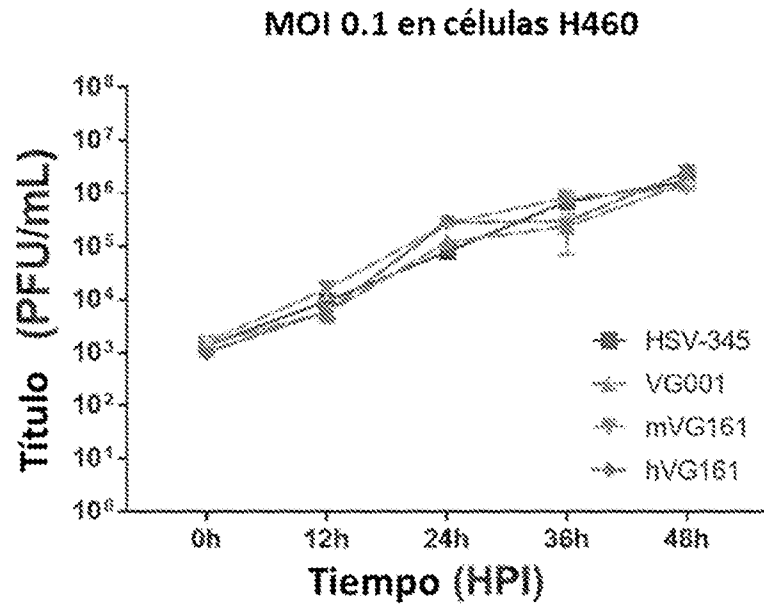


FIG. 32C

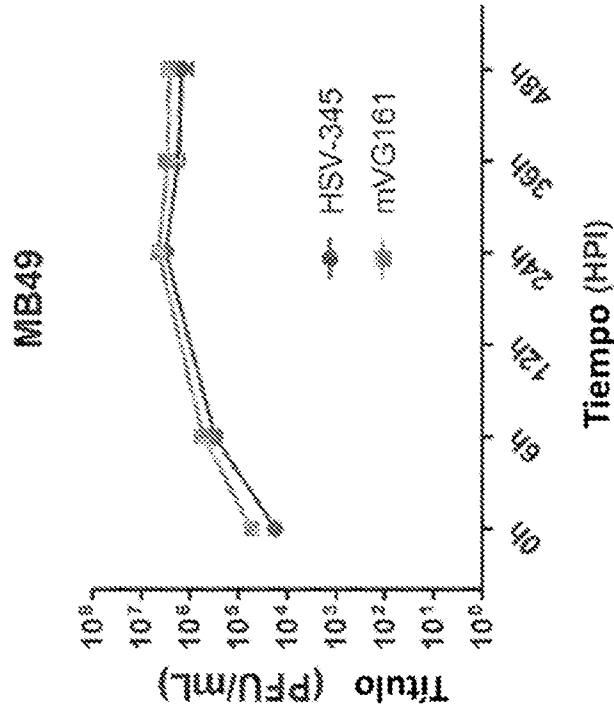


FIG. 33B

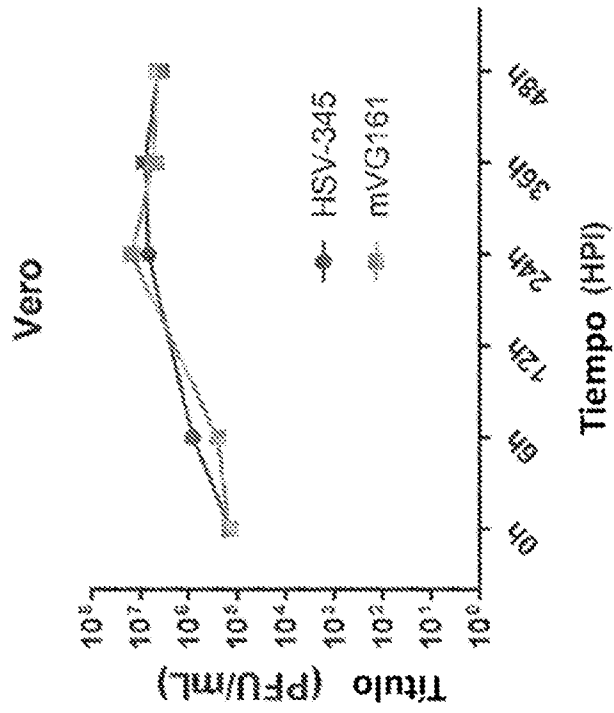


FIG. 33A

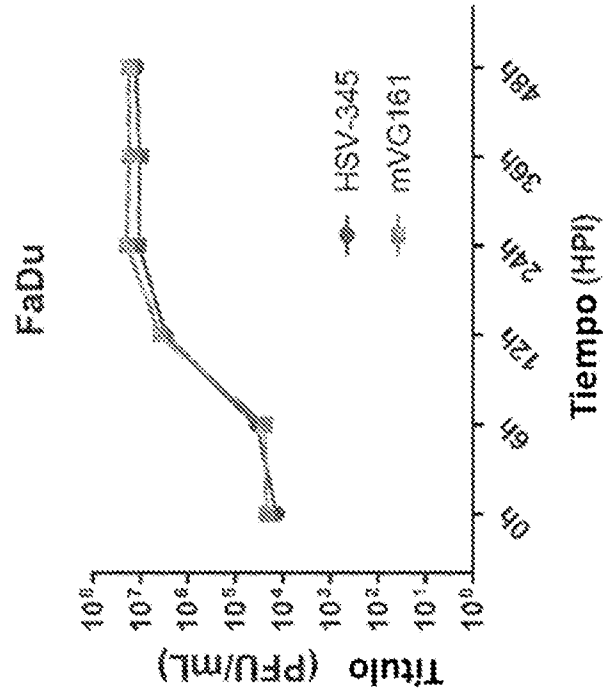


FIG. 33C

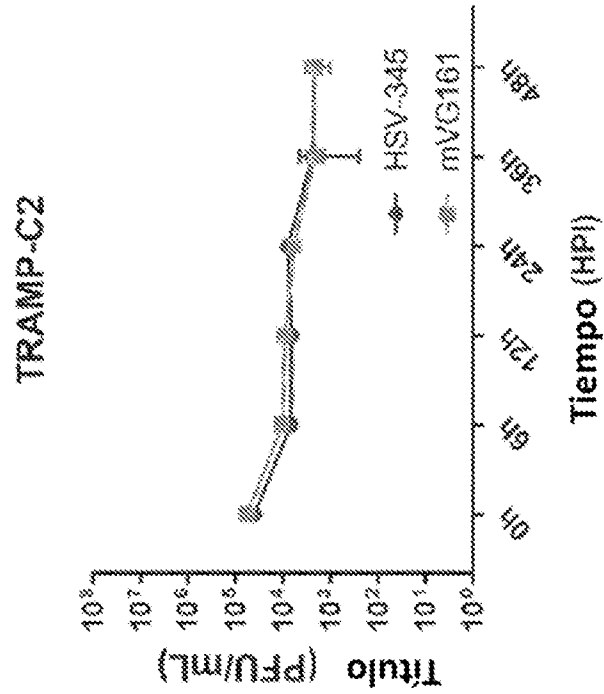


FIG. 33D

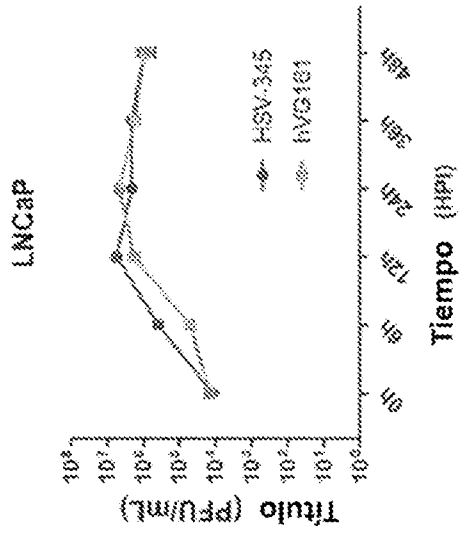


FIG. 34C

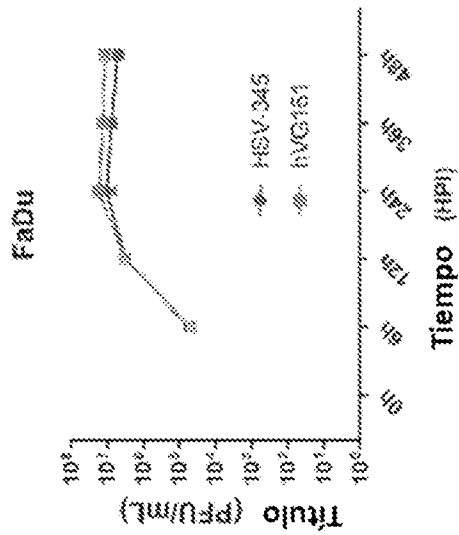


FIG. 34B

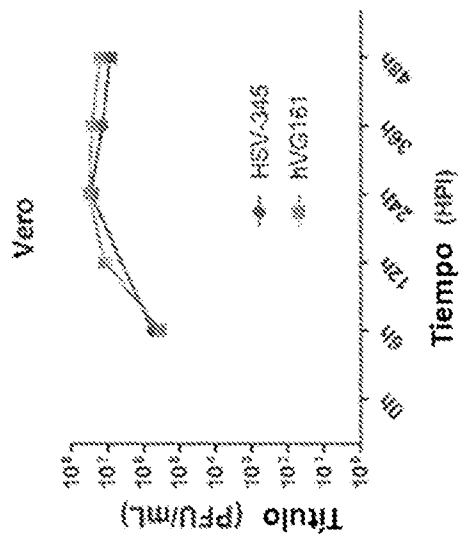


FIG. 34A

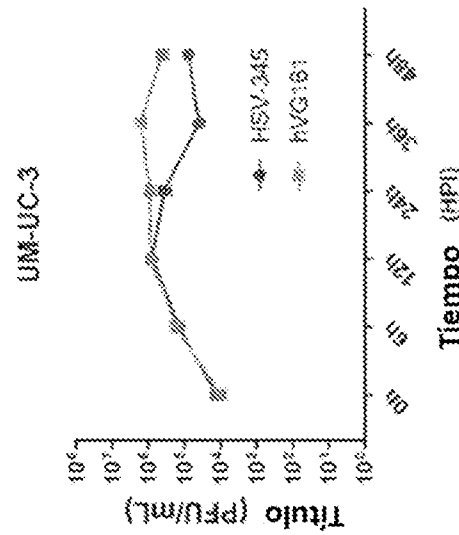


FIG. 34E

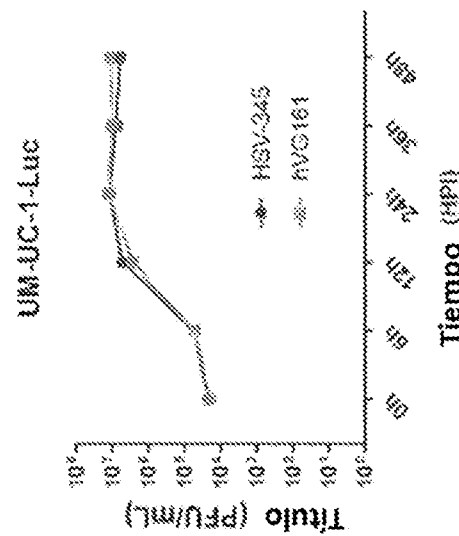


FIG. 34D

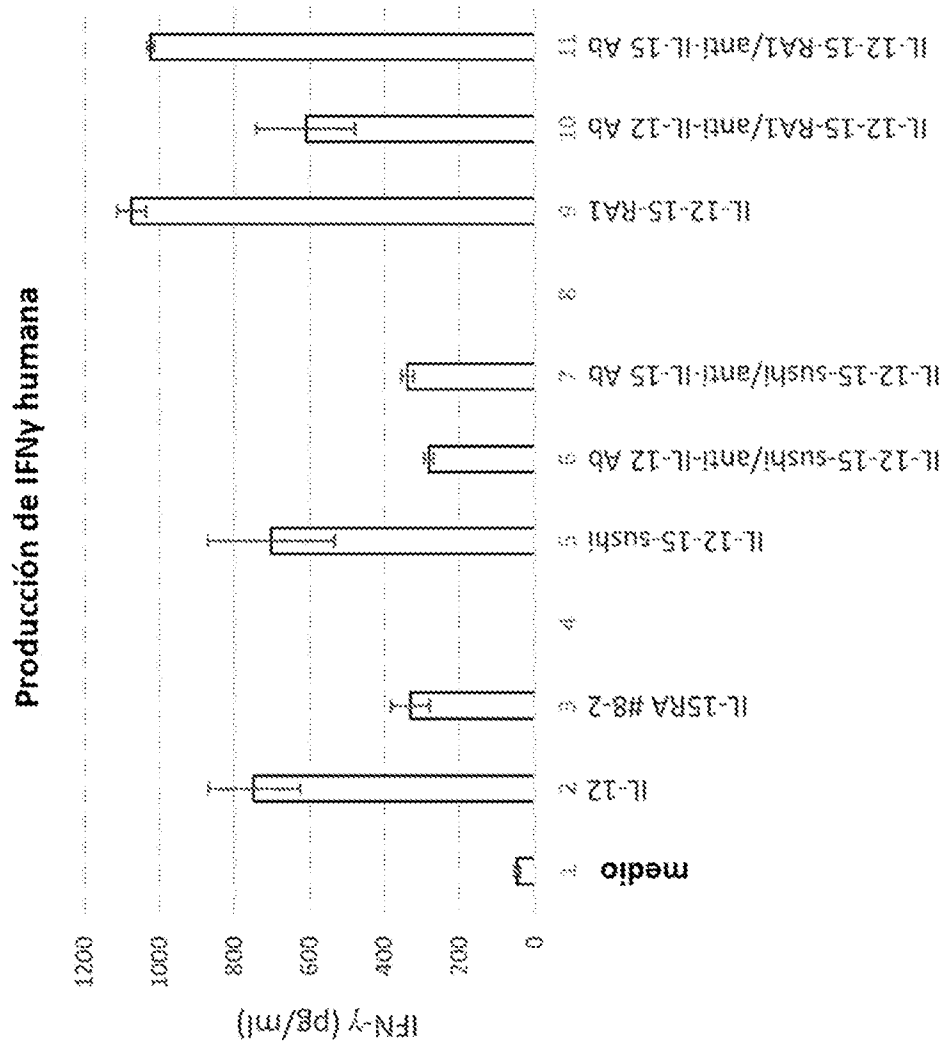


FIG. 35A

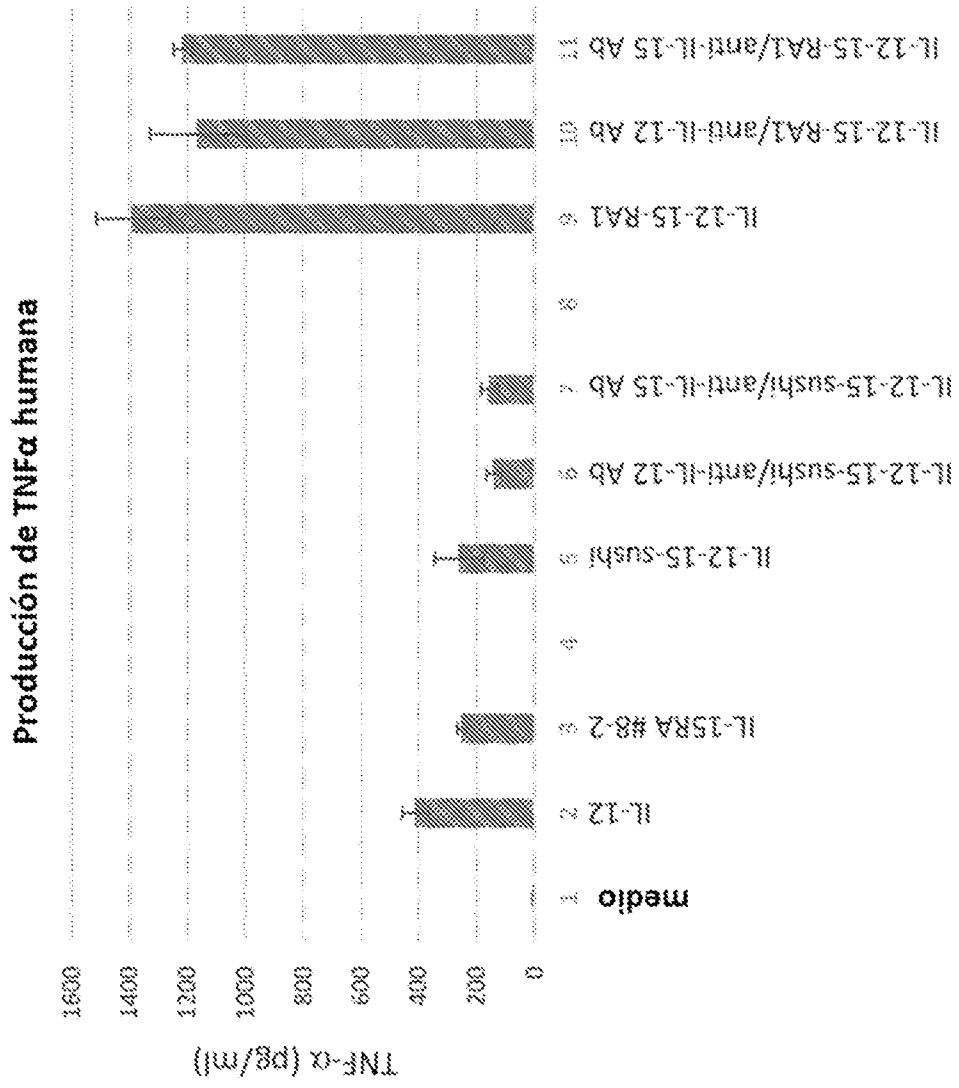


FIG. 35B

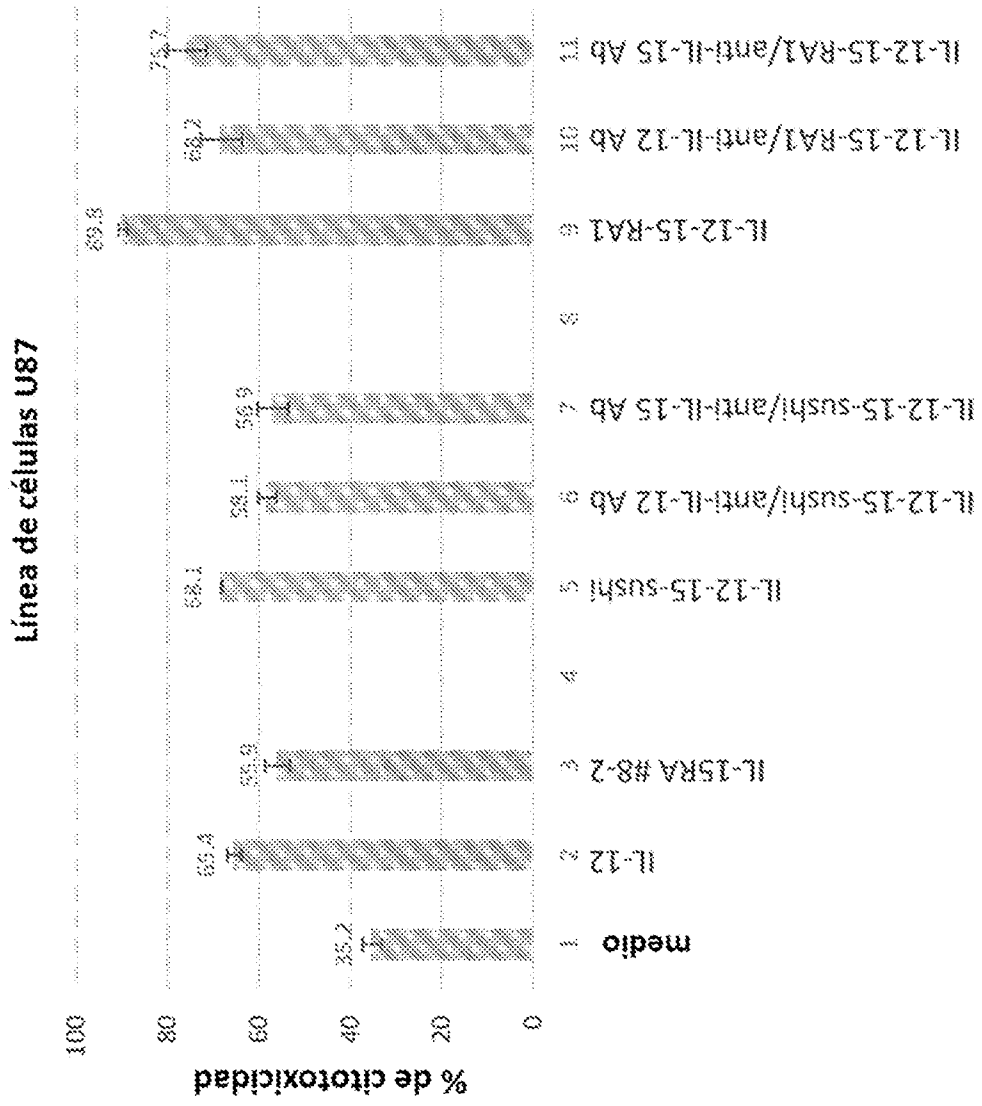


FIG. 35C

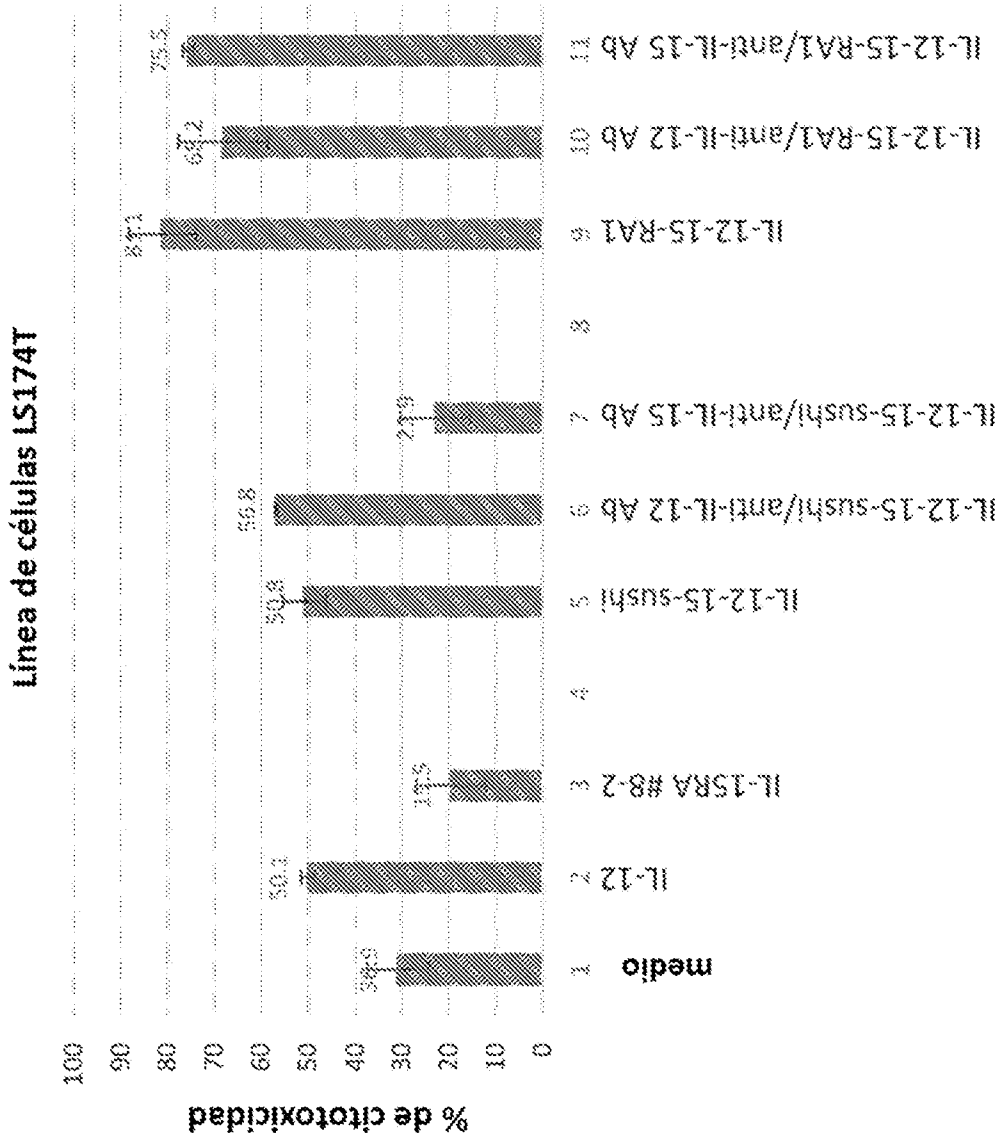


FIG. 35D

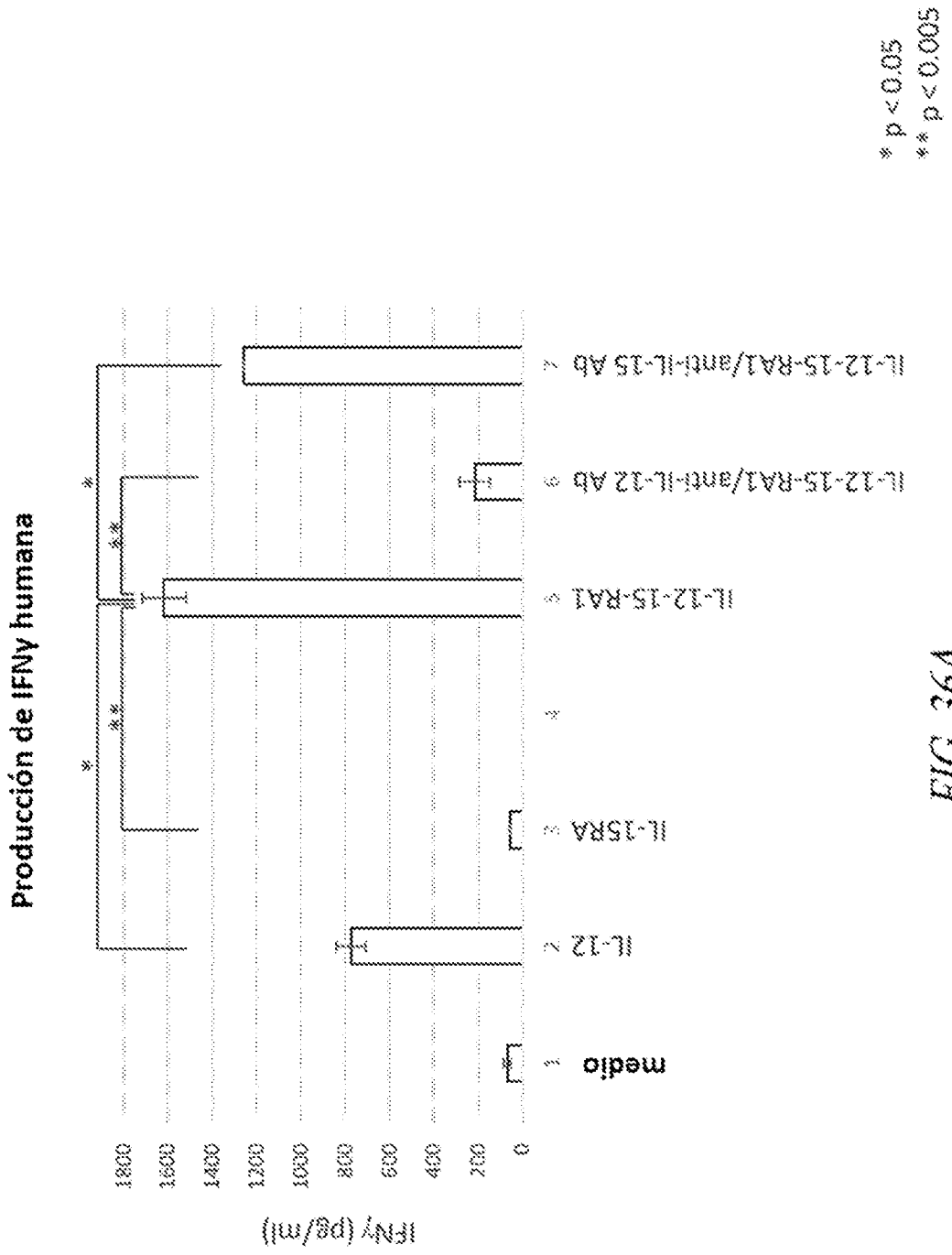


FIG. 36A

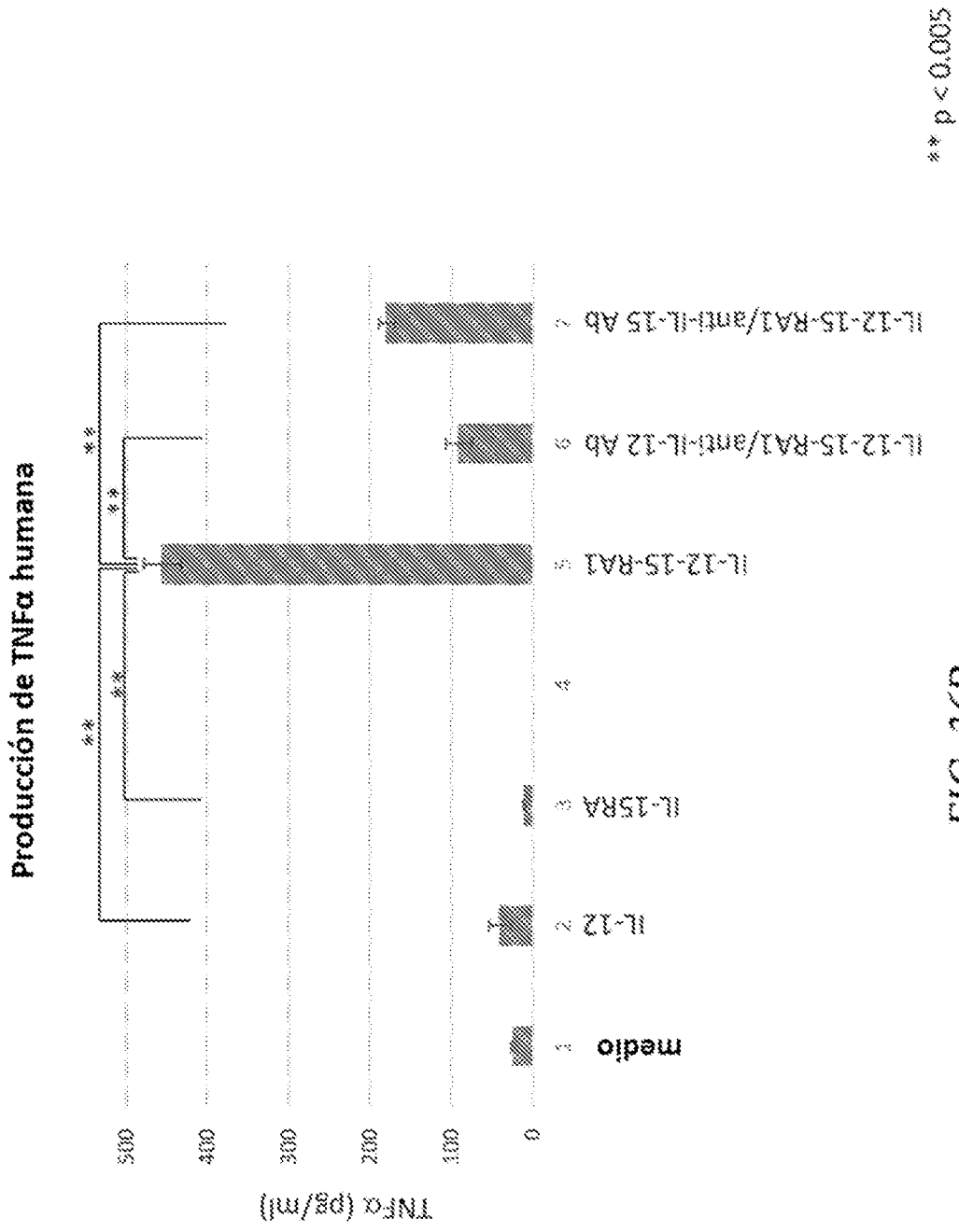


FIG. 36B

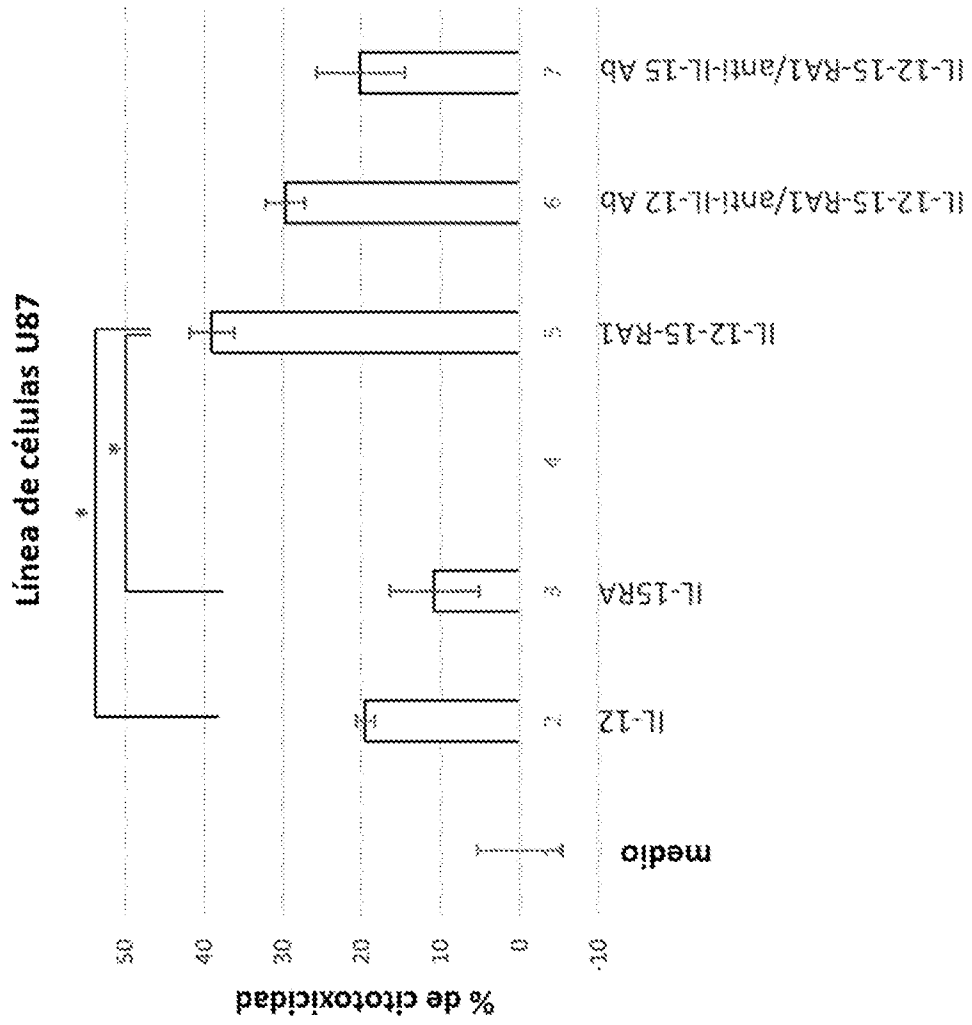


FIG. 36C

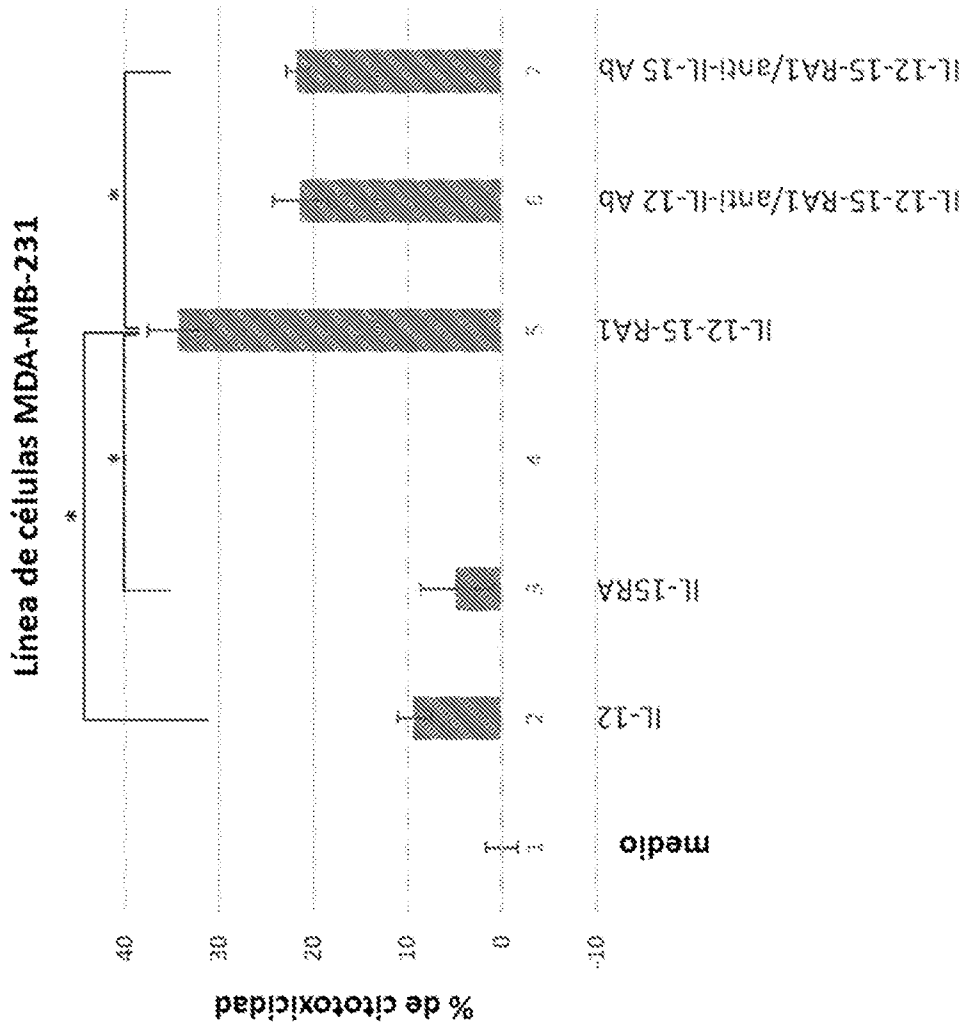


FIG. 36D

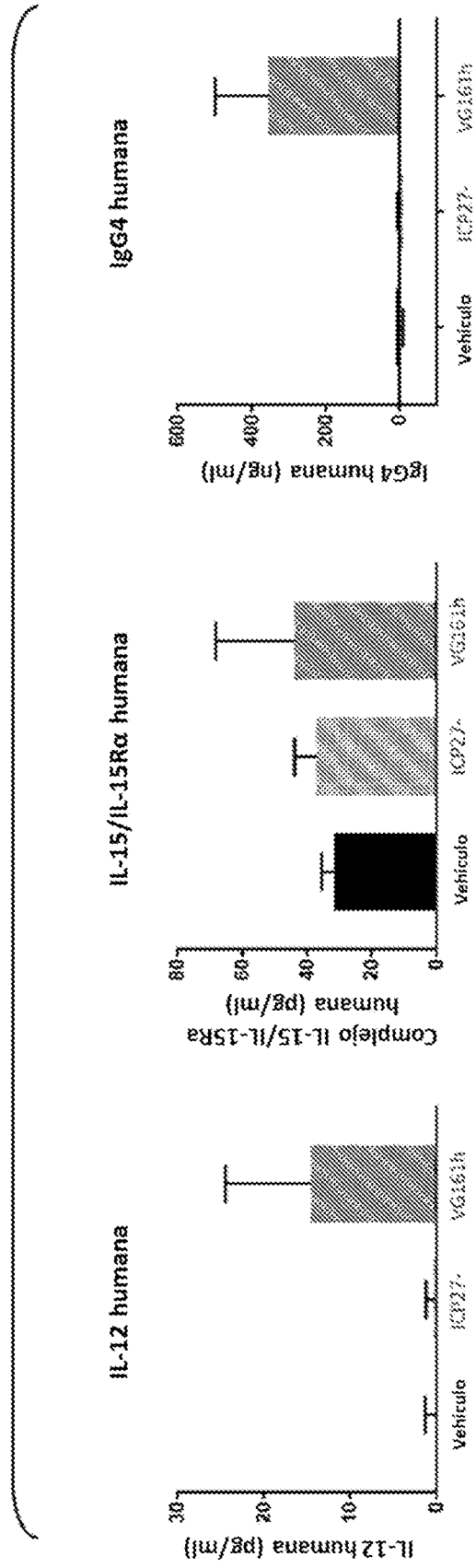


FIG. 37A

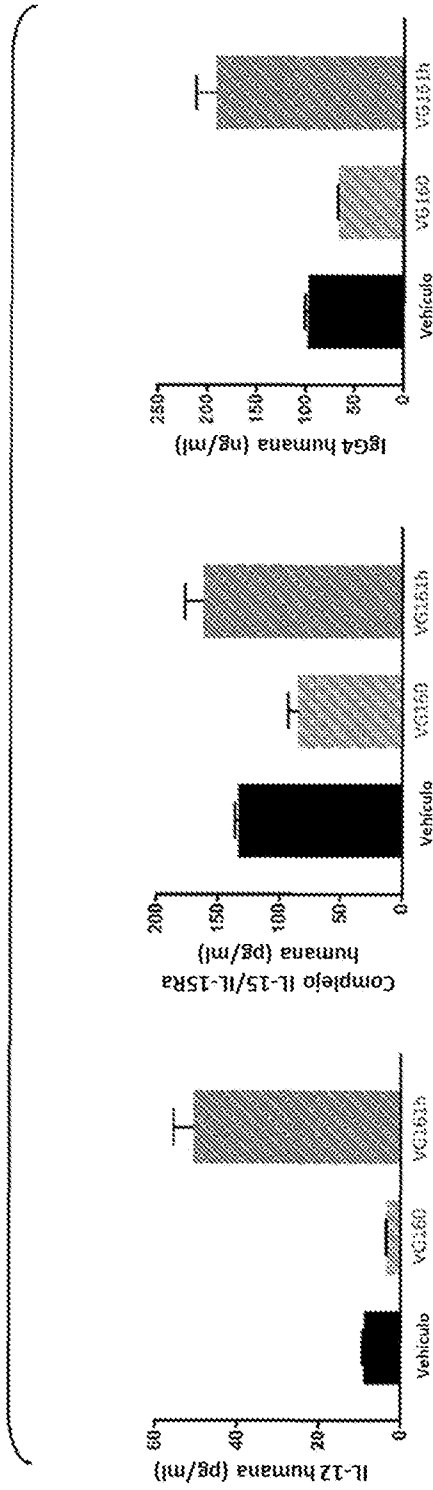


FIG. 37B

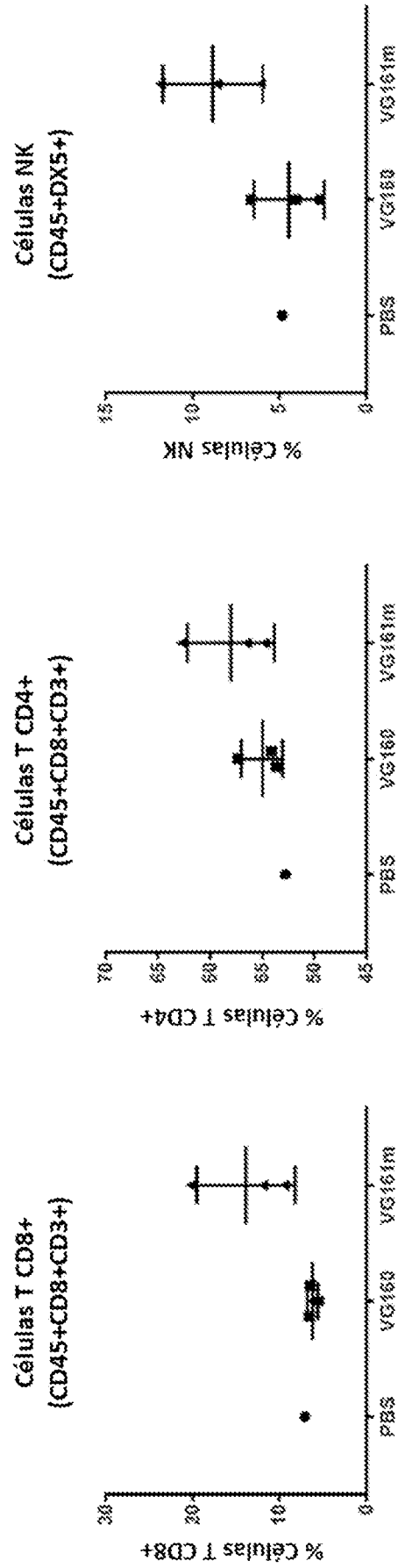


FIG. 38A

FIG. 38B

FIG. 38C