República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 112021004692-5 A2

(22) Data do Depósito: 16/09/2019

(43) Data da Publicação Nacional: 08/06/2021

(54) Título: POXVÍRUS RECOMBINANTES PARA IMUNOTERAPIA DE CÂNCER

(51) Int. Cl.: C12N 15/86; C12N 15/863; C07K 14/52; A61P 35/00; A61K 48/00.

(30) Prioridade Unionista: 03/04/2019 US 62/828,975; 14/11/2018 US 62/767,485; 15/09/2018 US 62/731,876.

(71) Depositante(es): MEMORIAL SLOAN KETTERING CANCER CENTER.

(72) Inventor(es): LIANG DENG; JEDD WOLCHOK; STEWART SHUMAN; TAHA MERGHOUB; NING YANG; YI WANG; GREGORY MEZO; PEIHONG DAI; WEIYI WANG.

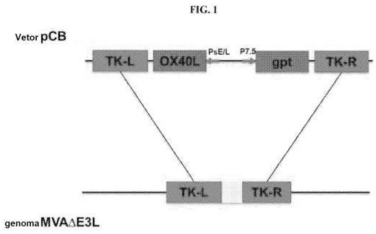
(86) Pedido PCT: PCT US2019051343 de 16/09/2019

(87) Publicação PCT: WO 2020/056424 de 19/03/2020

(85) Data da Fase Nacional: 12/03/2021

(57) Resumo: POXVÍRUS RECOMBINANTES PARA IMUNOTERAPIA CONTRAO CÂNCER. São divulgados neste documento métodos e composições relacionadas ao tratamento, prevenção e/ou melhoria do câncer em um indivíduo em necessidade. Em aspectos particulares, a presente tecnologia se refere ao uso de poxvírus geneticamente modificados ou recombinantes, incluindo um vírus vaccinia Ankara (MVA) modificado compreendendo uma deleção de E3L (MVA?E3L) projetado para expressar OX40L (MVA?E3LOX40L), um vírus MVA compreendendo um deleção de C7L (MVA?C7L) projetado para expressar OX40L (MVA?C7L-OX40L), um MVA?C7L projetado para expressar OX40L e ligante de tirosina quinase 3 tipo Fms humano (hFlt3L) (MVA?C7L-hFlt3L-OX40L), uma deleção de MVA?C7L-OX40L), MVA?E5R), um vírus vaccinia compreendendo uma deleção de C7L (VACV?C7L) projetado para expressar OX40L (VACV?C7L-OX40L), um VACV?C7L projetado para expressar OX40L e hFlt3L (VACV?C7L-hFlt3L-OX40L), um VACV?C7L projetado para expressar OX40L e hFlt3L (VACV?C7L-hFlt3L-OX40L)), um vírus mixoma (MYXV) que compreende uma deleção de M31R (MYXV?M3(...).

FIG. 1



“POXVÍRUS RECOMBINANTES PARA IMUNOTERAPIA CONTRA O CÂNCER”

REFERÊNCIA CRUZADA PARA PEDIDOS RELACIONADOS

[0001] Este pedido reivindica o benefício e a prioridade do Pedido Provisório dos U.S. nº 62/731.876, depositado em 15 de setembro de 2018, do Pedido Provisório U.S. Nº 62/767.485, depositado em 14 de novembro de 2018, e do Pedido Provisório U.S. nº 62/828.975, depositado em 3 de abril de 2019, cujas divulgações são incorporadas por referência neste documento em sua totalidade.

DECLARAÇÃO DE PESQUISA FINANCIADA FEDERALMENTE

[0002] Esta invenção foi feita com o apoio do governo sob AI073736, AI095692, AR068118, e CA008748, concedido pelo *National Institutes of Health.* O governo tem certos direitos sobre a invenção.

CAMPO TÉCNICO

[0003] A tecnologia da presente divulgação se refere geralmente aos campos de oncologia, virologia e imunoterapia. Em particular, a presente tecnologia se refere ao uso de poxvírus, incluindo um vírus vaccinia Ankara (MVA) modificado recombinante, compreendendo uma deleção de E3L (MVAΔE3L) geneticamente modificado para expressar OX40L (MVAΔE3L-OX40L); um vírus MVA recombinante compreendendo uma deleção de C7L (MVAΔC7L) geneticamente modificado para expressar OX40L (MVAΔC7L-OX40L); um MVAΔC7L recombinante manipulado para expressar OX40L e hFlt3L (MVAΔC7L-hFlt3L-OX40L); um MVA recombinante geneticamente modificado para compreender uma deleção de C7L, uma deleção de E5R e para expressar hFlt3L e OX40L (MVAΔC7LΔE5R-hFlt3L-OX40L); um MVA recombinante geneticamente modificado para compreender uma deleção de E5R (MVAΔE5R); um MVA recombinante geneticamente modificado para compreender uma deleção de E5R e expressar hFlt3L e OX40L (MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L); um MVA recombinante geneticamente modificado para compreender uma deleção de E3L, uma deleção de hFlt3L e para expressar

hFtl3L e OX40L (MVAΔE3L)-hFlt3L-OX40L); um MVA recombinante geneticamente modificado para compreender uma deleção de E5R, uma deleção de C11R e para expressar hFlt3L e OX40L (MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R); um MVA recombinante geneticamente modificado para compreender uma deleção de E3L, uma deleção de E5R, uma deleção de C11R e para expressar hFlt3L e OX40L (MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R); um vírus vaccinia recombinante compreendendo uma deleção de C7L (VACVΔC7L) geneticamente modificado para expressar OX40L (VACVΔC7L-OX40L); um VACVΔC7L recombinante geneticamente modificado para expressar OX40L e hFlt3L (VACVΔC7L-hFlt3L-OX40L); um VACV geneticamente modificado para compreender uma deleção de E5R (VACVΔE5R); um VACV recombinante geneticamente modificado para compreender uma deleção de E5R, uma deleção de timidina quinase (TK) e para expressar anti-CTLA-4, hFlt3L e OX40L (VACV-TK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L -OX40L); um VACV geneticamente modificado para compreender uma deleção de B2R (VACVΔB2R); um VACV geneticamente modificado para compreender uma deleção E3LΔ83N e uma deleção B2R (VACVE3LΔ83NΔB2R); um VACV geneticamente modificado para compreender uma deleção de E5R e uma deleção de B2R (VACVΔE5RΔB2R); um VACV geneticamente modificado para compreender uma deleção E3LΔ83N, uma deleção E5R e uma deleção B2R (VACVE3LΔ83NΔE5RΔB2R); um VACV geneticamente modificado para compreender uma deleção E3LΔ83N, uma deleção de timidina quinase (TK) e uma deleção E5R e expressar anti-CTLA-4, hFlt3L, OX40L e IL-12 (VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4 -ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12); um VACV geneticamente modificado para compreender uma deleção E3LΔ83N, uma deleção de timidina quinase (TK), uma deleção E5R e uma deleção B2R e expressar anti-CTLA-4, hFlt3L, OX40L e IL-12 (VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti -CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12-ΔB2R); um MYXV geneticamente modificado para compreender uma deleção de M31R (MYXVΔM31R); um MYXV recombinante geneticamente modificado para compreender uma

deleção de M31R e para expressar hFl3L e OX40L (MYXV∆M31R-hFlt3L-OX40L); um MYXV geneticamente modificado para compreender uma deleção de M63R (MYXVΔM63R); um MYXV geneticamente modificado para compreender uma deleção de M64R (MYXVΔM64R); um MVA geneticamente modificado para compreender uma deleção de WR199 (MVAΔWR199); um MVA geneticamente modificado para compreender uma deleção de E5R, uma deleção de WR199 e expressar hFlt3L e OX40L (MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔWR199); ou as combinações dos mesmos, sozinhas ou em combinação com agentes de bloqueio de ponto de verificação imunológico, agentes imunomoduladores e/ou medicamentos anticâncer como uma composição imunoterapêutica e/ou oncolítica. Em algumas modalidades, a tecnologia da presente divulgação se refere a qualquer um dentre os vírus anteriores ainda modificados para expressar um gene específico de interesse (SG), como genes que codificam qualquer uma ou mais dentre as seguintes proteínas imunomoduladoras, incluindo, mas não se limitando a hFlt3L, hIL-2, hIL-12, hIL-15, hIL-15/IL-15Rα, hIL-18, hIL-21, anti-huCTLA-4, anti-huPD-1, anti-huPD-L1, GITRL, 4-1BBL, ou CD40L. Em algumas modalidades, as estruturas do vírus são ainda modificados para compreender deleções ou mutações de genes, incluindo, mas não se limitando a timidina quinase (TK), E3L (ΔE3L), E3LΔ83N, B2R (ΔB2R), B19R (B18R; ΔWR200), E5R, K7R, C12L (IL18BP), B8R, B14R, N1L, C11R, K1L, M1L, N2L, e/ou WR199. Em algumas modalidades, a tecnologia da presente divulgação se refere ao uso de qualquer um dos vírus anteriores como um adjuvante de vacina. Em particular, a presente tecnologia se refere ao uso de MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-OX40L, MVA∆E5R-hFlt3L-OX40L, MVA∆C7L∆E5R-hFlt3L-OX40L e MVA∆E5R inativado por calor como uma vacina adjuvante para antígenos de tumor em vacinas contra o câncer isoladamente ou em combinação com anticorpos de bloqueio de ponto de verificação imunológico (ICB) para uso como imunoterápico contra o câncer. Em algumas modalidades, a tecnologia da presente divulgação se refere ao uso de qualquer um dos vírus anteriores como um vetor de vacina. Em

particular, a presente tecnologia se refere ao uso de MVAΔE5R ou MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L como vetores de vacina para vacinas contra o câncer. Em algumas modalidades, a presente tecnologia se refere a um poxvírus recombinante selecionado a partir de MVAΔE3L-OX40L, MVAΔC7L-OX40L, MVAΔC7L-hFlt3L-OX40L, MVAΔC7LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, VACVΔC7L-OX40L, VACVΔC7L-hFlt3L-OX40L, VACVΔE5R, VACV-TK$^-$-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L, VACVΔB2R, VACVE3LΔ83NΔB2R, VACVΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83NΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12-ΔB2R, MYXVΔM31R, MYXVΔM31R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM63R, MYXVΔM64R, MVAΔWR199, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔWR199, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12ΔC11R, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12ΔC11R-hIL-15/IL-15α,VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200-hIL-15/IL-15Rα, VACVΔE5R-IL-15/IL-15Rα, VACVΔE5R-IL-15/IL-15Rα-OX40L, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200ΔC11R, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200-hIL-15/IL-15RαΔC11R, MYXVΔM63RΔM64R, MYXVΔM62R, MYXVΔM62RΔM63RΔM64R, MYXVΔM31R, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R, MYXVΔM63RΔM64R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-IL-15/IL-15Rα, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-CTLA-4, e MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-IL-15/IL-15Rα-CTLA-

4, ou combinações dos mesmos, sozinhos ou em combinação com agentes bloqueadores de pontos de verificação imunológico, agentes imunomoduladores e/ou medicamentos anticâncer como uma composição imunoterapêutica e/ou oncolítica.

ESTADO DA TÉCNICA

[0004] A seguinte descrição é fornecida para auxiliar a compreensão do leitor. Nenhuma das informações fornecidas ou referências citadas é admitida como estado da técnica.

[0005] Os tumores malignos, como o melanoma, são inerentemente resistentes às terapias convencionais e apresentam desafios terapêuticos significativos. A imunoterapia é uma área de pesquisa em evolução e uma opção adicional para o tratamento de certos tipos de câncer. A abordagem da imunoterapia se baseia na lógica de que o sistema imunológico pode ser estimulado a identificar células de tumor e direcioná-las para destruição. Apesar da apresentação de antígenos pelas células de câncer e da presença de células imunológicas que poderiam reagir potencialmente contra as células de tumor, em muitos casos, o sistema imunológico não é ativado ou é afirmativamente suprimido. A chave para esse fenômeno é a capacidade dos tumores de se protegerem da resposta imunológica, coagindo as células do sistema imunológico a inibir outras células do sistema imunológico. Os tumores desenvolvem vários mecanismos imunomoduladores para evitar as respostas imunológicas antitumorais. Assim, abordagens imunoterapêuticas melhoradas são necessárias para aumentar a imunidade antitumoral de células hospedeiras células de tumor alvo para destruição.

SUMÁRIO

[0006] Em um aspecto, a presente divulgação fornece um vírus vaccinia Ankara (MVA) modificado recombinante, caracterizado pelo fato de que compreende um gene C7 mutante e uma molécula de ácido nucleico heteróloga que codifica OX40L (MVAΔC7L-OX40L). Em algumas modalidades, o vírus MVAΔC7L-OX40L recombinante compreende ainda um ácido nucleico

heterólogo que codifica o ligante de tirosina quinase 3 tipo Fms humano (hFlt3L) (MVAΔC7L-hFlt3L-OX40L). Em algumas modalidades, o vírus MVAΔC7L-OX40L recombinante da presente tecnologia compreende ainda um gene da timidina quinase (TK) mutante. Em algumas modalidades, o vírus MVAΔC7L-OX40L recombinante compreende o gene de TK mutante compreende a substituição de pelo menos uma porção do gene por um ou mais cassetes de genes compreendendo uma molécula de ácido nucleico heteróloga. Em algumas modalidades, um ou mais cassetes de genes compreendem a molécula de ácido nucleico heteróloga que codifica OX40L. Em algumas modalidades, o gene C7 mutante compreende uma inserção de um ou mais cassetes de genes compreendendo uma molécula de ácido nucleico heteróloga. Em algumas modalidades, o gene C7 mutante compreende a substituição de pelo menos uma porção do gene por um ou mais cassetes de genes compreendendo uma molécula de ácido nucleico heteróloga. Em algumas modalidades, um ou mais cassetes de genes compreendem uma molécula de ácido nucleico heteróloga que codifica hFlt3L. Em algumas modalidades, o gene C7 mutante compreende a substituição de pelo menos uma porção do gene por um ou mais cassetes de genes compreendendo a molécula de ácido nucleico heteróloga que codifica hFlt3L, e em que o vírus compreende adicionalmente um gene de TK mutante que compreende a substituição de pelo menos uma porção do gene de TK por um ou mais cassetes de genes compreendendo a molécula de ácido nucleico heteróloga que codifica OX40L (MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-OX40L). Em algumas modalidades, o OX40L é expresso a partir de um gene viral de MVA. Em algumas modalidades, o OX40L é expresso a partir de dentro de um gene viral selecionado a partir do grupo que consiste no gene da timidina quinase (TK), o gene C7, o gene C11, o gene K3, o gene F1, o gene F2, o gene F4, o gene F6, o gene F8, o gene F9, o gene F11, o gene F14.5, o gene J2, o gene A46, o gene E3L, o gene B18R (WR200), o O gene E5R, o gene K7R, o gene C12L, o gene B8R, o gene B14R, o gene N1L, o gene K1L, o gene C16, o gene M1L, o

gene N2L e o gene WR199. Em algumas modalidades, o OX40L é expresso a partir de dentro do gene TK. Em algumas modalidades, o OX40L é expresso a partir de dentro de um gene TK e o hFlt3L é expresso a partir de dentro de do gene C7. Em algumas modalidades, o vírus compreende ainda uma molécula de ácido nucleico heteróloga que codifica um ou mais dentre hIL-2, hIL-12, hIL-15, hIL-15/IL-15Rα, hIL-18, hIL-21, anti-huCTLA-4, anti-huPD-1, anti-huPD-L1, GITRL, 4-1BBL ou CD40L e/ou uma deleção de qualquer um ou mais dentre E3L (ΔE3L), E3LΔ83N, B2R (ΔB2R), B19R (B18R; ΔWR200), IL18BP, E5R, K7R, C12L, B8R, B14R, N1L, C11R, K1L, M1L, N2L ou WR199. Em algumas modalidades, o vírus MVA recombinante exibe uma ou mais dentre as seguintes características: indução de níveis aumentados de células T efetoras em células de tumor em comparação com células de tumor infectadas com o vírus MVAΔC7L correspondente; indução de aumento da produção esplênica de células T efetoras em comparação com o vírus MVAΔC7L correspondente; e redução do volume do tumor em células de tumor em contato com o vírus MVAΔC7L-OX40L recombinante em comparação com as células de tumor em contato com o vírus MVAΔC7L correspondente. Em algumas modalidades, as células de tumor compreendem células de melanoma.

[0007] Em outro aspecto, a presente divulgação fornece uma composição imunogênica compreendendo o vírus MVAΔC7L-OX40L recombinante da presente tecnologia. Em algumas modalidades, a composição imunogênica compreende ainda um veículo farmaceuticamente aceitável. Em algumas modalidades, a composição imunogênica da presente tecnologia compreende um adjuvante farmaceuticamente aceitável.

[0008] Em outro aspecto, a presente divulgação fornece um método para tratar um tumor sólido em um indivíduo em necessidade, o método compreendendo a administração a um tumor de uma composição compreendendo uma quantidade eficaz do MVAΔC7L recombinante-a presente tecnologia. Em algumas modalidades, o tratamento compreende um ou mais dentre os seguintes: induzir uma resposta imunológica no indivíduo contra o

tumor ou aumentar ou promover uma resposta imunológica contínua contra o tumor no indivíduo, reduzir o tamanho do tumor, erradicar o tumor, inibir o crescimento do tumor, inibir o crescimento metastático do tumor, induzir apoptose de células de tumor ou prolongar a sobrevivência do indivíduo. Em algumas modalidades, o método para tratar um tumor sólido em um indivíduo em necessidade compreende a indução, o aumento ou a promoção da resposta imunológica compreende um ou mais dentre os seguintes: níveis aumentados de células T efetoras em células de tumor em comparação com células de tumor infectadas com o vírus MVAΔC7L correspondente; e aumento da produção esplênica de células T efetoras em comparação com o vírus MVAΔC7L correspondente. Em algumas modalidades, o método de tratamento de um tumor sólido em um indivíduo em necessidade, a composição é administrada por injeção intratumoral ou intravenosa ou uma combinação simultânea ou sequencial de injeção intratumoral e intravenosa. Em algumas modalidades do método de tratamento de um tumor sólido em um indivíduo em necessidade, o tumor é melanoma, cólon, mama, bexiga ou carcinoma da próstata. Em algumas modalidades do método de tratamento de um tumor sólido em um indivíduo em necessidade, a composição compreende um ou mais agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico. Em algumas modalidades do método de tratamento de um tumor sólido em um indivíduo em necessidade, o método compreende ainda a administração ao indivíduo de um ou mais agentes de bloqueio de ponto de verificação imunológico. Em algumas modalidades do método de tratamento de um tumor sólido em um indivíduo em necessidade, o um ou mais agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico são selecionados a partir do grupo que consiste em anticorpo anti-PD-1, anticorpo anti-PD-L1, anticorpo anti-CTLA-4, ipilimumabe, nivolumabe, pidilizumabe, lambrolizumabe, pembrolizumabe, atezolizumabe, avelumabe, durvalumabe, MPDL3280A, BMS-936559, MEDI-4736, MSB 00107180, LAG-3, TIM3, B7-H3, B7-H4, TIGIT, AMP-224, MDX-1105, arelumabe, tremelimumabe, IMP321, MGA271, BMS-986016, lirilumabe, urelumabe, PF-05082566,

IPH2101, MEDI-6469, CP-870.893, mogamulizumabe, varlilumabe, galiximabe, AMP-514, AUNP 12, Indoximode, NLG-919, INCB024360, CD80, DLBCL ICOS, PDR001 e qualquer combinação dos mesmos; e/ou Em algumas modalidades do método de tratamento de um tumor sólido em um indivíduo em necessidade, o um ou mais agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico compreendem anticorpo anti-PD-1. Em algumas modalidades do método de tratamento de um tumor sólido em um indivíduo em necessidade, o um ou mais agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico compreendem anticorpo anti-PD-L1. Em algumas modalidades do método de tratamento de um tumor sólido em um indivíduo em necessidade, o um ou mais agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico compreendem anticorpo anti-CTLA-4. Em algumas modalidades do método de tratamento de um tumor sólido em um indivíduo em necessidade, a combinação de MVAΔC7L-OX40L ou MVAΔC7L-hFlt3L-OX40L e o agente de bloqueio do ponto de verificação imunológico tem um efeito sinérgico no tratamento do tumor em comparação com administração quer de MVAΔC7L-OX40L ou MVAΔC7L-hFlt3L-OX40L ou do agentes de bloqueio de ponto de verificação imunológico sozinho.

[0009] Em outro aspecto, a presente divulgação fornece um método de estimulação de uma resposta imunológica compreendendo administrar a um indivíduo de uma quantidade eficaz do vírus da presente tecnologia (*por exemplo*, MVAΔC7L-OX40L, MVAΔC7L-hFlt3L-OX40L) ou uma composição imunogênica do presente tecnologia. Em algumas modalidades, o método compreende ainda administrar ao indivíduo de um ou mais dentre os agentes de bloqueio de ponto de verificação imunológico. Em algumas modalidades, o um ou mais agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico são selecionados a partir do grupo que consiste em anticorpo anti-PD-1, anticorpo anti-PD-L1, anticorpo anti-CTLA-4, ipilimumabe, nivolumabe, pidilizumabe, lambrolizumabe, pembrolizumabe, atezolizumabe, avelumabe, durvalumabe, MPDL3280A, BMS-936559, MEDI-4736, MSB 00107180, LAG-3, TIM3, B7-H3, B7-H4, TIGIT, AMP-224, MDX-1105, arelumabe, tremelimumabe, IMP321,

MGA271, BMS-986016, lirilumabe, urelumabe, PF-05082566, IPH2101, MEDI-6469, CP-870.893, mogamulizumabe, varlilumabe, galiximabe, AMP-514, AUNP 12, Indoximode, NLG-919, INCB024360, CD80, DLBCL ICOS, PDR001 e qualquer combinação dos mesmos; e/ou Em algumas modalidades, um ou mais dentre os agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico compreendem o anticorpo anti-PD-1. Em algumas modalidades, um ou mais dentre os agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico compreendem o anticorpo anti-PD-L1. Em algumas modalidades, um ou mais dentre os agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico compreendem o anticorpo anti-CTLA-4.

[0010] Em outro aspecto, a presente divulgação fornece um vírus vaccinia Ankara (MVA) modificado recombinante, caracterizado pelo fato de que compreende um gene E3 mutante e uma molécula de ácido nucleico heteróloga que codifica OX40L (MVAΔE3L-OX40L). Em algumas modalidades, o vírus MVAΔE3L-OX40L recombinante compreende ainda um gene da timidina quinase (TK) mutante. Em algumas modalidades, o gene TK mutante compreende a substituição de pelo menos uma porção do gene por um ou mais cassetes de genes compreendendo uma molécula de ácido nucleico heteróloga. Em algumas modalidades, um ou mais cassetes de genes compreendem a molécula de ácido nucleico heteróloga que codifica OX40L. Em algumas modalidades do vírus da presente tecnologia, o OX40L é expresso a partir de dentro de um gene viral MVA. Em algumas modalidades do vírus da presente tecnologia, o OX40L é expresso a partir de dentro de um gene viral selecionado a partir do grupo que consiste no gene da timidina quinase (TK), o gene C7, o gene C11, o gene K3, o gene F1, o gene F2, o gene F4, o gene F6, o gene F8, o gene F9, o gene F11, o gene F14.5, o gene J2, o gene A46, o gene E3L, o gene B18R (WR200), o gene E5R, o gene K7R, o gene C12L, o gene B8R, o gene B14R, o gene N1L, o gene K1L, o gene C16, o gene M1L, o gene N2L e o gene WR199. Em algumas modalidades do vírus da presente tecnologia, o OX40L é expresso a partir de dentro de um gene TK. Em algumas

modalidades do vírus da presente tecnologia, o vírus compreende ainda uma molécula de ácido nucleico heteróloga que codifica um ou mais dentre hFlt3L, hIL-2, hIL-12, hIL-15, hIL-15/IL-15Rα, hIL-18, hIL-21, anti-huCTLA-4, anti-huPD-1, anti-huPD-L1, GITRL, 4-1BBL ou CD40L e/ou uma deleção de qualquer um ou mais dentre E3LΔ83N, B2R (ΔB2R), B19R (B18R; ΔWR200), E5R, K7R, C12L (IL18BP), B8R, B14R, N1L, C11R, K1L, M1L, N2L ou WR199. Em algumas modalidades do vírus da presente tecnologia o vírus MVA recombinante exibe uma ou mais das seguintes características: indução de níveis aumentados de células T efetoras em células de tumor em comparação com células de tumor infectadas com o vírus MVAΔE3L correspondente; indução de aumento da produção esplênica de células T efetoras em comparação com o vírus MVAΔE3L correspondente; e redução do volume do tumor em células de tumor em contato com o vírus MVAΔE3L-OX40L recombinante em comparação com as células de tumor em contato com o vírus MVAΔE3L correspondente. Em algumas modalidades do vírus da presente tecnologia, as células de tumor compreendem células de melanoma. Em algumas modalidades, o gene E3 mutante é pelo menos parcialmente deletado, não é expresso, é expresso em níveis tão baixos que não tem efeito ou expresso como uma proteína não funcional. Em algumas modalidades, o gene TK mutante é pelo menos parcialmente deletado, não é expresso, é expresso em níveis tão baixos que não tem efeito ou expresso como uma proteína não funcional.

[0011] Em outro aspecto presente divulgação fornece uma composição imunogênica compreendendo o vírus MVAΔE3L-OX40L recombinante da presente tecnologia. Em algumas modalidades, a composição imunogênica da presente tecnologia compreende um veículo farmaceuticamente aceitável. Em algumas modalidades, a composição imunogênica da presente tecnologia compreende um adjuvante farmaceuticamente aceitável.

[0012] Em outro aspecto, a presente divulgação fornece um método para tratar um tumor sólido em um indivíduo em necessidade, o método compreendendo a administração a um tumor de uma composição compreendendo uma quantidade eficaz do vírus MVAΔE3L-OX40L recombinante presente tecnologia ou uma composição imunogênica da presente tecnologia. Em algumas modalidades do método para tratar um tumor sólido em um indivíduo em necessidade do mesmo, o tratamento compreende um ou mais dentre os seguintes: induzir uma resposta imunológica no indivíduo contra o tumor ou aumentar ou promover uma resposta imunológica contínua contra o tumor no indivíduo, reduzir o tamanho do tumor, erradicar o tumor, inibir o crescimento do tumor, inibir o crescimento metastático do tumor, induzir apoptose de células de tumor ou prolongar a sobrevivência do indivíduo. Em algumas modalidades do método de tratamento de um tumor sólido em um indivíduo em necessidade, a indução, o aumento ou a promoção da resposta imunológica compreende um ou mais dentre os seguintes: níveis aumentados de células T efetoras em células de tumor em comparação com células de tumor infectadas com o vírus MVAΔE3L correspondente; e aumento da produção esplênica de células T efetoras em comparação com o vírus MVAΔE3L correspondente. Em algumas modalidades do método para tratamento de um tumor sólido em um indivíduo em necessidade, a composição é administrada por injeção intratumoral ou intravenosa ou uma combinação simultânea ou sequencial de injeção intratumoral e intravenosa. Em algumas modalidades do método para tratamento de um tumor sólido em um indivíduo em necessidade, o tumor é melanoma, cólon, mama, bexiga ou carcinoma da próstata. Em algumas modalidades do método para tratamento de um tumor sólido em um indivíduo em necessidade, a composição compreende ainda um ou mais agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico. Em algumas modalidades do método para tratamento de um tumor sólido em um indivíduo em necessidade, o um ou mais agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico são selecionados a partir do

grupo que consiste em anticorpo anti-PD-1, anticorpo anti-PD-L1, anticorpo anti-CTLA-4, ipilimumabe, nivolumabe, pidilizumabe, lambrolizumabe, pembrolizumabe, atezolizumabe, avelumabe, durvalumabe, MPDL3280A, BMS-936559, MEDI-4736, MSB 00107180, LAG-3, TIM3, B7-H3, B7-H4, TIGIT, AMP-224, MDX-1105, arelumabe, tremelimumabe, IMP321, MGA271, BMS-986016, lirilumabe, urelumabe, PF-05082566, IPH2101, MEDI-6469, CP-870.893, mogamulizumabe, varlilumabe, galiximabe, AMP-514, AUNP 12, Indoximode, NLG-919, INCB024360, CD80, DLBCL ICOS, PDR001 e qualquer combinação dos mesmos; e/ou Em algumas modalidades do método para tratamento de um tumor sólido em um indivíduo em necessidade, o um ou mais agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico compreendem anticorpo anti-PD-1. Em algumas modalidades do método para tratamento de um tumor sólido em um indivíduo em necessidade, o um ou mais agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico compreendem anticorpo anti-PD-L1. Em algumas modalidades do método para tratamento de um tumor sólido em um indivíduo em necessidade, o um ou mais agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico compreendem anticorpo anti-CTLA-4. Em algumas modalidades do método para tratamento de um tumor sólido em um indivíduo em necessidade, a combinação de MVAΔE3L-OX40L e o agente de bloqueio do ponto de verificação imunológico tem um efeito sinérgico no tratamento do tumor em comparação com administração quer de MVAΔE3L-OX40L ou do agentes de bloqueio de ponto de verificação imunológico sozinho.

[0013] Em outro aspecto, a presente divulgação fornece um método de estimulação de uma resposta imunológica compreendendo administrar a um indivíduo de uma quantidade eficaz do vírus da presente tecnologia (*por exemplo*, MVAΔE3L-OX40L) ou uma composição imunogênica do presente tecnologia. Em algumas modalidades, o método compreende ainda administrar um ou mais agentes de bloqueio de ponto de verificação imunológico ao indivíduo. Em algumas modalidades, o um ou mais agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico são selecionados a partir do grupo que

consiste em anticorpo anti-PD-1, anticorpo anti-PD-L1, anticorpo anti-CTLA-4, ipilimumabe, nivolumabe, pidilizumabe, lambrolizumabe, pembrolizumabe, atezolizumabe, avelumabe, durvalumabe, MPDL3280A, BMS-936559, MEDI-4736, MSB 00107180, LAG-3, TIM3, B7-H3, B7-H4, TIGIT, AMP-224, MDX-1105, arelumabe, tremelimumabe, IMP321, MGA271, BMS-986016, lirilumabe, urelumabe, PF-05082566, IPH2101, MEDI-6469, CP-870.893, mogamulizumabe, varlilumabe, galiximabe, AMP-514, AUNP 12, Indoximode, NLG-919, INCB024360, CD80, DLBCL ICOS, PDR001 e qualquer combinação dos mesmos; e/ou Em algumas modalidades, um ou mais dentre os agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico compreendem o anticorpo anti-PD-1. Em algumas modalidades, um ou mais dentre os agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico compreendem o anticorpo anti-PD-L1. Em algumas modalidades, um ou mais dentre os agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico compreendem o anticorpo anti-CTLA-4. Em algumas modalidades, a combinação de MVAΔE3L-OX40L e o agente de bloqueio do ponto de verificação imunológico tem um efeito sinérgico no tratamento do tumor em comparação com administração quer de MVAΔE3L-OX40L ou do agentes de bloqueio de ponto de verificação imunológico sozinho.

[0014] Em outro aspecto, a presente divulgação fornece um vírus vaccinia (VACV) recombinante, compreendeendo um gene C7 mutante e uma molécula de ácido nucleico heteróloga que codifica OX40L (VACVΔC7L-OX40L). Em algumas modalidades, o vírus compreende ainda um ácido nucleico heterólogo que codifica o ligante de tirosina quinase 3 tipo Fms humano (hFlt3L) (VACVΔC7L-hFlt3L-OX40L). Em algumas modalidades, o vírus compreende ainda um gene da timidina quinase (TK) mutante. Em algumas modalidades, o gene TK mutante compreende a substituição de pelo menos uma porção do gene por um ou mais cassetes de genes compreendendo uma molécula de ácido nucleico heteróloga. Em algumas modalidades, um ou mais cassetes de genes compreendem a molécula de ácido nucleico heteróloga que codifica OX40L. Em algumas modalidades, o

gene C7 mutante compreende uma inserção de um ou mais cassetes de genes compreendendo uma molécula de ácido nucleico heteróloga. Em algumas modalidades, o gene C7 mutante compreende a substituição de pelo menos uma porção do gene por um ou mais cassetes de genes compreendendo uma molécula de ácido nucleico heteróloga. Em algumas modalidades, um ou mais cassetes de genes compreendem uma molécula de ácido nucleico heteróloga que codifica hFlt3L. Em algumas modalidades, o gene C7 mutante compreende a substituição de pelo menos uma porção do gene por um ou mais cassetes de genes compreendendo a molécula de ácido nucleico heteróloga que codifica hFlt3L, e em que o vírus compreende adicionalmente um gene de TK mutante que compreende a substituição de pelo menos uma porção do gene de TK por um ou mais cassetes de genes compreendendo a molécula de ácido nucleico heteróloga que codifica OX40L (VACVΔC7L-hFlt3L-TK(-)-OX40L). Em algumas modalidades, o OX40L é expresso a partir de um gene viral de vaccinia. Em algumas modalidades, o OX40L é expresso a partir de dentro de um gene viral selecionado a partir do grupo que consiste no gene da timidina quinase (TK), o gene C7, o gene C11, o gene K3, o gene F1, o gene F2, o gene F4, o gene F6, o gene F8, o gene F9, o gene F11, o gene F14.5, o gene J2, o gene A46, o gene E3L, o gene B18R (WR200), o O gene E5R, o gene K7R, o gene C12L, o gene B8R, o gene B14R, o gene N1L, o gene K1L, o gene C16, o gene M1L, o gene N2L e o gene WR199. Em algumas modalidades, o OX40L é expresso a partir de dentro do gene TK. Em algumas modalidades, o OX40L é expresso a partir de dentro de um gene TK e o hFlt3L é expresso a partir de dentro de do gene C7. Em algumas modalidades, o vírus compreende ainda uma molécula de ácido nucleico heteróloga que codifica um ou mais dentre hIL-2, hIL-12, hIL-15, hIL-15/IL-15Rα, hIL-18, hIL-21, anti-huCTLA-4, anti-huPD-1, anti-huPD-L1, GITRL, 4-1BBL ou CD40L e/ou uma deleção de qualquer um ou mais dentre E3L (ΔE3L), E3LΔ83N, B2R (ΔB2R), B19R (B18R; ΔWR200), E5R, K7R, C12L, IL18BP, B8R, B14R, N1L, C11R, K1L, M1L, N2L ou WR199. Em algumas modalidades, o vírus compreende ainda um ácido nucleico heterólogo que

codifica hIL-12 e um ácido nucleico heterólogo que codifica anti-huCTLA-4 (VACVΔC7L-anti-huCTLA-4-hFlt3L-OX40L-hIL-12). Em algumas modalidades, o vírus VACVΔC7L-OX40L recombinante exibe uma ou mais dentre as seguintes características: indução de níveis aumentados de células T efetoras em células de tumor em comparação com células de tumor infectadas com o vírus VACVΔC7L correspondente; indução de aumento da produção esplênica de células T efetoras em comparação com o vírus VACVΔC7L correspondente; e redução do volume do tumor em células de tumor em contato com o vírus VACVΔC7L-OX40L recombinante em comparação com as células de tumor em contato com o vírus VACVΔC7L correspondente. Em algumas modalidades, as células de tumor compreendem células de melanoma.

[0015] Em outro aspecto, a presente divulgação fornece uma composição imunogênica compreendendo o vírus VACVΔC7L-OX40L recombinante da presente tecnologia. Em algumas modalidades, a composição imunogênica compreende um veículo farmaceuticamente aceitável. Em algumas modalidades, a composição imunogênica compreende um adjuvante farmaceuticamente aceitável.

[0016] Em outro aspecto, a presente divulgação fornece um método para tratar um tumor sólido em um indivíduo em necessidade, o método compreendendo a administração a um tumor de uma composição compreendendo uma quantidade eficaz do vírus VACVΔC7L-OX40L recombinante presente tecnologia ou uma composição imunogênica da presente tecnologia. Em algumas modalidades do método para tratar um tumor sólido em um indivíduo em necessidade, o tratamento compreende um ou mais dentre os seguintes: induzir uma resposta imunológica no indivíduo contra o tumor ou aumentar ou promover uma resposta imunológica contínua contra o tumor no indivíduo, reduzir o tamanho do tumor, erradicar o tumor, inibir o crescimento do tumor, inibir o crescimento metastático do tumor, induzir apoptose de células de tumor ou prolongar a sobrevivência do indivíduo. Em algumas modalidades do método de tratamento de um tumor sólido em um

indivíduo em necessidade, a indução, o aumento ou a promoção da resposta imunológica compreende um ou mais dentre os seguintes: níveis aumentados de células T efetoras em células de tumor em comparação com células de tumor infectadas com o vírus VACVΔC7Lvirus correspondente; e aumento da produção esplênica de células T efetoras em comparação com o vírus VACVΔC7L correspondente. Em algumas modalidades do método para tratamento de um tumor sólido em um indivíduo em necessidade, a composição é administrada por injeção intratumoral ou intravenosa ou uma combinação simultânea ou sequencial de injeção intratumoral e intravenosa. Em algumas modalidades do método para tratamento de um tumor sólido em um indivíduo em necessidade, o tumor é melanoma, cólon, mama, bexiga ou carcinoma da próstata. Em algumas modalidades do método para tratamento de um tumor sólido em um indivíduo em necessidade, a composição compreende ainda um ou mais agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico. Em algumas modalidades, o método compreende ainda administrar ao indivíduo de um ou mais dentre os agentes de bloqueio de ponto de verificação imunológico. Em algumas modalidades, o um ou mais agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico são selecionados a partir do grupo que consiste em anticorpo anti-PD-1, anticorpo anti-PD-L1, anticorpo anti-CTLA-4, ipilimumabe, nivolumabe, pidilizumabe, lambrolizumabe, pembrolizumabe, atezolizumabe, avelumabe, durvalumabe, MPDL3280A, BMS-936559, MEDI-4736, MSB 00107180, LAG-3, TIM3, B7-H3, B7-H4, TIGIT, AMP-224, MDX-1105, arelumabe, tremelimumabe, IMP321, MGA271, BMS-986016, lirilumabe, urelumabe, PF-05082566, IPH2101, MEDI-6469, CP-870.893, mogamulizumabe, varlilumabe, galiximabe, AMP-514, AUNP 12, Indoximode, NLG-919, INCB024360, CD80, DLBCL ICOS, PDR001 e qualquer combinação dos mesmos; e/ou Em algumas modalidades do método para tratamento de um tumor sólido em um indivíduo em necessidade, o um ou mais agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico compreendem o um ou mais agentes de bloqueio de ponto de verificação imunológico compreende

anticorpo anti-PD-1. Em algumas modalidades do método para tratamento de um tumor sólido em um indivíduo em necessidade, o um ou mais agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico compreendem o um ou mais agentes de bloqueio de ponto de verificação imunológico compreende anticorpo anti-PD-L1. Em algumas modalidades do método para tratamento de um tumor sólido em um indivíduo em necessidade, compreende o um ou mais agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico compreendem anticorpo anti-CTLA-4. Em algumas modalidades do método para tratamento de um tumor sólido em um indivíduo em necessidade, a combinação de VACVΔC7L-OX40L ou VACVΔC7L-hFlt3L-OX40L e o agente de bloqueio do ponto de verificação imunológico tem um efeito sinérgico no tratamento do tumor em comparação com administração quer de VACVΔC7L-OX40L ou VACVΔC7L-hFlt3L-OX40L ou do agentes de bloqueio de ponto de verificação imunológico sozinho.

[0017] Em outro aspecto, a presente divulgação fornece um método para estimulação de uma resposta imunológica compreendendo administrar a um indivíduo de uma quantidade eficaz do vírus da presente tecnologia (*por exemplo*, VACVΔC7L-OX40L, VACVΔC7L-hFlt3L-OX40L) ou uma composição imunogênica do presente tecnologia. Em algumas modalidades, o método compreende ainda administrar um ou mais agentes de bloqueio de ponto de verificação imunológico. Em algumas modalidades, o um ou mais agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico são selecionados a partir do grupo que consiste em anticorpo anti-PD-1, anticorpo anti-PD-L1, anticorpo anti-CTLA-4, ipilimumabe, nivolumabe, pidilizumabe, lambrolizumabe, pembrolizumabe, atezolizumabe, avelumabe, durvalumabe, MPDL3280A, BMS-936559, MEDI-4736, MSB 00107180, LAG-3, TIM3, B7-H3, B7-H4, TIGIT, AMP-224, MDX-1105, arelumabe, tremelimumabe, IMP321, MGA271, BMS-986016, lirilumabe, urelumabe, PF-05082566, IPH2101, MEDI-6469, CP-870.893, mogamulizumabe, varlilumabe, galiximabe, AMP-514, AUNP 12, Indoximode, NLG-919, INCB024360, CD80, DLBCL ICOS, PDR001 e qualquer

combinação dos mesmos; e/ou Em algumas modalidades, o agente de bloqueio do ponto de verificação imunológico compreende anticorpo anti-PD-1. Em algumas modalidades, o agente de bloqueio do ponto de verificação imunológico compreende anticorpo anti-PD-L1. Em algumas modalidades, o agente de bloqueio do ponto de verificação imunológico compreende anticorpo anti-CTLA-4.

[0018] Em outro aspecto, a presente divulgação fornece uma sequência de ácido nucleico do vírus vaccinia Ankara (MVA) modificado recombinante, em que a sequência de ácido nucleico entre as posições 75.560 e 76.093 de SEQ ID NO: 1 é substituída por uma sequência de ácido nucleico heteróloga que compreende uma estrutura de leitura aberta que codifica OX40L e em que o MVA compreende ainda um mutante C7. Em algumas modalidades do vírus MVA da presente tecnologia, a sequência de ácido nucleico entre as posições 18.407 e 18.859 da SEQ ID NO: 1 é substituída por uma sequência de ácido nucleico heteróloga compreendendo uma estrutura de leitura aberta que codifica o ligante de tirosina quinase 3 tipo Fms humano (hFlt3L).

[0019] Em outro aspecto, a presente divulgação fornece uma sequência de ácido nucleico do vírus vaccinia Ankara (MVA) modificado recombinante, em que a sequência de ácido nucleico entre as posições 75.798 a 75.868 de SEQ ID NO: 1 é substituída por uma sequência de ácido nucleico heteróloga compreendendo uma estrutura de leitura aberta que codifica OX40L ou codifica ligante de tirosina quinase 3 tipo Fms humano (hFlt3L), e em que o MVA compreende ainda um mutante E3.

[0020] Em outro aspecto, a presente divulgação fornece uma sequência de ácido nucleico do vírus vaccinia (VACV) recombinante, em que a sequência de ácido nucleico entre as posições 80.962 e 81.032 da SEQ ID NO: 2 é substituída por uma sequência de ácido nucleico heteróloga que compreende uma estrutura de leitura aberta que codifica OX40L ou, e em que o VACV compreende ainda um mutante C7. Em algumas modalidades, a

sequência de ácido nucleico de VACV recombinante da presente tecnologia, entre as posições 15.716 e 16.168 da SEQ ID NO: 2 é substituída por uma sequência de ácido nucleico heteróloga compreendendo uma estrutura de leitura aberta que codifica o ligante de tirosina quinase 3 tipo Fms humano (hFlt3L).

[0021] Em outro aspecto, a presente divulgação fornece uma sequência de ácido nucleico que codifica o vírus MVAΔC7L-OX40L recombinante da presente tecnologia.

[0022] Em outro aspecto, a presente divulgação fornece uma sequência de ácido nucleico que codifica o vírus MVAΔE3L-OX40L recombinante da presente tecnologia.

[0023] Em outro aspecto, a presente divulgação fornece uma sequência de ácido nucleico que codifica o vírus VACVΔC7L-OX40L recombinante da presente tecnologia.

[0024] Em outro aspecto, a presente divulgação fornece um kit compreendendo o vírus MVAΔC7L-OX40L recombinante da presente tecnologia ou a composição imunogênica da presente tecnologia e instruções de uso.

[0025] Em outro aspecto, a presente divulgação fornece um kit compreendendo o vírus MVAΔE3L-OX40L recombinante de qualquer um da presente tecnologia ou a composição imunogênica da presente tecnologia e instruções de uso.

[0026] Em outro aspecto, a presente divulgação fornece um kit compreendendo o vírus VACVΔC7L-OX40L recombinante da presente tecnologia ou a composição imunogênica da presente tecnologia e instruções de uso.

[0027] Em algumas modalidades, a presente divulgação fornece um vírus MVAΔC7L-OX40L recombinante em que o gene C7 mutante é pelo menos parcialmente deletado, não é expresso, é expresso em níveis tão baixos que não tem efeito, ou expresso como uma proteína não funcional. Em

algumas modalidades, a presente divulgação fornece um vírus MVAΔC7L-OX40L recombinante em que o gene TK mutante é pelo menos parcialmente deletado, não é expresso, é expresso em níveis tão baixos que não tem efeito, ou expresso como uma proteína não funcional. Em algumas modalidades, a presente divulgação fornece um vírus MVAΔE3L-OX40L recombinante em que o gene E3 mutante é pelo menos parcialmente deletado, não é expresso, é expresso em níveis tão baixos que não tem efeito, ou expresso como uma proteína não funcional. Em algumas modalidades, a presente divulgação fornece um vírus MVAΔE3L-OX40L recombinante em que o gene TK mutante é pelo menos parcialmente deletado, não é expresso, é expresso em níveis tão baixos que não tem efeito, ou expresso como uma proteína não funcional. Em algumas modalidades, a presente tecnologia fornece um vírus VACVΔC7L-OX40L recombinante em que o gene C7 mutante é pelo menos parcialmente deletado, não é expresso, é expresso em níveis tão baixos que não tem efeito, ou expresso como uma proteína não funcional. Em algumas modalidades, a presente divulgação fornece um vírus VACVΔC7L-OX40L recombinante em que o gene TK mutante é pelo menos parcialmente deletado, não é expresso, é expresso em níveis tão baixos que não tem efeito, ou expresso como uma proteína não funcional.

[0028] Em outro aspecto, a presente divulgação fornecec um método para tratar um tumor sólido em um indivíduo em necessidade, o método caracterizado pelo fato de que compreende administrar ao indivíduo de um antígeno e uma quantidade terapeuticamente eficaz de um adjuvante compreendendo um vírus vaccinia Ankara (MVA) modificado recombinante compreendendo um gene C7 mutante e um ácido nucleico heterólogo que codifica OX40L (MVAΔC7L-OX40L). Em algumas modalidades, o vírus MVAΔC7L-OX40L compreende ainda um ácido nucleico heterólogo que codifica o ligante de tirosina quinase 3 tipo Fms humano (hFlt3L) (MVAΔC7L-hFlt3L-OX40L). Em algumas modalidades, o vírus compreende ainda um gene da timidina quinase (TK) mutante. Em algumas modalidades, o gene TK

mutante compreende a substituição de pelo menos uma porção do gene por um ou mais cassetes de genes compreendendo uma molécula de ácido nucleico heteróloga. Em algumas modalidades, um ou mais cassetes de genes compreendem a molécula de ácido nucleico heteróloga que codifica OX40L. Em algumas modalidades, o gene C7 mutante compreende uma inserção de um ou mais cassetes de genes compreendendo uma molécula de ácido nucleico heteróloga. Em algumas modalidades, o gene C7 mutante compreende a substituição de pelo menos uma porção do gene por um ou mais cassetes de genes compreendendo um ácido nucleico heterólogo. Em algumas modalidades, um ou mais cassetes de genes compreendem uma molécula de ácido nucleico heteróloga que codifica hFlt3L. Em algumas modalidades, o gene C7 mutante compreende a substituição de pelo menos uma porção do gene por um ou mais cassetes de genes compreendendo a molécula de ácido nucleico heteróloga que codifica hFlt3L, e em que o vírus compreende adicionalmente um gene de TK mutante que compreende a substituição de pelo menos uma porção do gene de TK por um ou mais cassetes de genes compreendendo a molécula de ácido nucleico heteróloga que codifica OX40L (MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-OX40L). Em algumas modalidades, o OX40L é expresso a partir de um gene viral de MVA. Em algumas modalidades, o OX40L é expresso a partir de dentro de um gene viral selecionado a partir do grupo que consiste no gene da timidina quinase (TK), o gene C7, o gene C11, o gene K3, o gene F1, o gene F2, o gene F4, o gene F6, o gene F8, o gene F9, o gene F11, o gene F14.5, o gene J2, o gene A46, o gene E3L, o gene B18R (WR200), o O gene E5R, o gene K7R, o gene C12L, o gene B8R, o gene B14R, o gene N1L, o gene K1L, o gene C16, o gene M1L, o gene N2L e o gene WR199. Em algumas modalidades, o OX40L é expresso a partir de dentro do gene TK. Em algumas modalidades, o OX40L é expresso a partir de dentro de um gene TK e o hFlt3L é expresso a partir de dentro de do gene C7. Em algumas modalidades, o vírus compreende ainda uma molécula de ácido nucleico heteróloga que codifica um ou mais dentre hIL-2, hIL-12, hIL-15, hIL-

15/IL-15Rα, hIL-18, hIL-21, anti-huCTLA-4, anti-huPD-1, anti-huPD-L1, GITRL, 4-1BBL ou CD40L e/ou uma deleção de qualquer um ou mais dentre E3L (ΔE3L), E3LΔ83N, B2R (ΔB2R), B19R (B18R; ΔWR200), IL18BP, E5R, K7R, C12L, B8R, B14R, N1L, C11R, K1L, M1L, N2L ou WR199.

[0029] Em algumas modalidades o antígeno é selecionado a partir do grupo que consiste em antígenos de diferenciação de tumor, antígenos de testículo de câncer, neoantígenos, antígenos virais no caso de tumores associados à infecção por vírus oncogênicos, GPA33, HER2/neu, GD2, MAGE-1, MAGE-3, BAGE, GAGE-1, GAGE-2, MUM-1, CDK4, N-acetilglucosaminiltransferase, p15, gp75, beta-catenina, ErbB2, antígeno de câncer 125 (CA-125), antígeno carcinoembrionário (CEA), RAGE, MART (antígeno de melanoma), MUC-1, MUC-2, MUC-3, MUC-4, MUC-5ac, MUC-16, MUC-17, tirosinase, proteínas relacionadas à tirosinase 1 e 2, Pmel 17 (gp100), sequência de íntron V GnT-V (sequência de íntron V de N-acetilglucoaminiltransferase V), câncer de próstata psm, PRAME (antígeno de melanoma), β-catenina, EBNA (antígeno nuclear do vírus Epstein-Barr) 1-6, p53, kras, proteína de resistência pulmonar (LRP) Bcl-2, antígeno específico da próstata (PSA), Ki-67, CEACAM6, antígeno específico do cólon-p (CSAp), NY-ESO-1, vírus do papiloma humano E6 e E7, e qualquer combinação dos mesmos.

[0030] Em algumas modalidades a etapa de administrar compreende administrar o antígeno e adjuvante em uma ou mais doses e/ou em que o antígeno e o adjuvante são administrados separadamente, sequencialmente ou simultaneamente.

[0031] Em algumas modalidades o método compreende ainda administrar ao indivíduo um agente de bloqueio de ponto de verificação imunológico selecionados a partir do grupo que consiste em anticorpo anti-PD-1, anticorpo anti-PD-L1, anticorpo anti-CTLA-4, ipilimumabe, nivolumabe, pidilizumabe, lambrolizumabe, pembrolizumabe, atezolizumabe, avelumabe, durvalumabe, MPDL3280A, BMS-936559, MEDI-4736, MSB 00107180, LAG-3,

TIM3, B7-H3, B7-H4, TIGIT, AMP-224, MDX-1105, arelumabe, tremelimumabe, IMP321, MGA271, BMS-986016, lirilumabe, urelumabe, PF-05082566, IPH2101, MEDI-6469, CP-870.893, mogamulizumabe, varlilumabe, galiximabe, AMP-514, AUNP 12, Indoximode, NLG-919, INCB024360, CD80, DLBCL ICOS, PDR001 e qualquer combinação dos mesmos; e/ou

[0032] Em algumas modalidades o antígeno e o adjuvante são administrados ao indivíduo separadamente, sequencialmente ou simultaneamente com a administração do agente de bloqueio do ponto de verificação imunológico.

[0033] Em algumas modalidades o tratamento compreende um ou mais dentre os seguintes: induzir uma resposta imunológica no indivíduo contra o tumor ou aumentar ou promover uma resposta imunológica contínua contra o tumor no indivíduo, reduzir o tamanho do tumor, erradicar o tumor, inibir o crescimento do tumor, inibir o crescimento metastático do tumor, induzir apoptose de células de tumor ou prolongar a sobrevivência do indivíduo. Em algumas modalidades, a indução, aumento ou a promoção da resposta imunológica compreende um ou mais dentre os seguintes: (i) níveis aumentados de expressão de interferon gama (IFN-γ) em células T no baço, drenagem de nódulos linfáticos e/ou soro em comparação com uma amostra de controle não tratada; (ii) níveis aumentados de células T específicas do antígeno no baço, drenagem dos nódulos linfáticos e/ou soro em comparação com uma amostra de controle não tratada; e (iii) níveis aumentados de imunoglobulina específica do antígeno no soro em comparação com uma amostra de controle não tratada. Em algumas modalidades, a imunoglobulina específica do antígeno é IgG1 ou IgG2.

[0034] Em algumas modalidades, o antígeno e o adjuvante são formulados para serem administrados por via intratumoral, intramuscular, intradérmica ou subcutânea.

[0035] Em algumas modalidades o tumor é selecionado a partir do grupo que consiste em melanoma, câncer colorretal, câncer de mama, câncer

de bexiga, câncer de próstata, câncer de pulmão, câncer de pâncreas, câncer de ovário, carcinoma de células escamosas da pele, carcinoma de células de Merkel, câncer gástrico, câncer de fígado e sarcoma.

[0036] Em algumas modalidades o vírus MVAΔC7L-OX40L é administrado em uma dosagem por administração de cerca de 10^5 a cerca de 10^{10} unidades formadoras de placas (pfu).

[0037] Em algumas modalidades do método, o indivíduo é humano.

[0038] Em um aspecto, a presente divulgação fornece uma composição imunogênica compreendendo o antígeno e o adjuvante da presente tecnologia. Em algumas modalidades, a composição imunogênica compreende ainda um veículo farmaceuticamente aceitável. Em algumas modalidades o antígeno é selecionado a partir do grupo que consiste em antígenos de diferenciação de tumor, antígenos de testículo de câncer, neoantígenos, antígenos virais no caso de tumores associados à infecção por vírus oncogênicos, GPA33, HER2/neu, GD2, MAGE-1, MAGE-3, BAGE, GAGE-1, GAGE-2, MUM-1, CDK4, N-acetilglucosaminiltransferase, p15, gp75, beta-catenina, ErbB2, antígeno de câncer 125 (CA-125), antígeno carcinoembrionário (CEA), RAGE, MART (antígeno de melanoma), MUC-1, MUC-2, MUC-3, MUC-4, MUC-5ac, MUC-16, MUC-17, tirosinase, proteínas relacionadas à tirosinase 1 e 2, Pmel 17 (gp100), sequência de íntron V GnT-V (sequência de íntron V de N-acetilglucoaminiltransferase V), câncer de próstata psm, PRAME (antígeno de melanoma), β-catenina, EBNA (antígeno nuclear do vírus Epstein-Barr) 1-6, p53, kras, proteína de resistência pulmonar (LRP) Bcl-2, antígeno específico da próstata (PSA), Ki-67, CEACAM6, antígeno específico do cólon-p (CSAp), NY-ESO-1, vírus do papiloma humano E6 e E7, e qualquer combinação dos mesmos. Em algumas modalidades, a composição imunogênica compreende ainda um agentes de bloqueio de ponto de verificação imunológico selecionado a partir do grupo consistindo em anticorpo anti-PD-1, anticorpo anti-PD-L1, anticorpo anti-CTLA-4, ipilimumabe, nivolumabe, pidilizumabe, lambrolizumabe, pembrolizumabe, atezolizumabe,

avelumabe, durvalumabe, MPDL3280A, BMS-936559, MEDI-4736, MSB 00107180, LAG-3, TIM3, B7-H3, B7-H4, TIGIT, AMP-224, MDX-1105, arelumabe, tremelimumabe, IMP321, MGA271, BMS-986016, lirilumabe, urelumabe, PF-05082566, IPH2101, MEDI-6469, CP-870.893, mogamulizumabe, varlilumabe, galiximabe, AMP-514, AUNP 12, Indoximode, NLG-919, INCB024360, CD80, DLBCL ICOS, PDR001 e qualquer combinação dos mesmos; e/ou

[0039] Em um aspecto a presente divulgação fornece um kit compreendendo instruções de uso, um recipiente e uma porção separada de cada um de: (a) um antígeno; e (b) um adjuvante da presente tecnologia. Em algumas modalidades do kit o antígeno é selecionado a partir do grupo que consiste em antígenos de diferenciação de tumor, antígenos de testículo de câncer, neoantígenos, antígenos virais no caso de tumores associados à infecção por vírus oncogênicos, GPA33, HER2/neu, GD2, MAGE-1, MAGE-3, BAGE, GAGE-1, GAGE-2, MUM-1, CDK4, N-acetilglucosaminiltransferase, p15, gp75, beta-catenina, ErbB2, antígeno de câncer 125 (CA-125), antígeno carcinoembrionário (CEA), RAGE, MART (antígeno de melanoma), MUC-1, MUC-2, MUC-3, MUC-4, MUC-5ac, MUC-16, MUC-17, tirosinase, proteínas relacionadas à tirosinase 1 e 2, Pmel 17 (gp100), sequência de íntron V GnT-V (sequência de íntron V de N-acetilglucoaminiltransferase V), câncer de próstata psm, PRAME (antígeno de melanoma), β-catenina, EBNA (antígeno nuclear do vírus Epstein-Barr) 1-6, p53, kras, proteína de resistência pulmonar (LRP) Bcl-2, antígeno específico da próstata (PSA), Ki-67, CEACAM6, antígeno específico do cólon-p (CSAp), NY-ESO-1, vírus do papiloma humano E6 e E7, e qualquer combinação dos mesmos.

[0040] Em algumas modalidades o kit compreende ainda (c) um agente de bloqueio de ponto de verificação imunológico selecionados a partir do grupo que consiste em anticorpo anti-PD-1, anticorpo anti-PD-L1, anticorpo anti-CTLA-4, ipilimumabe, nivolumabe, pidilizumabe, lambrolizumabe, pembrolizumabe, atezolizumabe, avelumabe, durvalumabe, MPDL3280A,

BMS-936559, MEDI-4736, MSB 00107180, LAG-3, TIM3, B7-H3, B7-H4, TIGIT, AMP-224, MDX-1105, arelumabe, tremelimumabe, IMP321, MGA271, BMS-986016, lirilumabe, urelumabe, PF-05082566, IPH2101, MEDI-6469, CP-870.893, mogamulizumabe, varlilumabe, galiximabe, AMP-514, AUNP 12, Indoximode, NLG-919, INCB024360, CD80, DLBCL ICOS, PDR001 e qualquer combinação dos mesmos.

[0041] Em algumas modalidades dos métodos da presente tecnologia, o antígeno é um neoantígeno selecionado a partir do grupo que consiste em M27 (REGVELCPGNKYEMRRHGTTHSLVIHD) (SEQ ID NO: 17), M30 (PSKPSFQEFVDWENVSPELNSTDQPFL) (SEQ ID NO: 18), M48 (SHCHWNDLAVIPAGVVHNWDFEPRKVS) (SEQ ID NO: 19), e as combinações dos mesmos.

[0042] Em algumas modalidades das composições imunogênicas da presente tecnologia, o antígeno é um neoantígeno selecionado a partir do grupo que consiste em M27 (REGVELCPGNKYEMRRHGTTHSLVIHD) (SEQ ID NO: 17), M30 (PSKPSFQEFVDWENVSPELNSTDQPFL) (SEQ ID NO: 18), M48 (SHCHWNDLAVIPAGVVHNWDFEPRKVS) (SEQ ID NO: 19), e as combinações dos mesmos.

[0043] Em algumas modalidades do kit da presente tecnologia, o antígeno é um neoantígeno selecionado a partir do grupo que consiste em M27 (REGVELCPGNKYEMRRHGTTHSLVIHD) (SEQ ID NO: 17), M30 (PSKPSFQEFVDWENVSPELNSTDQPFL) (SEQ ID NO: 18), M48 (SHCHWNDLAVIPAGVVHNWDFEPRKVS) (SEQ ID NO: 19), e as combinações dos mesmos.

[0044] Em um aspecto, a presente divulgação fornece um vírus vaccinia Ankara (MVA) modificado geneticamente, modificado para compreender um gene E5R mutante (MVAΔE5R). Em algumas modalidades o vírus compreende ainda uma molécula de ácido nucleico heteróloga que codifica um ou mais dentre OX40L, hFlt3L, hIL-2, hIL-12, hIL-15, hIL-15/IL-15Rα, hIL-18, hIL-21, anti-huCTLA-4, anti-huPD-1, anti-huPD-L1, GITRL, 4-

1BBL, ou CD40L, e/ou uma deleção de acordo com qualquer um ou mais dentre timidina quinase (TK) C7 (ΔC7L), E3L (ΔE3L), E3LΔ83N, B2R (ΔB2R), B19R (B18R; ΔWR200), IL18BP, K7R, C12L, B8R, B14R, N1L, C11R, K1L, M1L, N2L, ou WR199. Em algumas modalidades, o gene E5R mutante compreende a substituição de pelo menos uma porção do gene por um ou mais cassetes de genes compreendendo uma molécula de ácido nucleico heteróloga. Em algumas modalidades, um ou mais cassetes de genes compreendem uma molécula de ácido nucleico heteróloga que codifica OX40L (MVAΔE5R-OX40L). Em algumas modalidades o um ou mais cassetes de genes compreende ainda uma molécula de ácido nucleico heterólogo que codifica o ligante de tirosina quinase 3 tipo Fms humano (hFlt3L) (MVAΔE5R-OX40L-hFlt3L). Em algumas modalidades o um ou mais cassetes de genes compreende ainda uma molécula de ácido nucleico heterólogo que codifica o ligante de tirosina quinase 3 tipo Fms humano (hFlt3L) (MVAΔE5R-hFlt3L). Em algumas modalidades, o ácido nucleico heterólogo é expresso a partir de dentro de um gene viral selecionado a partir do grupo que consiste no gene da timidina quinase (TK), o gene C7, o gene C11, o gene K3, o gene F1, o gene F2, o gene F4, o gene F6, o gene F8, o gene F9, o gene F11, o gene F14.5, o gene J2, o gene A46, o gene E3L, o gene B18R (WR200), o O gene E5R, o gene K7R, o gene C12L, o gene B8R, o gene B14R, o gene N1L, o gene K1L, o gene C16, o gene M1L, o gene N2L e o gene WR199. Em algumas modalidades, o vírus compreende ainda um gene da timidina quinase (TK) mutante. Em algumas modalidades, o gene TK mutante compreende a substituição de pelo menos uma porção do gene por um ou mais cassetes de genes compreendendo uma molécula de ácido nucleico heteróloga. Em algumas modalidades, o vírus compreende ainda um gene C7 mutante. Em algumas modalidades, o gene C7 mutante compreende uma inserção de um ou mais cassetes de genes compreendendo uma molécula de ácido nucleico heteróloga. Em algumas modalidades, o gene C7 mutante compreende a

substituição de pelo menos uma porção do gene por um ou mais cassetes de genes compreendendo uma molécula de ácido nucleico heteróloga.

[0045] Em um aspecto, a presente divulgação fornece uma composição imunogênica compreendendo o vírus MVAΔE5R. Em algumas modalidades, a composição imunogênica compreende ainda um veículo farmaceuticamente aceitável. Em algumas modalidades, a composição imunogênica compreende ainda um adjuvante farmaceuticamente aceitável.

[0046] Em algumas modalidades, a presente divulgação fornece um método para tratar um tumor sólido em um indivíduo em necessidade, o método compreendendo administrar a um tumor uma composição que compreende uma quantidade eficaz do vírus MVAΔE5R ou a composição imunogênica. Em algumas modalidades, o tratamento compreende um ou mais dentre os seguintes: induzir uma resposta imunológica no indivíduo contra o tumor ou aumentar ou promover uma resposta imunológica contínua contra o tumor no indivíduo, reduzir o tamanho do tumor, erradicar o tumor, inibir o crescimento do tumor, inibir o crescimento metastático do tumor, induzir apoptose de células de tumor ou prolongar a sobrevivência do indivíduo. Em algumas modalidades, a composição é administrada por injeção intratumoral ou intravenosa ou uma combinação simultânea ou sequencial de injeção intratumoral e intravenosa. Em algumas modalidades, o tumor é melanoma, cólon, mama, bexiga ou carcinoma da próstata. Em algumas modalidades, a composição compreende ainda um ou mais agentes selecionados a partir de: um ou mais agentes de bloqueio de ponto de verificação imunológico; um ou mais medicamentos anticâncer, fingolimode (FTY720); e qualquer combinação dos mesmos.

[0047] Em algumas modalidades, o método compreende ainda administrar separada, sequencial ou simultaneamente ao indivíduo um ou mais agentes selecionados a partir de: um ou mais agentes de bloqueio de ponto de verificação imunológico; um ou mais medicamentos anticâncer, fingolimode (FTY720); e qualquer combinação dos mesmos. Em algumas modalidades, o

um ou mais agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico são selecionados a partir do grupo que consiste em anticorpo anti-PD-L1, anticorpo anti-PD-1, anticorpo anti-CTLA-4, ipilimumabe, nivolumabe, pidilizumabe, lambrolizumabe, pembrolizumabe, atezolizumabe, avelumabe, durvalumabe, MPDL3280A, BMS-936559, MEDI-4736, MSB 00107180, LAG-3, TIM3, B7-H3, B7-H4, TIGIT, AMP-224, MDX-1105, arelumabe, tremelimumabe, IMP321, BMS-986016, lirilumabe, urelumabe, PF-05082566, IPH2101, MEDI-6469, CP-870.893, Mogamulizumabe, Varlilumabe, Galiximabe, AMP-514, AUNP 12, Indoximod, NLG-919, INCB024360, CD80, CD86, ICOS, Inibidores DLBCL, BTLA, PDR001 e qualquer combinação dos mesmos; e/ou um ou mais medicamentos anticâncer são selecionados a partir do grupo que consiste em um inibidor de Mek (U0126, selumitinibe (AZD6244), PD98059, trametinibe, cobimetinibe), um inibidor de EGFR (lapatinibe (LPN), erlotinibe (ERL)), um inibidor HER2 (lapatinibe (LPN), Trastuzumabe), um inibidor de Raf (sorafenibe (SFN)), um inibidor de BRAF (dabrafenibe, vemurafenibe), um anticorpo anti-OX40, um anticorpo agonista GITR, um anticorpo anti-CSFR, a Inibidor de CSFR, paclitaxel, agonista de TLR9 CpG e um inibidor de VEGF (Bevacizumabe) e qualquer combinação dos mesmos. Em algumas modalidades, um ou mais dentre os agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico compreendem o anticorpo anti-PD-L1. Em algumas modalidades, um ou mais dentre os agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico compreendem o anticorpo anti-PD-1. Em algumas modalidades, um ou mais dentre os agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico compreendem o anticorpo anti-CTLA-4. Em algumas modalidades, a combinação do vírus MVAΔE5R com o agente de bloqueio do ponto de verificação imunológico, medicamento anticâncer e/ou fingolimode (FTY720) tem um efeito sinérgico no tratamento do tumor em comparação com a administração do vírus MVAΔE5R ou de o agente de bloqueio de ponto de verificação imunológico, medicamento anticâncer ou fingolimode (FTY720) sozinho.

[0048] Em outro aspecto, a presente divulgação fornece um método de estimulação de uma resposta imunológica compreendendo administrar a um indivíduo uma quantidade eficaz do vírus ou a composição imunogênica. Em algumas modalidades, o método compreende ainda administrar separada, sequencial ou simultaneamente ao indivíduo um ou mais agentes selecionados a partir de: um ou mais agentes de bloqueio de ponto de verificação imunológico; um ou mais medicamentos anticâncer, fingolimode (FTY720); e qualquer combinação dos mesmos. Em algumas modalidades, o um ou mais agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico são selecionados a partir do grupo que consiste em anticorpo anti-PD-L1, anticorpo anti-PD-1, anticorpo anti-CTLA-4, ipilimumabe, nivolumabe, pidilizumabe, lambrolizumabe, pembrolizumabe, atezolizumabe, avelumabe, durvalumabe, MPDL3280A, BMS-936559, MEDI-4736, MSB 00107180, LAG-3, TIM3, B7-H3, B7-H4, TIGIT, AMP-224, MDX-1105, arelumabe, tremelimumabe, IMP321, BMS-986016, lirilumabe, urelumabe, PF-05082566, IPH2101, MEDI-6469, CP-870.893, Mogamulizumabe, Varlilumabe, Galiximabe, AMP-514, AUNP 12, Indoximod, NLG-919, INCB024360, CD80, CD86, ICOS, Inibidores DLBCL, BTLA, PDR001 e qualquer combinação dos mesmos; e/ou um ou mais medicamentos anticâncer são selecionados a partir do grupo que consiste em um inibidor de Mek (U0126, selumitinibe (AZD6244), PD98059, trametinibe, cobimetinibe), um inibidor de EGFR (lapatinibe (LPN), erlotinibe (ERL)), um inibidor HER2 (lapatinibe (LPN), Trastuzumabe), um inibidor de Raf (sorafenibe (SFN)), um inibidor de BRAF (dabrafenibe, vemurafenibe), um anticorpo anti-OX40, um anticorpo agonista GITR, um anticorpo anti-CSFR, a Inibidor de CSFR, paclitaxel, agonista de TLR9 CpG e um inibidor de VEGF (Bevacizumabe) e qualquer combinação dos mesmos. Em algumas modalidades, um ou mais dentre os agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico compreendem o anticorpo anti-PD-L1. Em algumas modalidades, um ou mais dentre os agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico compreendem o anticorpo anti-PD-1. Em algumas modalidades, um ou mais

dentre os agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico compreendem o anticorpo anti-CTLA-4. Em algumas modalidades, a combinação do vírus MVAΔE5R com o agente de bloqueio do ponto de verificação imunológico, medicamento anticâncer e/ou fingolimode (FTY720) tem um efeito sinérgico na estimulação de uma resposta imunológica em comparação com a administração do vírus MVAΔE5R ou do agente de bloqueio de ponto de verificação imunológico, medicamento anticâncer ou fingolimode (FTY720) sozinho.

[0049] Em um aspecto, a presente divulgação fornece um ácido nucleico que codifica os vírus MVAΔE5R manipulados descritos neste documento.

[0050] Em um aspecto, a presente divulgação fornece um kit que compreende os vírus MVAΔE5R projetados descritos neste documento e instruções de uso.

[0051] Em um aspecto, a presente divulgação fornece um vírus vaccinia (VACV) geneticamente modificado para compreender um gene E5R mutante (VACVΔE5R). Em algumas modalidades o vírus compreende ainda uma molécula de ácido nucleico heteróloga que codifica um ou mais dentre OX40L, hFlt3L, hIL-2, hIL-12, hIL-15, hIL-15/IL-15Rα, hIL-18, hIL-21, anti-huCTLA-4, anti-huPD-1, anti-huPD-L1, GITRL, 4-1BBL, ou CD40L, e/ou uma deleção de acordo com qualquer um ou mais dentre timidina quinase (TK) C7 (ΔC7L), E3L (ΔE3L), E3LΔ83N, B2R (ΔB2R), B19R (B18R; ΔWR200), IL18BP, K7R, C12L, B8R, B14R, N1L, C11R, K1L, M1L, N2L, ou WR199. Em algumas modalidades, o gene E5R mutante compreende a substituição de pelo menos uma porção do gene por um ou mais cassetes de genes compreendendo uma molécula de ácido nucleico heteróloga. Em algumas modalidades, um ou mais cassetes de genes compreendem uma molécula de ácido nucleico heteróloga que codifica OX40L (VACVΔE5R-OX40L). Em algumas modalidades o um ou mais cassetes de genes compreende ainda uma molécula de ácido nucleico heterólogo que codifica o ligante de tirosina quinase 3 tipo Fms humano

(hFlt3L) (VACVΔE5R-OX40L-hFlt3L). Em algumas modalidades o um ou mais cassetes de genes compreende ainda uma molécula de ácido nucleico heterólogo que codifica o ligante de tirosina quinase 3 tipo Fms humano (hFlt3L) (VACVΔE5R-hFlt3L). Em algumas modalidades, o ácido nucleico heterólogo é expresso a partir de dentro de um gene viral selecionado a partir do grupo que consiste no gene da timidina quinase (TK), o gene C7, o gene C11, o gene K3, o gene F1, o gene F2, o gene F4, o gene F6, o gene F8, o gene F9, o gene F11, o gene F14.5, o gene J2, o gene A46, o gene E3L, o gene B18R (WR200), o O gene E5R, o gene K7R, o gene C12L, o gene B8R, o gene B14R, o gene N1L, o gene K1L, o gene C16, o gene M1L, o gene N2L e o gene WR199. Em algumas modalidades, o vírus compreende ainda um gene da timidina quinase (TK) mutante. Em algumas modalidades, o gene TK mutante compreende a substituição de pelo menos uma porção do gene por um ou mais cassetes de genes compreendendo uma molécula de ácido nucleico heteróloga. Em algumas modalidades, o vírus compreende ainda um gene C7 mutante. Em algumas modalidades, o gene C7 mutante compreende uma inserção de um ou mais cassetes de genes compreendendo uma molécula de ácido nucleico heteróloga. Em algumas modalidades, o gene C7 mutante compreende a substituição de pelo menos uma porção do gene por um ou mais cassetes de genes compreendendo uma molécula de ácido nucleico heteróloga.

[0052] Em um aspecto, a presente divulgação fornece uma composição imunogênica compreendendo o vírus VACVΔE5R. Em algumas modalidades, a composição imunogênica compreende ainda um veículo farmaceuticamente aceitável. Em algumas modalidades, a composição imunogênica compreende ainda um adjuvante farmaceuticamente aceitável.

[0053] Em algumas modalidades, a presente divulgação fornece um método para tratar um tumor sólido em um indivíduo em necessidade, o método compreendendo administrar a um tumor uma composição que compreende uma quantidade eficaz do vírus VACVΔE5R ou a composição

imunogênica. Em algumas modalidades, o tratamento compreende um ou mais dentre os seguintes: induzir uma resposta imunológica no indivíduo contra o tumor ou aumentar ou promover uma resposta imunológica contínua contra o tumor no indivíduo, reduzir o tamanho do tumor, erradicar o tumor, inibir o crescimento do tumor, inibir o crescimento metastático do tumor, induzir apoptose de células de tumor ou prolongar a sobrevivência do indivíduo. Em algumas modalidades, a composição é administrada por injeção intratumoral ou intravenosa ou uma combinação simultânea ou sequencial de injeção intratumoral e intravenosa. Em algumas modalidades, o tumor é melanoma, cólon, mama, bexiga ou carcinoma da próstata. Em algumas modalidades, a composição compreende ainda um ou mais agentes selecionados a partir de: um ou mais agentes de bloqueio de ponto de verificação imunológico; um ou mais medicamentos anticâncer, fingolimode (FTY720); e qualquer combinação dos mesmos.

[0054] Em algumas modalidades, o método compreende ainda administrar separada, sequencial ou simultaneamente ao indivíduo um ou mais agentes selecionados a partir de: um ou mais agentes de bloqueio de ponto de verificação imunológico; um ou mais medicamentos anticâncer, fingolimode (FTY720); e qualquer combinação dos mesmos. Em algumas modalidades, o um ou mais agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico são selecionados a partir do grupo que consiste em anticorpo anti-PD-L1, anticorpo anti-PD-1, anticorpo anti-CTLA-4, ipilimumabe, nivolumabe, pidilizumabe, lambrolizumabe, pembrolizumabe, atezolizumabe, avelumabe, durvalumabe, MPDL3280A, BMS-936559, MEDI-4736, MSB 00107180, LAG-3, TIM3, B7-H3, B7-H4, TIGIT, AMP-224, MDX-1105, arelumabe, tremelimumabe, IMP321, BMS-986016, lirilumabe, urelumabe, PF-05082566, IPH2101, MEDI-6469, CP-870.893, Mogamulizumabe, Varlilumabe, Galiximabe, AMP-514, AUNP 12, Indoximod, NLG-919, INCB024360, CD80, CD86, ICOS, Inibidores DLBCL, BTLA, PDR001 e qualquer combinação dos mesmos; e/ou um ou mais medicamentos anticâncer são selecionados a partir do grupo que consiste em

um inibidor de Mek (U0126, selumitinibe (AZD6244), PD98059, trametinibe, cobimetinibe), um inibidor de EGFR (lapatinibe (LPN), erlotinibe (ERL)), um inibidor HER2 (lapatinibe (LPN), Trastuzumabe), um inibidor de Raf (sorafenibe (SFN)), um inibidor de BRAF (dabrafenibe, vemurafenibe), um anticorpo anti-OX40, um anticorpo agonista GITR, um anticorpo anti-CSFR, a Inibidor de CSFR, paclitaxel, agonista de TLR9 CpG e um inibidor de VEGF (Bevacizumabe) e qualquer combinação dos mesmos. Em algumas modalidades, um ou mais dentre os agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico compreendem o anticorpo anti-PD-L1. Em algumas modalidades, um ou mais dentre os agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico compreendem o anticorpo anti-PD-1. Em algumas modalidades, um ou mais dentre os agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico compreendem o anticorpo anti-CTLA-4. Em algumas modalidades, a combinação do vírus VACVΔE5R com o agente de bloqueio do ponto de verificação imunológico, medicamento anticâncer e/ou fingolimode (FTY720) tem um efeito sinérgico no tratamento do tumor em comparação com a administração do vírus VACVΔE5R ou de o agente de bloqueio de ponto de verificação imunológico, medicamento anticâncer ou fingolimode (FTY720) sozinho.

[0055] Em outro aspecto, a presente divulgação fornece um método de estimulação de uma resposta imunológica compreendendo administrar a um indivíduo uma quantidade eficaz do vírus ou a composição imunogênica. Em algumas modalidades, o método compreende ainda administrar separada, sequencial ou simultaneamente ao indivíduo um ou mais agentes selecionados a partir de: um ou mais agentes de bloqueio de ponto de verificação imunológico; um ou mais medicamentos anticâncer, fingolimode (FTY720); e qualquer combinação dos mesmos. Em algumas modalidades, o um ou mais agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico são selecionados a partir do grupo que consiste em anticorpo anti-PD-L1, anticorpo anti-PD-1, anticorpo anti-CTLA-4, ipilimumabe, nivolumabe, pidilizumabe, lambrolizumabe,

pembrolizumabe, atezolizumabe, avelumabe, durvalumabe, MPDL3280A, BMS-936559, MEDI-4736, MSB 00107180, LAG-3, TIM3, B7-H3, B7-H4, TIGIT, AMP-224, MDX-1105, arelumabe, tremelimumabe, IMP321, BMS-986016, lirilumabe, urelumabe, PF-05082566, IPH2101, MEDI-6469, CP-870.893, Mogamulizumabe, Varlilumabe, Galiximabe, AMP-514, AUNP 12, Indoximod, NLG-919, INCB024360, CD80, CD86, ICOS, Inibidores DLBCL, BTLA, PDR001 e qualquer combinação dos mesmos; e/ou um ou mais medicamentos anticâncer são selecionados a partir do grupo que consiste em um inibidor de Mek (U0126, selumitinibe (AZD6244), PD98059, trametinibe, cobimetinibe), um inibidor de EGFR (lapatinibe (LPN), erlotinibe (ERL)), um inibidor HER2 (lapatinibe (LPN), Trastuzumabe), um inibidor de Raf (sorafenibe (SFN)), um inibidor de BRAF (dabrafenibe, vemurafenibe), um anticorpo anti-OX40, um anticorpo agonista GITR, um anticorpo anti-CSFR, a Inibidor de CSFR, paclitaxel, agonista de TLR9 CpG e um inibidor de VEGF (Bevacizumabe) e qualquer combinação dos mesmos. Em algumas modalidades, um ou mais dentre os agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico compreendem o anticorpo anti-PD-L1. Em algumas modalidades, um ou mais dentre os agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico compreendem o anticorpo anti-PD-1. Em algumas modalidades, um ou mais dentre os agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico compreendem o anticorpo anti-CTLA-4. Em algumas modalidades, a combinação do vírus VACVΔE5R com o agente de bloqueio do ponto de verificação imunológico, medicamento anticâncer e/ou fingolimode (FTY720) tem um efeito sinérgico na estimulação de uma resposta imunológica em comparação com a administração do vírus VACVΔE5R ou do agente de bloqueio de ponto de verificação imunológico, medicamento anticâncer ou fingolimode (FTY720) sozinho.

[0056] Em um aspecto, a presente divulgação fornece um ácido nucleico que codifica os vírus VACVΔE5R manipulados da presente tecnologia.

[0057] Em um aspecto, a presente divulgação fornece um kit compreendendo os vírus VACVΔE5R manipulados da presente tecnologia e instruções de uso.

[0058] Em um aspecto, a presente divulgação fornece um vírus mixoma (MYXV) geneticamente modificado para compreender um gene M31R mutante (MYXVΔM31R). Em algumas modalidades o vírus compreende ainda uma molécula de ácido nucleico heteróloga que codifica um ou mais dentre OX40L, hFlt3L, hIL-2, hIL-12, hIL-15, hIL-15/IL-15Rα, hIL-18, hIL-21, anti-huCTLA-4, anti-huPD-1, anti-huPD-L1, GITRL, 4-1BBL, ou CD40L, e/ou uma deleção de qualquer um ou mais dentre ortólogos de mixoma do vírus vaccinia timidina quinase (TK) C7 (ΔC7L), E3L (ΔE3L), E3LΔ83N, B2R (ΔB2R), B19R (B18R; ΔWR200), IL18BP, K7R, C12L, B8R, B14R, N1L, C11R, K1L, M1L, N2L, ou WR199. Em algumas modalidades, o gene M31R mutante compreende a substituição de pelo menos uma porção do gene por um ou mais cassetes de genes compreendendo uma molécula de ácido nucleico heteróloga. Em algumas modalidades, um ou mais cassetes de genes compreendem uma molécula de ácido nucleico heteróloga que codifica OX40L (MYXVΔM31R-OX40L). Em algumas modalidades o um ou mais cassetes de genes compreende ainda uma molécula de ácido nucleico heterólogo que codifica o ligante de tirosina quinase 3 tipo Fms humano (hFlt3L) (MYXVΔM31R-OX40L-hFlt3L). Em algumas modalidades o um ou mais cassetes de genes compreende ainda uma molécula de ácido nucleico heterólogo que codifica o ligante de tirosina quinase 3 tipo Fms humano (hFlt3L) (MYXVΔM31R-hFlt3L). Em algumas modalidades, o ácido nucleico heterólogo é expresso a partir de dentro de um myxoma ortólogo de gene viral vaccinia selecionado a partir do grupo que consiste no gene da timidina quinase (TK), o gene C7, o gene C11, o gene K3, o gene F1, o gene F2, o gene F4, o gene F6, o gene F8, o gene F9, o gene F11, o gene F14.5, o gene J2, o gene A46, o gene E3L, o gene B18R (WR200), o O gene E5R, o gene K7R, o gene C12L, o gene B8R, o gene B14R, o gene N1L, o gene K1L, o

gene C16, o gene M1L, o gene N2L e o gene WR199. Em algumas modalidades, o vírus compreende ainda um ortólogo de myxoma mutante de um gene da timidina quinase (TK) mutante. Em algumas modalidades, o gene TK mutante compreende a substituição de pelo menos uma porção do gene por um ou mais cassetes de genes compreendendo uma molécula de ácido nucleico heteróloga. Em algumas modalidades, o vírus compreende ainda um ortólogo de myxoma mutante de um gene C7 do vírus vaccinia. Em algumas modalidades, o gene C7 mutante compreende uma inserção de um ou mais cassetes de genes compreendendo uma molécula de ácido nucleico heteróloga. Em algumas modalidades, o gene C7 mutante compreende a substituição de pelo menos uma porção do gene por um ou mais cassetes de genes compreendendo uma molécula de ácido nucleico heteróloga.

[0059] Em um aspecto, a presente divulgação fornece uma composição imunogênica compreendendo o vírus MYXVΔM31R. Em algumas modalidades, a composição imunogênica compreende ainda um veículo farmaceuticamente aceitável. Em algumas modalidades, a composição imunogênica compreende ainda um adjuvante farmaceuticamente aceitável.

[0060] Em algumas modalidades, a presente divulgação fornece um método para tratar um tumor sólido em um indivíduo em necessidade, o método compreendendo administrar a um tumor uma composição que compreende uma quantidade eficaz do vírus MYXVΔM31R ou a composição imunogênica. Em algumas modalidades, o tratamento compreende um ou mais dentre os seguintes: induzir uma resposta imunológica no indivíduo contra o tumor ou aumentar ou promover uma resposta imunológica contínua contra o tumor no indivíduo, reduzir o tamanho do tumor, erradicar o tumor, inibir o crescimento do tumor, inibir o crescimento metastático do tumor, induzir apoptose de células de tumor ou prolongar a sobrevivência do indivíduo. Em algumas modalidades, a composição é administrada por injeção intratumoral ou intravenosa ou uma combinação simultânea ou sequencial de injeção

intratumoral e intravenosa. Em algumas modalidades, o tumor é melanoma, cólon, mama, bexiga ou carcinoma da próstata.

[0061] Em algumas modalidades, a composição compreende ainda um ou mais agentes selecionados a partir de: um ou mais agentes de bloqueio de ponto de verificação imunológico; um ou mais medicamentos anticâncer, fingolimode (FTY720); e qualquer combinação dos mesmos. Em algumas modalidades, o método compreende ainda administrar separada, sequencial ou simultaneamente ao indivíduo um ou mais agentes selecionados a partir de: um ou mais agentes de bloqueio de ponto de verificação imunológico; um ou mais medicamentos anticâncer, fingolimode (FTY720); e qualquer combinação dos mesmos. Em algumas modalidades, o um ou mais agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico são selecionados a partir do grupo que consiste em anticorpo anti-PD-L1, anticorpo anti-PD-1, anticorpo anti-CTLA-4, ipilimumabe, nivolumabe, pidilizumabe, lambrolizumabe, pembrolizumabe, atezolizumabe, avelumabe, durvalumabe, MPDL3280A, BMS-936559, MEDI-4736, MSB 00107180, LAG-3, TIM3, B7-H3, B7-H4, TIGIT, AMP-224, MDX-1105, arelumabe, tremelimumabe, IMP321, BMS-986016, lirilumabe, urelumabe, PF-05082566, IPH2101, MEDI-6469, CP-870.893, Mogamulizumabe, Varlilumabe, Galiximabe, AMP-514, AUNP 12, Indoximod, NLG-919, INCB024360, CD80, CD86, ICOS, Inibidores DLBCL, BTLA, PDR001 e qualquer combinação dos mesmos; e/ou um ou mais medicamentos anticâncer são selecionados a partir do grupo que consiste em um inibidor de Mek (U0126, selumitinibe (AZD6244), PD98059, trametinibe, cobimetinibe), um inibidor de EGFR (lapatinibe (LPN), erlotinibe (ERL)), um inibidor HER2 (lapatinibe (LPN), Trastuzumabe), um inibidor de Raf (sorafenibe (SFN)), um inibidor de BRAF (dabrafenibe, vemurafenibe), um anticorpo anti-OX40, um anticorpo agonista GITR, um anticorpo anti-CSFR, a Inibidor de CSFR, paclitaxel, agonista de TLR9 CpG e um inibidor de VEGF (Bevacizumabe) e qualquer combinação dos mesmos. Em algumas modalidades, um ou mais dentre os agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico

compreendem o anticorpo anti-PD-L1. Em algumas modalidades, um ou mais dentre os agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico compreendem o anticorpo anti-PD-1. Em algumas modalidades, um ou mais dentre os agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico compreendem o anticorpo anti-CTLA-4. Em algumas modalidades, a combinação do vírus MYXVΔM31R com o agente de bloqueio do ponto de verificação imunológico, medicamento anticâncer e/ou fingolimode (FTY720) tem um efeito sinérgico no tratamento do tumor em comparação com a administração do vírus MYXVΔM31R ou de o agente de bloqueio de ponto de verificação imunológico, medicamento anticâncer ou fingolimode (FTY720) sozinho.

[0062] Em outro aspecto, a presente divulgação fornece um método de estimulação de uma resposta imunológica compreendendo administrar a um indivíduo uma quantidade eficaz do vírus ou a composição imunogênica. Em algumas modalidades, o método compreende ainda administrar separada, sequencial ou simultaneamente ao indivíduo um ou mais agentes selecionados a partir de: um ou mais agentes de bloqueio de ponto de verificação imunológico; um ou mais medicamentos anticâncer, fingolimode (FTY720); e qualquer combinação dos mesmos. Em algumas modalidades, o um ou mais agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico são selecionados a partir do grupo que consiste em anticorpo anti-PD-L1, anticorpo anti-PD-1, anticorpo anti-CTLA-4, ipilimumabe, nivolumabe, pidilizumabe, lambrolizumabe, pembrolizumabe, atezolizumabe, avelumabe, durvalumabe, MPDL3280A, BMS-936559, MEDI-4736, MSB 00107180, LAG-3, TIM3, B7-H3, B7-H4, TIGIT, AMP-224, MDX-1105, arelumabe, tremelimumabe, IMP321, BMS-986016, lirilumabe, urelumabe, PF-05082566, IPH2101, MEDI-6469, CP-870.893, Mogamulizumabe, Varlilumabe, Galiximabe, AMP-514, AUNP 12, Indoximod, NLG-919, INCB024360, CD80, CD86, ICOS, Inibidores DLBCL, BTLA, PDR001 e qualquer combinação dos mesmos; e/ou um ou mais medicamentos anticâncer são selecionados a partir do grupo que consiste em um inibidor de

Mek (U0126, selumitinibe (AZD6244), PD98059, trametinibe, cobimetinibe), um inibidor de EGFR (lapatinibe (LPN), erlotinibe (ERL)), um inibidor HER2 (lapatinibe (LPN), Trastuzumabe), um inibidor de Raf (sorafenibe (SFN)), um inibidor de BRAF (dabrafenibe, vemurafenibe), um anticorpo anti-OX40, um anticorpo agonista GITR, um anticorpo anti-CSFR, a Inibidor de CSFR, paclitaxel, agonista de TLR9 CpG e um inibidor de VEGF (Bevacizumabe) e qualquer combinação dos mesmos. Em algumas modalidades, um ou mais dentre os agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico compreendem o anticorpo anti-PD-L1. Em algumas modalidades, um ou mais dentre os agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico compreendem o anticorpo anti-PD-1. Em algumas modalidades, um ou mais dentre os agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico compreendem o anticorpo anti-CTLA-4. Em algumas modalidades, a combinação do vírus MYXVΔM31R com o agente de bloqueio do ponto de verificação imunológico, medicamento anticâncer e/ou fingolimode (FTY720) tem um efeito sinérgico na estimulação de uma resposta imunológica em comparação com a administração do vírus MYXVΔM31R ou do agente de bloqueio de ponto de verificação imunológico, medicamento anticâncer ou fingolimode (FTY720) sozinho.

[0063] Em um aspecto, a presente divulgação fornece um ácido nucleico que codifica os vírus MYXVΔM31R manipulados da presente tecnologia.

[0064] Em um aspecto, a presente divulgação fornece um kit compreendendo os vírus MYXVΔM31R manipulados da presente tecnologia e instruções de uso.

[0065] Em um aspecto, a presente divulgação fornece um vírus vaccinia Ankara (MVA) modificado recombinante, caracterizado pelo fato de que compreende um gene C7 mutante e uma molécula de ácido nucleico heteróloga que codifica OX40L (MVAΔC7L-OX40L). Em algumas modalidades, o vírus MVAΔC7L-OX40L recombinante compreende ainda um ácido nucleico

heterólogo que codifica o ligante de tirosina quinase 3 tipo Fms humano (hFlt3L) (MVAΔC7L-hFlt3L-OX40L). Em algumas modalidades, o vírus MVAΔC7L-OX40L recombinante da presente tecnologia compreende ainda um gene da timidina quinase (TK) mutante. Em algumas modalidades, o vírus MVAΔC7L-OX40L recombinante compreende o gene de TK mutante compreende a substituição de pelo menos uma porção do gene por um ou mais cassetes de genes compreendendo uma molécula de ácido nucleico heteróloga. Em algumas modalidades, um ou mais cassetes de genes compreendem a molécula de ácido nucleico heteróloga que codifica OX40L. Em algumas modalidades, o gene C7 mutante compreende uma inserção de um ou mais cassetes de genes compreendendo uma molécula de ácido nucleico heteróloga. Em algumas modalidades, o gene C7 mutante compreende a substituição de pelo menos uma porção do gene por um ou mais cassetes de genes compreendendo uma molécula de ácido nucleico heteróloga. Em algumas modalidades, um ou mais cassetes de genes compreendem uma molécula de ácido nucleico heteróloga que codifica hFlt3L. Em algumas modalidades, o gene C7 mutante compreende a substituição de pelo menos uma porção do gene por um ou mais cassetes de genes compreendendo a molécula de ácido nucleico heteróloga que codifica hFlt3L, e em que o vírus compreende adicionalmente um gene de TK mutante que compreende a substituição de pelo menos uma porção do gene de TK por um ou mais cassetes de genes compreendendo a molécula de ácido nucleico heteróloga que codifica OX40L (MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-OX40L). Em algumas modalidades, o OX40L é expresso a partir de um gene viral de MVA. Em algumas modalidades, o OX40L é expresso a partir de dentro de um gene viral selecionado a partir do grupo que consiste no gene da timidina quinase (TK), o gene C7, o gene C11, o gene K3, o gene F1, o gene F2, o gene F4, o gene F6, o gene F8, o gene F9, o gene F11, o gene F14.5, o gene J2, o gene A46, o gene E3L, o gene B18R (WR200), o gene E5R, o gene K7R, o gene C12L, o gene B8R, o gene B14R, o gene N1L, o gene K1L, o gene C16, o gene M1L, o

gene N2L e o gene WR199. Em algumas modalidades, o OX40L é expresso a partir de dentro do gene TK. Em algumas modalidades, o OX40L é expresso a partir de dentro de um gene TK e o hFlt3L é expresso a partir de dentro de do gene C7. Em algumas modalidades, o vírus compreende ainda uma molécula de ácido nucleico heteróloga que codifica um ou mais dentre hIL-2, hIL-12, hIL-15, hIL-15/IL-15Rα, hIL-18, hIL-21, anti-huCTLA-4, anti-huPD-1, anti-huPD-L1, GITRL, 4-1BBL ou CD40L e/ou uma deleção de qualquer um ou mais dentre E3L (ΔE3L), E3LΔ83N, B2R (ΔB2R), B19R (B18R; ΔWR200), IL18BP, E5R, K7R, C12L, B8R, B14R, N1L, C11R, K1L, M1L, N2L ou WR199. Em algumas modalidades, o vírus MVA recombinante exibe uma ou mais dentre as seguintes características: indução de níveis aumentados de células T efetoras em células de tumor em comparação com células de tumor infectadas com o vírus MVAΔC7L correspondente; indução de aumento da produção esplênica de células T efetoras em comparação com o vírus MVAΔC7L correspondente; e redução do volume do tumor em células de tumor em contato com o vírus MVAΔC7L-OX40L recombinante em comparação com as células de tumor em contato com o vírus MVAΔC7L correspondente. Em algumas modalidades, as células de tumor compreendem células de melanoma.

[0066] Em outro aspecto, a presente divulgação fornece uma composição imunogênica compreendendo o vírus MVAΔC7L-OX40L recombinante da presente tecnologia. Em algumas modalidades, a composição imunogênica compreende ainda um veículo farmaceuticamente aceitável. Em algumas modalidades, a composição imunogênica da presente tecnologia compreende um adjuvante farmaceuticamente aceitável.

[0067] Em outro aspecto, a presente divulgação fornece um método para tratar um tumor sólido em um indivíduo em necessidade, o método compreendendo a administração a um tumor de uma composição compreendendo uma quantidade eficaz do MVAΔC7L recombinante-a presente tecnologia. Em algumas modalidades, o tratamento compreende um ou mais dentre os seguintes: induzir uma resposta imunológica no indivíduo contra o

tumor ou aumentar ou promover uma resposta imunológica contínua contra o tumor no indivíduo, reduzir o tamanho do tumor, erradicar o tumor, inibir o crescimento do tumor, inibir o crescimento metastático do tumor, induzir apoptose de células de tumor ou prolongar a sobrevivência do indivíduo. Em algumas modalidades, o método para tratar um tumor sólido em um indivíduo em necessidade compreende a indução, o aumento ou a promoção da resposta imunológica compreende um ou mais dentre os seguintes: níveis aumentados de células T efetoras em células de tumor em comparação com células de tumor infectadas com o vírus MVAΔC7L correspondente; e aumento da produção esplênica de células T efetoras em comparação com o vírus MVAΔC7L correspondente. Em algumas modalidades, o método de tratamento de um tumor sólido em um indivíduo em necessidade, a composição é administrada por injeção intratumoral ou intravenosa ou uma combinação simultânea ou sequencial de injeção intratumoral e intravenosa. Em algumas modalidades do método de tratamento de um tumor sólido em um indivíduo em necessidade, o tumor é melanoma, cólon, mama, bexiga ou carcinoma da próstata. Em algumas modalidades do método de tratamento de um tumor sólido em um indivíduo em necessidade, a composição compreende um ou mais agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico. Em algumas modalidades do método de tratamento de um tumor sólido em um indivíduo em necessidade, o método compreende ainda a administração ao indivíduo de um ou mais agentes de bloqueio de ponto de verificação imunológico. Em algumas modalidades do método de tratamento de um tumor sólido em um indivíduo em necessidade, o um ou mais agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico são selecionados a partir do grupo que consiste em anticorpo anti-PD-1, anticorpo anti-PD-L1, anticorpo anti-CTLA-4, ipilimumabe, nivolumabe, pidilizumabe, lambrolizumabe, pembrolizumabe, atezolizumabe, avelumabe, durvalumabe, MPDL3280A, BMS-936559, MEDI-4736, MSB 00107180, LAG-3, TIM3, B7-H3, B7-H4, TIGIT, AMP-224, MDX-1105, arelumabe, tremelimumabe, IMP321, MGA271, BMS-986016, lirilumabe, urelumabe, PF-05082566,

IPH2101, MEDI-6469, CP-870.893, mogamulizumabe, varlilumabe, galiximabe, AMP-514, AUNP 12, Indoximode, NLG-919, INCB024360, CD80, DLBCL ICOS, PDR001 e qualquer combinação dos mesmos; e/ou Em algumas modalidades do método de tratamento de um tumor sólido em um indivíduo em necessidade, o um ou mais agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico compreendem anticorpo anti-PD-1. Em algumas modalidades do método de tratamento de um tumor sólido em um indivíduo em necessidade, o um ou mais agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico compreendem anticorpo anti-PD-L1. Em algumas modalidades do método de tratamento de um tumor sólido em um indivíduo em necessidade, o um ou mais agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico compreendem anticorpo anti-CTLA-4. Em algumas modalidades do método de tratamento de um tumor sólido em um indivíduo em necessidade, a combinação de MVAΔC7L-OX40L ou MVAΔC7L-hFlt3L-OX40L e o agente de bloqueio do ponto de verificação imunológico tem um efeito sinérgico no tratamento do tumor em comparação com administração quer de MVAΔC7L-OX40L ou MVAΔC7L-hFlt3L-OX40L ou do agentes de bloqueio de ponto de verificação imunológico sozinho.

[0068] Em outro aspecto, a presente divulgação fornece um método de estimulação de uma resposta imunológica compreendendo administrar a um indivíduo de uma quantidade eficaz do vírus da presente tecnologia (*por exemplo*, MVAΔC7L-OX40L, MVAΔC7L-hFlt3L-OX40L) ou uma composição imunogênica do presente tecnologia. Em algumas modalidades, o método compreende ainda administrar ao indivíduo de um ou mais dentre os agentes de bloqueio de ponto de verificação imunológico. Em algumas modalidades, o um ou mais agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico são selecionados a partir do grupo que consiste em anticorpo anti-PD-1, anticorpo anti-PD-L1, anticorpo anti-CTLA-4, ipilimumabe, nivolumabe, pidilizumabe, lambrolizumabe, pembrolizumabe, atezolizumabe, avelumabe, durvalumabe, MPDL3280A, BMS-936559, MEDI-4736, MSB 00107180, LAG-3, TIM3, B7-H3, B7-H4, TIGIT, AMP-224, MDX-1105, arelumabe, tremelimumabe, IMP321,

MGA271, BMS-986016, lirilumabe, urelumabe, PF-05082566, IPH2101, MEDI-6469, CP-870.893, mogamulizumabe, varlilumabe, galiximabe, AMP-514, AUNP 12, Indoximode, NLG-919, INCB024360, CD80, DLBCL ICOS, PDR001 e qualquer combinação dos mesmos; e/ou Em algumas modalidades, um ou mais dentre os agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico compreendem o anticorpo anti-PD-1. Em algumas modalidades, um ou mais dentre os agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico compreendem o anticorpo anti-PD-L1. Em algumas modalidades, um ou mais dentre os agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico compreendem o anticorpo anti-CTLA-4.

[0069] Em outro aspecto, a presente divulgação fornece um vírus vaccinia Ankara (MVA) modificado recombinante, caracterizado pelo fato de que compreende um gene E3 mutante e uma molécula de ácido nucleico heteróloga que codifica OX40L (MVAΔE3L-OX40L). Em algumas modalidades, o vírus MVAΔE3L-OX40L recombinante compreende ainda um gene da timidina quinase (TK) mutante. Em algumas modalidades, o gene TK mutante compreende a substituição de pelo menos uma porção do gene por um ou mais cassetes de genes compreendendo uma molécula de ácido nucleico heteróloga. Em algumas modalidades, um ou mais cassetes de genes compreendem a molécula de ácido nucleico heteróloga que codifica OX40L. Em algumas modalidades do vírus da presente tecnologia, o OX40L é expresso a partir de dentro de um gene viral MVA. Em algumas modalidades do vírus da presente tecnologia, o OX40L é expresso a partir de dentro de um gene viral selecionado a partir do grupo que consiste no gene da timidina quinase (TK), o gene C7, o gene C11, o gene K3, o gene F1, o gene F2, o gene F4, o gene F6, o gene F8, o gene F9, o gene F11, o gene F14.5, o gene J2, o gene A46, o gene E3L, o gene B18R (WR200), o O gene E5R, o gene K7R, o gene C12L, o gene B8R, o gene B14R, o gene N1L, o gene K1L, o gene C16, o gene M1L, o gene N2L e o gene WR199. Em algumas modalidades do vírus da presente tecnologia, o OX40L é expresso a partir de dentro de um gene TK. Em algumas

modalidades do vírus da presente tecnologia, o vírus compreende ainda uma molécula de ácido nucleico heteróloga que codifica um ou mais dentre hFlt3L, hIL-2, hIL-12, hIL-15, hIL-15/IL-15Rα, hIL-18, hIL-21, anti-huCTLA-4, anti-huPD-1, anti-huPD-L1, GITRL, 4-1BBL ou CD40L e/ou uma deleção de qualquer um ou mais dentre E3LΔ83N, B2R (ΔB2R), B19R (B18R; ΔWR200), E5R, K7R, C12L (IL18BP), B8R, B14R, N1L, C11R, K1L, M1L, N2L ou WR199. Em algumas modalidades do vírus da presente tecnologia o vírus MVA recombinante exibe uma ou mais das seguintes características: indução de níveis aumentados de células T efetoras em células de tumor em comparação com células de tumor infectadas com o vírus MVAΔE3L correspondente; indução de aumento da produção esplênica de células T efetoras em comparação com o vírus MVAΔE3L correspondente; e redução do volume do tumor em células de tumor em contato com o vírus MVAΔE3L-OX40L recombinante em comparação com as células de tumor em contato com o vírus MVAΔE3L correspondente. Em algumas modalidades do vírus da presente tecnologia, as células de tumor compreendem células de melanoma. Em algumas modalidades, o gene E3 mutante é pelo menos parcialmente deletado, não é expresso, é expresso em níveis tão baixos que não tem efeito ou expresso como uma proteína não funcional. Em algumas modalidades, o gene TK mutante é pelo menos parcialmente deletado, não é expresso, é expresso em níveis tão baixos que não tem efeito ou expresso como uma proteína não funcional.

[0070] Em outro aspecto presente divulgação fornece uma composição imunogênica compreendendo o vírus MVAΔE3L-OX40L recombinante da presente tecnologia. Em algumas modalidades, a composição imunogênica da presente tecnologia compreende um veículo farmaceuticamente aceitável. Em algumas modalidades, a composição imunogênica da presente tecnologia compreende um adjuvante farmaceuticamente aceitável.

[0071] Em outro aspecto, a presente divulgação fornece um método para tratar um tumor sólido em um indivíduo em necessidade, o método compreendendo a administração a um tumor de uma composição compreendendo uma quantidade eficaz do vírus MVAΔE3L-OX40L recombinante presente tecnologia ou uma composição imunogênica da presente tecnologia. Em algumas modalidades do método para tratar um tumor sólido em um indivíduo em necessidade do mesmo, o tratamento compreende um ou mais dentre os seguintes: induzir uma resposta imunológica no indivíduo contra o tumor ou aumentar ou promover uma resposta imunológica contínua contra o tumor no indivíduo, reduzir o tamanho do tumor, erradicar o tumor, inibir o crescimento do tumor, inibir o crescimento metastático do tumor, induzir apoptose de células de tumor ou prolongar a sobrevivência do indivíduo. Em algumas modalidades do método de tratamento de um tumor sólido em um indivíduo em necessidade, a indução, o aumento ou a promoção da resposta imunológica compreende um ou mais dentre os seguintes: níveis aumentados de células T efetoras em células de tumor em comparação com células de tumor infectadas com o vírus MVAΔE3L correspondente; e aumento da produção esplênica de células T efetoras em comparação com o vírus MVAΔE3L correspondente. Em algumas modalidades do método para tratamento de um tumor sólido em um indivíduo em necessidade, a composição é administrada por injeção intratumoral ou intravenosa ou uma combinação simultânea ou sequencial de injeção intratumoral e intravenosa. Em algumas modalidades do método para tratamento de um tumor sólido em um indivíduo em necessidade, o tumor é melanoma, cólon, mama, bexiga ou carcinoma da próstata. Em algumas modalidades do método para tratamento de um tumor sólido em um indivíduo em necessidade, a composição compreende ainda um ou mais agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico. Em algumas modalidades do método para tratamento de um tumor sólido em um indivíduo em necessidade, o um ou mais agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico são selecionados a partir do

grupo que consiste em anticorpo anti-PD-1, anticorpo anti-PD-L1, anticorpo anti-CTLA-4, ipilimumabe, nivolumabe, pidilizumabe, lambrolizumabe, pembrolizumabe, atezolizumabe, avelumabe, durvalumabe, MPDL3280A, BMS-936559, MEDI-4736, MSB 00107180, LAG-3, TIM3, B7-H3, B7-H4, TIGIT, AMP-224, MDX-1105, arelumabe, tremelimumabe, IMP321, MGA271, BMS-986016, lirilumabe, urelumabe, PF-05082566, IPH2101, MEDI-6469, CP-870.893, mogamulizumabe, varlilumabe, galiximabe, AMP-514, AUNP 12, Indoximode, NLG-919, INCB024360, CD80, DLBCL ICOS, PDR001 e qualquer combinação dos mesmos; e/ou Em algumas modalidades do método para tratamento de um tumor sólido em um indivíduo em necessidade, o um ou mais agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico compreendem anticorpo anti-PD-1. Em algumas modalidades do método para tratamento de um tumor sólido em um indivíduo em necessidade, o um ou mais agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico compreendem anticorpo anti-PD-L1. Em algumas modalidades do método para tratamento de um tumor sólido em um indivíduo em necessidade, o um ou mais agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico compreendem anticorpo anti-CTLA-4. Em algumas modalidades do método para tratamento de um tumor sólido em um indivíduo em necessidade, a combinação de MVAΔE3L-OX40L e o agente de bloqueio do ponto de verificação imunológico tem um efeito sinérgico no tratamento do tumor em comparação com administração quer de MVAΔE3L-OX40L ou do agentes de bloqueio de ponto de verificação imunológico sozinho.

[0072] Em outro aspecto, a presente divulgação fornece um método de estimulação de uma resposta imunológica compreendendo administrar a um indivíduo de uma quantidade eficaz do vírus da presente tecnologia (*por exemplo*, MVAΔE3L-OX40L) ou uma composição imunogênica do presente tecnologia. Em algumas modalidades, o método compreende ainda administrar um ou mais agentes de bloqueio de ponto de verificação imunológico ao indivíduo. Em algumas modalidades, o um ou mais agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico são selecionados a partir do grupo que

consiste em anticorpo anti-PD-1, anticorpo anti-PD-L1, anticorpo anti-CTLA-4, ipilimumabe, nivolumabe, pidilizumabe, lambrolizumabe, pembrolizumabe, atezolizumabe, avelumabe, durvalumabe, MPDL3280A, BMS-936559, MEDI-4736, MSB 00107180, LAG-3, TIM3, B7-H3, B7-H4, TIGIT, AMP-224, MDX-1105, arelumabe, tremelimumabe, IMP321, MGA271, BMS-986016, lirilumabe, urelumabe, PF-05082566, IPH2101, MEDI-6469, CP-870.893, mogamulizumabe, varlilumabe, galiximabe, AMP-514, AUNP 12, Indoximode, NLG-919, INCB024360, CD80, DLBCL ICOS, PDR001 e qualquer combinação dos mesmos; e/ou Em algumas modalidades, um ou mais dentre os agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico compreendem o anticorpo anti-PD-1. Em algumas modalidades, um ou mais dentre os agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico compreendem o anticorpo anti-PD-L1. Em algumas modalidades, um ou mais dentre os agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico compreendem o anticorpo anti-CTLA-4. Em algumas modalidades, a combinação de MVAΔE3L-OX40L e o agente de bloqueio do ponto de verificação imunológico tem um efeito sinérgico no tratamento do tumor em comparação com administração quer de MVAΔE3L-OX40L ou do agentes de bloqueio de ponto de verificação imunológico sozinho.

[0073] Em outro aspecto, a presente divulgação fornece um vírus vaccinia (VACV) recombinante, compreendeendo um gene C7 mutante e uma molécula de ácido nucleico heteróloga que codifica OX40L (VACVΔC7L-OX40L). Em algumas modalidades, o vírus compreende ainda um ácido nucleico heterólogo que codifica o ligante de tirosina quinase 3 tipo Fms humano (hFlt3L) (VACVΔC7L-hFlt3L-OX40L). Em algumas modalidades, o vírus compreende ainda um gene da timidina quinase (TK) mutante. Em algumas modalidades, o gene TK mutante compreende a substituição de pelo menos uma porção do gene por um ou mais cassetes de genes compreendendo uma molécula de ácido nucleico heteróloga. Em algumas modalidades, um ou mais cassetes de genes compreendem a molécula de ácido nucleico heteróloga que codifica OX40L. Em algumas modalidades, o

gene C7 mutante compreende uma inserção de um ou mais cassetes de genes compreendendo uma molécula de ácido nucleico heteróloga. Em algumas modalidades, o gene C7 mutante compreende a substituição de pelo menos uma porção do gene por um ou mais cassetes de genes compreendendo uma molécula de ácido nucleico heteróloga. Em algumas modalidades, um ou mais cassetes de genes compreendem uma molécula de ácido nucleico heteróloga que codifica hFlt3L. Em algumas modalidades, o gene C7 mutante compreende a substituição de pelo menos uma porção do gene por um ou mais cassetes de genes compreendendo a molécula de ácido nucleico heteróloga que codifica hFlt3L, e em que o vírus compreende adicionalmente um gene de TK mutante que compreende a substituição de pelo menos uma porção do gene de TK por um ou mais cassetes de genes compreendendo a molécula de ácido nucleico heteróloga que codifica OX40L (VACVΔC7L-hFlt3L-TK(-)-OX40L). Em algumas modalidades, o OX40L é expresso a partir de um gene viral de vaccinia. Em algumas modalidades, o OX40L é expresso a partir de dentro de um gene viral selecionado a partir do grupo que consiste no gene da timidina quinase (TK), o gene C7, o gene C11, o gene K3, o gene F1, o gene F2, o gene F4, o gene F6, o gene F8, o gene F9, o gene F11, o gene F14.5, o gene J2, o gene A46, o gene E3L, o gene B18R (WR200), o O gene E5R, o gene K7R, o gene C12L, o gene B8R, o gene B14R, o gene N1L, o gene K1L, o gene C16, o gene M1L, o gene N2L e o gene WR199. Em algumas modalidades, o OX40L é expresso a partir de dentro do gene TK. Em algumas modalidades, o OX40L é expresso a partir de dentro de um gene TK e o hFlt3L é expresso a partir de dentro de do gene C7. Em algumas modalidades, o vírus compreende ainda uma molécula de ácido nucleico heteróloga que codifica um ou mais dentre hIL-2, hIL-12, hIL-15, hIL-15/IL-15Rα, hIL-18, hIL-21, anti-huCTLA-4, anti-huPD-1, anti-huPD-L1, GITRL, 4-1BBL ou CD40L e/ou uma deleção de qualquer um ou mais dentre E3L (ΔE3L), E3LΔ83N, B2R (ΔB2R), B19R (B18R; ΔWR200), E5R, K7R, C12L, IL18BP, B8R, B14R, N1L, C11R, K1L, M1L, N2L ou WR199. Em algumas modalidades, o vírus compreende ainda um ácido nucleico heterólogo que

codifica hIL-12 e um ácido nucleico heterólogo que codifica anti-huCTLA-4 (VACVΔC7L-anti-huCTLA-4-hFlt3L-OX40L-hIL-12). Em algumas modalidades, o vírus VACVΔC7L-OX40L recombinante exibe uma ou mais dentre as seguintes características: indução de níveis aumentados de células T efetoras em células de tumor em comparação com células de tumor infectadas com o vírus VACVΔC7L correspondente; indução de aumento da produção esplênica de células T efetoras em comparação com o vírus VACVΔC7L correspondente; e redução do volume do tumor em células de tumor em contato com o vírus VACVΔC7L-OX40L recombinante em comparação com as células de tumor em contato com o vírus VACVΔC7L correspondente. Em algumas modalidades, as células de tumor compreendem células de melanoma.

[0074] Em outro aspecto, a presente divulgação fornece uma composição imunogênica compreendendo o vírus VACVΔC7L-OX40L recombinante da presente tecnologia. Em algumas modalidades, a composição imunogênica compreende um veículo farmaceuticamente aceitável. Em algumas modalidades, a composição imunogênica compreende um adjuvante farmaceuticamente aceitável.

[0075] Em outro aspecto, a presente divulgação fornece um método para tratar um tumor sólido em um indivíduo em necessidade, o método compreendendo a administração a um tumor de uma composição compreendendo uma quantidade eficaz do vírus VACVΔC7L-OX40L recombinante presente tecnologia ou uma composição imunogênica da presente tecnologia. Em algumas modalidades do método para tratar um tumor sólido em um indivíduo em necessidade, o tratamento compreende um ou mais dentre os seguintes: induzir uma resposta imunológica no indivíduo contra o tumor ou aumentar ou promover uma resposta imunológica contínua contra o tumor no indivíduo, reduzir o tamanho do tumor, erradicar o tumor, inibir o crescimento do tumor, inibir o crescimento metastático do tumor, induzir apoptose de células de tumor ou prolongar a sobrevivência do indivíduo. Em algumas modalidades do método de tratamento de um tumor sólido em um

indivíduo em necessidade, a indução, o aumento ou a promoção da resposta imunológica compreende um ou mais dentre os seguintes: níveis aumentados de células T efetoras em células de tumor em comparação com células de tumor infectadas com o vírus VACVΔC7Lvirus correspondente; e aumento da produção esplênica de células T efetoras em comparação com o vírus VACVΔC7L correspondente. Em algumas modalidades do método para tratamento de um tumor sólido em um indivíduo em necessidade, a composição é administrada por injeção intratumoral ou intravenosa ou uma combinação simultânea ou sequencial de injeção intratumoral e intravenosa. Em algumas modalidades do método para tratamento de um tumor sólido em um indivíduo em necessidade, o tumor é melanoma, cólon, mama, bexiga ou carcinoma da próstata. Em algumas modalidades do método para tratamento de um tumor sólido em um indivíduo em necessidade, a composição compreende ainda um ou mais agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico. Em algumas modalidades, o método compreende ainda administrar ao indivíduo de um ou mais dentre os agentes de bloqueio de ponto de verificação imunológico. Em algumas modalidades, o um ou mais agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico são selecionados a partir do grupo que consiste em anticorpo anti-PD-1, anticorpo anti-PD-L1, anticorpo anti-CTLA-4, ipilimumabe, nivolumabe, pidilizumabe, lambrolizumabe, pembrolizumabe, atezolizumabe, avelumabe, durvalumabe, MPDL3280A, BMS-936559, MEDI-4736, MSB 00107180, LAG-3, TIM3, B7-H3, B7-H4, TIGIT, AMP-224, MDX-1105, arelumabe, tremelimumabe, IMP321, MGA271, BMS-986016, lirilumabe, urelumabe, PF-05082566, IPH2101, MEDI-6469, CP-870.893, mogamulizumabe, varlilumabe, galiximabe, AMP-514, AUNP 12, Indoximode, NLG-919, INCB024360, CD80, DLBCL ICOS, PDR001 e qualquer combinação dos mesmos; e/ou Em algumas modalidades do método para tratamento de um tumor sólido em um indivíduo em necessidade, o um ou mais agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico compreendem o um ou mais agentes de bloqueio de ponto de verificação imunológico compreende

anticorpo anti-PD-1. Em algumas modalidades do método para tratamento de um tumor sólido em um indivíduo em necessidade, o um ou mais agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico compreendem o um ou mais agentes de bloqueio de ponto de verificação imunológico compreende anticorpo anti-PD-L1. Em algumas modalidades do método para tratamento de um tumor sólido em um indivíduo em necessidade, compreende o um ou mais agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico compreendem anticorpo anti-CTLA-4. Em algumas modalidades do método para tratamento de um tumor sólido em um indivíduo em necessidade, a combinação de VACVΔC7L-OX40L ou VACVΔC7L-hFlt3L-OX40L e o agente de bloqueio do ponto de verificação imunológico tem um efeito sinérgico no tratamento do tumor em comparação com administração quer de VACVΔC7L-OX40L ou VACVΔC7L-hFlt3L-OX40L ou do agentes de bloqueio de ponto de verificação imunológico sozinho.

[0076] Em outro aspecto, a presente divulgação fornece um método para estimulação de uma resposta imunológica compreendendo administrar a um indivíduo de uma quantidade eficaz do vírus da presente tecnologia (*por exemplo*, VACVΔC7L-OX40L, VACVΔC7L-hFlt3L-OX40L) ou uma composição imunogênica do presente tecnologia. Em algumas modalidades, o método compreende ainda administrar um ou mais agentes de bloqueio de ponto de verificação imunológico. Em algumas modalidades, o um ou mais agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico são selecionados a partir do grupo que consiste em anticorpo anti-PD-1, anticorpo anti-PD-L1, anticorpo anti-CTLA-4, ipilimumabe, nivolumabe, pidilizumabe, lambrolizumabe, pembrolizumabe, atezolizumabe, avelumabe, durvalumabe, MPDL3280A, BMS-936559, MEDI-4736, MSB 00107180, LAG-3, TIM3, B7-H3, B7-H4, TIGIT, AMP-224, MDX-1105, arelumabe, tremelimumabe, IMP321, MGA271, BMS-986016, lirilumabe, urelumabe, PF-05082566, IPH2101, MEDI-6469, CP-870.893, mogamulizumabe, varlilumabe, galiximabe, AMP-514, AUNP 12, Indoximode, NLG-919, INCB024360, CD80, DLBCL ICOS, PDR001 e qualquer

combinação dos mesmos. Em algumas modalidades, o agente de bloqueio do ponto de verificação imunológico compreende anticorpo anti-PD-1. Em algumas modalidades, o agente de bloqueio do ponto de verificação imunológico compreende anticorpo anti-PD-L1. Em algumas modalidades, o agente de bloqueio do ponto de verificação imunológico compreende anticorpo anti-CTLA-4.

[0077] Em outro aspecto, a presente divulgação fornece uma sequência de ácido nucleico do vírus vaccinia Ankara (MVA) modificado recombinante, em que a sequência de ácido nucleico entre as posições 75.560 e 76.093 de SEQ ID NO: 1 é substituída por uma sequência de ácido nucleico heteróloga que compreende uma estrutura de leitura aberta que codifica OX40L e em que o MVA compreende ainda um mutante C7. Em algumas modalidades do vírus MVA da presente tecnologia, a sequência de ácido nucleico entre as posições 18.407 e 18.859 da SEQ ID NO: 1 é substituída por uma sequência de ácido nucleico heteróloga compreendendo uma estrutura de leitura aberta que codifica o ligante de tirosina quinase 3 tipo Fms humano (hFlt3L).

[0078] Em outro aspecto, a presente divulgação fornece uma sequência de ácido nucleico do vírus vaccinia Ankara (MVA) modificado recombinante, em que a sequência de ácido nucleico entre as posições 75.798 a 75.868 de SEQ ID NO: 1 é substituída por uma sequência de ácido nucleico heteróloga compreendendo uma estrutura de leitura aberta que codifica OX40L ou codifica ligante de tirosina quinase 3 tipo Fms humano (hFlt3L), e em que o MVA compreende ainda um mutante E3.

[0079] Em outro aspecto, a presente divulgação fornece uma sequência de ácido nucleico do vírus vaccinia (VACV) recombinante, em que a sequência de ácido nucleico entre as posições 80.962 e 81.032 da SEQ ID NO: 2 é substituída por uma sequência de ácido nucleico heteróloga que compreende uma estrutura de leitura aberta que codifica OX40L ou, e em que o VACV compreende ainda um mutante C7. Em algumas modalidades, a

sequência de ácido nucleico de VACV recombinante da presente tecnologia, entre as posições 15.716 e 16.168 da SEQ ID NO: 2 é substituída por uma sequência de ácido nucleico heteróloga compreendendo uma estrutura de leitura aberta que codifica o ligante de tirosina quinase 3 tipo Fms humano (hFlt3L).

[0080] Em outro aspecto, a presente divulgação fornece uma sequência de ácido nucleico que codifica o vírus MVAΔC7L-OX40L recombinante da presente tecnologia.

[0081] Em outro aspecto, a presente divulgação fornece uma sequência de ácido nucleico que codifica o vírus MVAΔE3L-OX40L recombinante da presente tecnologia.

[0082] Em outro aspecto, a presente divulgação fornece uma sequência de ácido nucleico que codifica o vírus VACVΔC7L-OX40L recombinante da presente tecnologia.

[0083] Em outro aspecto, a presente divulgação fornece um kit compreendendo o vírus MVAΔC7L-OX40L recombinante da presente tecnologia ou a composição imunogênica da presente tecnologia e instruções de uso.

[0084] Em outro aspecto, a presente divulgação fornece um kit compreendendo o vírus MVAΔE3L-OX40L recombinante de qualquer um da presente tecnologia ou a composição imunogênica da presente tecnologia e instruções de uso.

[0085] Em outro aspecto, a presente divulgação fornece um kit compreendendo o vírus VACVΔC7L-OX40L recombinante da presente tecnologia ou a composição imunogênica da presente tecnologia e instruções de uso.

[0086] Em algumas modalidades, a presente divulgação fornece um vírus MVAΔC7L-OX40L recombinante em que o gene C7 mutante é pelo menos parcialmente deletado, não é expresso, é expresso em níveis tão baixos que não tem efeito, ou expresso como uma proteína não funcional. Em

algumas modalidades, a presente divulgação fornece um vírus MVAΔC7L-OX40L recombinante em que o gene TK mutante é pelo menos parcialmente deletado, não é expresso, é expresso em níveis tão baixos que não tem efeito, ou expresso como uma proteína não funcional. Em algumas modalidades, a presente divulgação fornece um vírus MVAΔE3L-OX40L recombinante em que o gene E3 mutante é pelo menos parcialmente deletado, não é expresso, é expresso em níveis tão baixos que não tem efeito, ou expresso como uma proteína não funcional. Em algumas modalidades, a presente divulgação fornece um vírus MVAΔE3L-OX40L recombinante em que o gene TK mutante é pelo menos parcialmente deletado, não é expresso, é expresso em níveis tão baixos que não tem efeito, ou expresso como uma proteína não funcional. Em algumas modalidades, a presente tecnologia fornece um vírus VACVΔC7L-OX40L recombinante em que o gene C7 mutante é pelo menos parcialmente deletado, não é expresso, é expresso em níveis tão baixos que não tem efeito, ou expresso como uma proteína não funcional. Em algumas modalidades, a presente divulgação fornece um vírus VACVΔC7L-OX40L recombinante em que o gene TK mutante é pelo menos parcialmente deletado, não é expresso, é expresso em níveis tão baixos que não tem efeito, ou expresso como uma proteína não funcional.

[0087] Em outro aspecto, a presente divulgação fornecec um método para tratar um tumor sólido em um indivíduo em necessidade, o método caracterizado pelo fato de que compreende administrar ao indivíduo de um antígeno e uma quantidade terapeuticamente eficaz de um adjuvante compreendendo um vírus vaccinia Ankara (MVA) modificado recombinante compreendendo um gene C7 mutante e um ácido nucleico heterólogo que codifica OX40L (MVAΔC7L-OX40L). Em algumas modalidades, o vírus MVAΔC7L-OX40L compreende ainda um ácido nucleico heterólogo que codifica o ligante de tirosina quinase 3 tipo Fms humano (hFlt3L) (MVAΔC7L-hFlt3L-OX40L). Em algumas modalidades, o vírus compreende ainda um gene da timidina quinase (TK) mutante. Em algumas modalidades, o gene TK

mutante compreende a substituição de pelo menos uma porção do gene por um ou mais cassetes de genes compreendendo uma molécula de ácido nucleico heteróloga. Em algumas modalidades, um ou mais cassetes de genes compreendem a molécula de ácido nucleico heteróloga que codifica OX40L. Em algumas modalidades, o gene C7 mutante compreende uma inserção de um ou mais cassetes de genes compreendendo uma molécula de ácido nucleico heteróloga. Em algumas modalidades, o gene C7 mutante compreende a substituição de pelo menos uma porção do gene por um ou mais cassetes de genes compreendendo um ácido nucleico heterólogo. Em algumas modalidades, um ou mais cassetes de genes compreendem uma molécula de ácido nucleico heteróloga que codifica hFlt3L. Em algumas modalidades, o gene C7 mutante compreende a substituição de pelo menos uma porção do gene por um ou mais cassetes de genes compreendendo a molécula de ácido nucleico heteróloga que codifica hFlt3L, e em que o vírus compreende adicionalmente um gene de TK mutante que compreende a substituição de pelo menos uma porção do gene de TK por um ou mais cassetes de genes compreendendo a molécula de ácido nucleico heteróloga que codifica OX40L (MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-OX40L). Em algumas modalidades, o OX40L é expresso a partir de um gene viral de MVA. Em algumas modalidades, o OX40L é expresso a partir de dentro de um gene viral selecionado a partir do grupo que consiste no gene da timidina quinase (TK), o gene C7, o gene C11, o gene K3, o gene F1, o gene F2, o gene F4, o gene F6, o gene F8, o gene F9, o gene F11, o gene F14.5, o gene J2, o gene A46, o gene E3L, o gene B18R (WR200), o O gene E5R, o gene K7R, o gene C12L, o gene B8R, o gene B14R, o gene N1L, o gene K1L, o gene C16, o gene M1L, o gene N2L e o gene WR199. Em algumas modalidades, o OX40L é expresso a partir de dentro do gene TK. Em algumas modalidades, o OX40L é expresso a partir de dentro de um gene TK e o hFlt3L é expresso a partir de dentro de do gene C7. Em algumas modalidades, o vírus compreende ainda uma molécula de ácido nucleico heteróloga que codifica um ou mais dentre hIL-2, hIL-12, hIL-15, hIL-

15/IL-15Rα, hIL-18, hIL-21, anti-huCTLA-4, anti-huPD-1, anti-huPD-L1, GITRL, 4-1BBL ou CD40L e/ou uma deleção de qualquer um ou mais dentre E3L (ΔE3L), E3LΔ83N, B2R (ΔB2R), B19R (B18R; ΔWR200), IL18BP, E5R, K7R, C12L, B8R, B14R, N1L, C11R, K1L, M1L, N2L ou WR199.

[0088] Em algumas modalidades o antígeno é selecionado a partir do grupo que consiste em antígenos de diferenciação de tumor, antígenos de testículo de câncer, neoantígenos, antígenos virais no caso de tumores associados à infecção por vírus oncogênicos, GPA33, HER2/neu, GD2, MAGE-1, MAGE-3, BAGE, GAGE-1, GAGE-2, MUM-1, CDK4, N-acetilglucosaminiltransferase, p15, gp75, beta-catenina, ErbB2, antígeno de câncer 125 (CA-125), antígeno carcinoembrionário (CEA), RAGE, MART (antígeno de melanoma), MUC-1, MUC-2, MUC-3, MUC-4, MUC-5ac, MUC-16, MUC-17, tirosinase, proteínas relacionadas à tirosinase 1 e 2, Pmel 17 (gp100), sequência de íntron V GnT-V (sequência de íntron V de N-acetilglucoaminiltransferase V), câncer de próstata psm, PRAME (antígeno de melanoma), β-catenina, EBNA (antígeno nuclear do vírus Epstein-Barr) 1-6, p53, kras, proteína de resistência pulmonar (LRP) Bcl-2, antígeno específico da próstata (PSA), Ki-67, CEACAM6, antígeno específico do cólon-p (CSAp), NY-ESO-1, vírus do papiloma humano E6 e E7, e qualquer combinação dos mesmos.

[0089] Em algumas modalidades a etapa de administrar compreende administrar o antígeno e adjuvante em uma ou mais doses e/ou em que o antígeno e o adjuvante são administrados separadamente, sequencialmente ou simultaneamente.

[0090] Em algumas modalidades o método compreende ainda administrar ao indivíduo um agente de bloqueio de ponto de verificação imunológico selecionados a partir do grupo que consiste em anticorpo anti-PD-1, anticorpo anti-PD-L1, anticorpo anti-CTLA-4, ipilimumabe, nivolumabe, pidilizumabe, lambrolizumabe, pembrolizumabe, atezolizumabe, avelumabe, durvalumabe, MPDL3280A, BMS-936559, MEDI-4736, MSB 00107180, LAG-3,

TIM3, B7-H3, B7-H4, TIGIT, AMP-224, MDX-1105, arelumabe, tremelimumabe, IMP321, MGA271, BMS-986016, lirilumabe, urelumabe, PF-05082566, IPH2101, MEDI-6469, CP-870.893, mogamulizumabe, varlilumabe, galiximabe, AMP-514, AUNP 12, Indoximode, NLG-919, INCB024360, CD80, DLBCL ICOS, PDR001 e qualquer combinação dos mesmos; e/ou

[0091] Em algumas modalidades o antígeno e o adjuvante são administrados ao indivíduo separadamente, sequencialmente ou simultaneamente com a administração do agente de bloqueio do ponto de verificação imunológico.

[0092] Em algumas modalidades o tratamento compreende um ou mais dentre os seguintes: induzir uma resposta imunológica no indivíduo contra o tumor ou aumentar ou promover uma resposta imunológica contínua contra o tumor no indivíduo, reduzir o tamanho do tumor, erradicar o tumor, inibir o crescimento do tumor, inibir o crescimento metastático do tumor, induzir apoptose de células de tumor ou prolongar a sobrevivência do indivíduo. Em algumas modalidades, a indução, aumento ou a promoção da resposta imunológica compreende um ou mais dentre os seguintes: (i) níveis aumentados de expressão de interferon gama (IFN-γ) em células T no baço, drenagem de nódulos linfáticos e/ou soro em comparação com uma amostra de controle não tratada; (ii) níveis aumentados de células T específicas do antígeno no baço, drenagem dos nódulos linfáticos e/ou soro em comparação com uma amostra de controle não tratada; e (iii) níveis aumentados de imunoglobulina específica do antígeno no soro em comparação com uma amostra de controle não tratada. Em algumas modalidades, a imunoglobulina específica do antígeno é IgG1 ou IgG2.

[0093] Em algumas modalidades, o antígeno e o adjuvante são formulados para serem administrados por via intratumoral, intramuscular, intradérmica ou subcutânea.

[0094] Em algumas modalidades o tumor é selecionado a partir do grupo que consiste em melanoma, câncer colorretal, câncer de mama, câncer

de bexiga, câncer de próstata, câncer de pulmão, câncer de pâncreas, câncer de ovário, carcinoma de células escamosas da pele, carcinoma de células de Merkel, câncer gástrico, câncer de fígado e sarcoma.

[0095] Em algumas modalidades o vírus MVAΔC7L-OX40L é administrado em uma dosagem por administração de cerca de 10^5 a cerca de 10^{10} unidades formadoras de placas (pfu).

[0096] Em algumas modalidades do método, o indivíduo é humano.

[0097] Em um aspecto, a presente divulgação fornece uma composição imunogênica compreendendo o antígeno e o adjuvante da presente tecnologia. Em algumas modalidades, a composição imunogênica compreende ainda um veículo farmaceuticamente aceitável. Em algumas modalidades o antígeno é selecionado a partir do grupo que consiste em antígenos de diferenciação de tumor, antígenos de testículo de câncer, neoantígenos, antígenos virais no caso de tumores associados à infecção por vírus oncogênicos, GPA33, HER2/neu, GD2, MAGE-1, MAGE-3, BAGE, GAGE-1, GAGE-2, MUM-1, CDK4, N-acetilglucosaminiltransferase, p15, gp75, beta-catenina, ErbB2, antígeno de câncer 125 (CA-125), antígeno carcinoembrionário (CEA), RAGE, MART (antígeno de melanoma), MUC-1, MUC-2, MUC-3, MUC-4, MUC-5ac, MUC-16, MUC-17, tirosinase, proteínas relacionadas à tirosinase 1 e 2, Pmel 17 (gp100), sequência de íntron V GnT-V (sequência de íntron V de N-acetilglucoaminiltransferase V), câncer de próstata psm, PRAME (antígeno de melanoma), β-catenina, EBNA (antígeno nuclear do vírus Epstein-Barr) 1-6, p53, kras, proteína de resistência pulmonar (LRP) Bcl-2, antígeno específico da próstata (PSA), Ki-67, CEACAM6, antígeno específico do cólon-p (CSAp), NY-ESO-1, vírus do papiloma humano E6 e E7, e qualquer combinação dos mesmos. Em algumas modalidades, a composição imunogênica compreende ainda um agentes de bloqueio de ponto de verificação imunológico selecionado a partir do grupo consistindo em anticorpo anti-PD-1, anticorpo anti-PD-L1, anticorpo anti-CTLA-4, ipilimumabe, nivolumabe, pidilizumabe, lambrolizumabe, pembrolizumabe, atezolizumabe,

avelumabe, durvalumabe, MPDL3280A, BMS-936559, MEDI-4736, MSB 00107180, LAG-3, TIM3, B7-H3, B7-H4, TIGIT, AMP-224, MDX-1105, arelumabe, tremelimumabe, IMP321, MGA271, BMS-986016, lirilumabe, urelumabe, PF-05082566, IPH2101, MEDI-6469, CP-870.893, mogamulizumabe, varlilumabe, galiximabe, AMP-514, AUNP 12, Indoximode, NLG-919, INCB024360, CD80, DLBCL ICOS, PDR001 e qualquer combinação dos mesmos; e/ou

[0098] Em um aspecto a presente divulgação fornece um kit compreendendo instruções de uso, um recipiente e uma porção separada de cada um de: (a) um antígeno; e (b) um adjuvante da presente tecnologia. Em algumas modalidades do kit o antígeno é selecionado a partir do grupo que consiste em antígenos de diferenciação de tumor, antígenos de testículo de câncer, neoantígenos, antígenos virais no caso de tumores associados à infecção por vírus oncogênicos, GPA33, HER2/neu, GD2, MAGE-1, MAGE-3, BAGE, GAGE-1, GAGE-2, MUM-1, CDK4, N-acetilglucosaminiltransferase, p15, gp75, beta-catenina, ErbB2, antígeno de câncer 125 (CA-125), antígeno carcinoembrionário (CEA), RAGE, MART (antígeno de melanoma), MUC-1, MUC-2, MUC-3, MUC-4, MUC-5ac, MUC-16, MUC-17, tirosinase, proteínas relacionadas à tirosinase 1 e 2, Pmel 17 (gp100), sequência de íntron V GnT-V (sequência de íntron V de N-acetilglucoaminiltransferase V), câncer de próstata psm, PRAME (antígeno de melanoma), β-catenina, EBNA (antígeno nuclear do vírus Epstein-Barr) 1-6, p53, kras, proteína de resistência pulmonar (LRP) Bcl-2, antígeno específico da próstata (PSA), Ki-67, CEACAM6, antígeno específico do cólon-p (CSAp), NY-ESO-1, vírus do papiloma humano E6 e E7, e qualquer combinação dos mesmos.

[0099] Em algumas modalidades o kit compreende ainda (c) um agente de bloqueio de ponto de verificação imunológico selecionados a partir do grupo que consiste em anticorpo anti-PD-1, anticorpo anti-PD-L1, anticorpo anti-CTLA-4, ipilimumabe, nivolumabe, pidilizumabe, lambrolizumabe, pembrolizumabe, atezolizumabe, avelumabe, durvalumabe, MPDL3280A,

BMS-936559, MEDI-4736, MSB 00107180, LAG-3, TIM3, B7-H3, B7-H4, TIGIT, AMP-224, MDX-1105, arelumabe, tremelimumabe, IMP321, MGA271, BMS-986016, lirilumabe, urelumabe, PF-05082566, IPH2101, MEDI-6469, CP-870.893, mogamulizumabe, varlilumabe, galiximabe, AMP-514, AUNP 12, Indoximode, NLG-919, INCB024360, CD80, DLBCL ICOS, PDR001 e qualquer combinação dos mesmos.

[0100] Em algumas modalidades dos métodos da presente tecnologia, o antígeno é um neoantígeno selecionado a partir do grupo que consiste em M27 (REGVELCPGNKYEMRRHGTTHSLVIHD) (SEQ ID NO: 17), M30 (PSKPSFQEFVDWENVSPELNSTDQPFL) (SEQ ID NO: 18), M48 (SHCHWNDLAVIPAGVVHNWDFEPRKVS) (SEQ ID NO: 19), e as combinações dos mesmos.

[0101] Em algumas modalidades das composições imunogênicas da presente tecnologia, o antígeno é um neoantígeno selecionado a partir do grupo que consiste em M27 (REGVELCPGNKYEMRRHGTTHSLVIHD) (SEQ ID NO: 17), M30 (PSKPSFQEFVDWENVSPELNSTDQPFL) (SEQ ID NO: 18), M48 (SHCHWNDLAVIPAGVVHNWDFEPRKVS) (SEQ ID NO: 19), e as combinações dos mesmos.

[0102] Em algumas modalidades do kit da presente tecnologia, o antígeno é um neoantígeno selecionado a partir do grupo que consiste em M27 (REGVELCPGNKYEMRRHGTTHSLVIHD) (SEQ ID NO: 17), M30 (PSKPSFQEFVDWENVSPELNSTDQPFL) (SEQ ID NO: 18), M48 (SHCHWNDLAVIPAGVVHNWDFEPRKVS) (SEQ ID NO: 19), e as combinações dos mesmos.

[0103] Em um aspecto, a presente divulgação fornece um vírus vaccinia Ankara (MVA) modificado geneticamente, modificado para compreender um gene E5R mutante (MVAΔE5R). Em algumas modalidades o vírus compreende ainda uma molécula de ácido nucleico heteróloga que codifica um ou mais dentre OX40L, hFlt3L, hIL-2, hIL-12, hIL-15, hIL-15/IL-15Rα, hIL-18, hIL-21, anti-huCTLA-4, anti-huPD-1, anti-huPD-L1, GITRL, 4-

1BBL, ou CD40L, e/ou uma deleção de acordo com qualquer um ou mais dentre timidina quinase (TK) C7 (ΔC7L), E3L (ΔE3L), E3LΔ83N, B2R (ΔB2R), B19R (B18R; ΔWR200), IL18BP, K7R, C12L, B8R, B14R, N1L, C11R, K1L, M1L, N2L, ou WR199. Em algumas modalidades, o gene E5R mutante compreende a substituição de pelo menos uma porção do gene por um ou mais cassetes de genes compreendendo uma molécula de ácido nucleico heteróloga. Em algumas modalidades, um ou mais cassetes de genes compreendem uma molécula de ácido nucleico heteróloga que codifica OX40L (MVAΔE5R-OX40L). Em algumas modalidades o um ou mais cassetes de genes compreende ainda uma molécula de ácido nucleico heterólogo que codifica o ligante de tirosina quinase 3 tipo Fms humano (hFlt3L) (MVAΔE5R-OX40L-hFlt3L). Em algumas modalidades o um ou mais cassetes de genes compreende ainda uma molécula de ácido nucleico heterólogo que codifica o ligante de tirosina quinase 3 tipo Fms humano (hFlt3L) (MVAΔE5R-hFlt3L). Em algumas modalidades, o ácido nucleico heterólogo é expresso a partir de dentro de um gene viral selecionado a partir do grupo que consiste no gene da timidina quinase (TK), o gene C7, o gene C11, o gene K3, o gene F1, o gene F2, o gene F4, o gene F6, o gene F8, o gene F9, o gene F11, o gene F14.5, o gene J2, o gene A46, o gene E3L, o gene B18R (WR200), o O gene E5R, o gene K7R, o gene C12L, o gene B8R, o gene B14R, o gene N1L, o gene K1L, o gene C16, o gene M1L, o gene N2L e o gene WR199. Em algumas modalidades, o vírus compreende ainda um gene da timidina quinase (TK) mutante. Em algumas modalidades, o gene TK mutante compreende a substituição de pelo menos uma porção do gene por um ou mais cassetes de genes compreendendo uma molécula de ácido nucleico heteróloga. Em algumas modalidades, o vírus compreende ainda um gene C7 mutante. Em algumas modalidades, o gene C7 mutante compreende uma inserção de um ou mais cassetes de genes compreendendo uma molécula de ácido nucleico heteróloga. Em algumas modalidades, o gene C7 mutante compreende a substituição de pelo menos uma porção do gene por um ou mais cassetes de

genes compreendendo uma molécula de ácido nucleico heteróloga. Em algumas modalidades, o vírus MVAΔE5R-OX40L-hFlt3L compreende ainda um gene C11R mutante (MVAΔE5R-OX40L-hFlt3L-ΔC11R). Em algumas modalidades, o gene C11R mutante compreende uma inserção de um ou mais cassetes de genes compreendendo uma molécula de ácido nucleico heteróloga. Em algumas modalidades, o gene C11R mutante compreende a substituição de pelo menos uma porção do gene por um ou mais cassetes de genes compreendendo uma molécula de ácido nucleico heteróloga. Em algumas modalidades, o vírus MVAΔE5R-OX40L-hFlt3L compreende ainda um gene WR199 mutante (MVAΔE5R-OX40L-hFlt3L-ΔWR199). Em algumas modalidades, o gene WR199 mutante compreende uma inserção de um ou mais cassetes de genes compreendendo uma molécula de ácido nucleico heteróloga. Em algumas modalidades, o gene WR199 mutante compreende a substituição de pelo menos uma porção do gene por um ou mais cassetes de genes compreendendo uma molécula de ácido nucleico heteróloga. Em algumas modalidades, o vírus MVAΔE5R compreende ainda um gene E3L mutante (ΔE3L). Em algumas modalidades, o gene E3L mutante compreende uma inserção de um ou mais cassetes de genes compreendendo uma molécula de ácido nucleico heteróloga. Em algumas modalidades, o gene E3L mutante compreende a substituição de pelo menos uma porção do gene por um ou mais cassetes de genes compreendendo uma molécula de ácido nucleico heteróloga. Em algumas modalidades, um ou mais cassetes de genes compreendem uma molécula de ácido nucleico heteróloga que codifica OX40L. Em algumas modalidades o um ou mais cassetes de genes compreende ainda uma molécula de ácido nucleico heterólogo que codifica o ligante de tirosina quinase 3 tipo Fms humano (hFlt3L). Em algumas modalidades, um ou mais cassetes de genes compreendem um ácido nucleico heterólogo que codifica o ligante de tirosina quinase 3 tipo Fms humano (hFlt3L).

[0104] Em um aspecto, a presente divulgação fornece uma composição imunogênica compreendendo o vírus MVAΔE5R. Em algumas

modalidades, a composição imunogênica compreende ainda um veículo farmaceuticamente aceitável. Em algumas modalidades, a composição imunogênica compreende ainda um adjuvante farmaceuticamente aceitável.

[0105] Em algumas modalidades, a presente divulgação fornece um método para tratar um tumor sólido em um indivíduo em necessidade, o método compreendendo administrar a um tumor uma composição que compreende uma quantidade eficaz do vírus MVAΔE5R ou a composição imunogênica. Em algumas modalidades, o tratamento compreende um ou mais dentre os seguintes: induzir uma resposta imunológica no indivíduo contra o tumor ou aumentar ou promover uma resposta imunológica contínua contra o tumor no indivíduo, reduzir o tamanho do tumor, erradicar o tumor, inibir o crescimento do tumor, inibir o crescimento metastático do tumor, induzir apoptose de células de tumor ou prolongar a sobrevivência do indivíduo. Em algumas modalidades, a composição é administrada por injeção intratumoral ou intravenosa ou uma combinação simultânea ou sequencial de injeção intratumoral e intravenosa. Em algumas modalidades, o tumor é melanoma, cólon, mama, bexiga ou carcinoma da próstata. Em algumas modalidades, a composição compreende ainda um ou mais agentes selecionados a partir de: um ou mais agentes de bloqueio de ponto de verificação imunológico; um ou mais medicamentos anticâncer, fingolimode (FTY720); e qualquer combinação dos mesmos.

[0106] Em algumas modalidades, o método compreende ainda administrar separada, sequencial ou simultaneamente ao indivíduo um ou mais agentes selecionados a partir de: um ou mais agentes de bloqueio de ponto de verificação imunológico; um ou mais medicamentos anticâncer, fingolimode (FTY720); e qualquer combinação dos mesmos. Em algumas modalidades, o um ou mais agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico são selecionados a partir do grupo que consiste em anticorpo anti-PD-L1, anticorpo anti-PD-1, anticorpo anti-CTLA-4, ipilimumabe, nivolumabe, pidilizumabe, lambrolizumabe, pembrolizumabe, atezolizumabe, avelumabe, durvalumabe,

MPDL3280A, BMS-936559, MEDI-4736, MSB 00107180, LAG-3, TIM3, B7-H3, B7-H4, TIGIT, AMP-224, MDX-1105, arelumabe, tremelimumabe, IMP321, BMS-986016, lirilumabe, urelumabe, PF-05082566, IPH2101, MEDI-6469, CP-870.893, Mogamulizumabe, Varlilumabe, Galiximabe, AMP-514, AUNP 12, Indoximod, NLG-919, INCB024360, CD80, CD86, ICOS, Inibidores DLBCL, BTLA, PDR001 e qualquer combinação dos mesmos; e/ou um ou mais medicamentos anticâncer são selecionados a partir do grupo que consiste em um inibidor de Mek (U0126, selumitinibe (AZD6244), PD98059, trametinibe, cobimetinibe), um inibidor de EGFR (lapatinibe (LPN), erlotinibe (ERL)), um inibidor HER2 (lapatinibe (LPN), Trastuzumabe), um inibidor de Raf (sorafenibe (SFN)), um inibidor de BRAF (dabrafenibe, vemurafenibe), um anticorpo anti-OX40, um anticorpo agonista GITR, um anticorpo anti-CSFR, a Inibidor de CSFR, paclitaxel, agonista de TLR9 CpG e um inibidor de VEGF (Bevacizumabe) e qualquer combinação dos mesmos. Em algumas modalidades, um ou mais dentre os agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico compreendem o anticorpo anti-PD-L1. Em algumas modalidades, um ou mais dentre os agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico compreendem o anticorpo anti-PD-1. Em algumas modalidades, um ou mais dentre os agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico compreendem o anticorpo anti-CTLA-4. Em algumas modalidades, a combinação do vírus MVAΔE5R com o agente de bloqueio do ponto de verificação imunológico, medicamento anticâncer e/ou fingolimode (FTY720) tem um efeito sinérgico no tratamento do tumor em comparação com a administração do vírus MVAΔE5R ou de o agente de bloqueio de ponto de verificação imunológico, medicamento anticâncer ou fingolimode (FTY720) sozinho.

[0107] Em outro aspecto, a presente divulgação fornece um método de estimulação de uma resposta imunológica compreendendo administrar a um indivíduo uma quantidade eficaz do vírus ou a composição imunogênica. Em algumas modalidades, o método compreende ainda administrar separada,

sequencial ou simultaneamente ao indivíduo um ou mais agentes selecionados a partir de: um ou mais agentes de bloqueio de ponto de verificação imunológico; um ou mais medicamentos anticâncer, fingolimode (FTY720); e qualquer combinação dos mesmos. Em algumas modalidades, o um ou mais agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico são selecionados a partir do grupo que consiste em anticorpo anti-PD-L1, anticorpo anti-PD-1, anticorpo anti-CTLA-4, ipilimumabe, nivolumabe, pidilizumabe, lambrolizumabe, pembrolizumabe, atezolizumabe, avelumabe, durvalumabe, MPDL3280A, BMS-936559, MEDI-4736, MSB 00107180, LAG-3, TIM3, B7-H3, B7-H4, TIGIT, AMP-224, MDX-1105, arelumabe, tremelimumabe, IMP321, BMS-986016, lirilumabe, urelumabe, PF-05082566, IPH2101, MEDI-6469, CP-870.893, Mogamulizumabe, Varlilumabe, Galiximabe, AMP-514, AUNP 12, Indoximod, NLG-919, INCB024360, CD80, CD86, ICOS, Inibidores DLBCL, BTLA, PDR001 e qualquer combinação dos mesmos; e/ou um ou mais medicamentos anticâncer são selecionados a partir do grupo que consiste em um inibidor de Mek (U0126, selumitinibe (AZD6244), PD98059, trametinibe, cobimetinibe), um inibidor de EGFR (lapatinibe (LPN), erlotinibe (ERL)), um inibidor HER2 (lapatinibe (LPN), Trastuzumabe), um inibidor de Raf (sorafenibe (SFN)), um inibidor de BRAF (dabrafenibe, vemurafenibe), um anticorpo anti-OX40, um anticorpo agonista GITR, um anticorpo anti-CSFR, a Inibidor de CSFR, paclitaxel, agonista de TLR9 CpG e um inibidor de VEGF (Bevacizumabe) e qualquer combinação dos mesmos. Em algumas modalidades, um ou mais dentre os agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico compreendem o anticorpo anti-PD-L1. Em algumas modalidades, um ou mais dentre os agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico compreendem o anticorpo anti-PD-1. Em algumas modalidades, um ou mais dentre os agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico compreendem o anticorpo anti-CTLA-4. Em algumas modalidades, a combinação do vírus MVAΔE5R com o agente de bloqueio do ponto de verificação imunológico, medicamento anticâncer e/ou fingolimode (FTY720)

tem um efeito sinérgico na estimulação de uma resposta imunológica em comparação com a administração do vírus MVAΔE5R ou do agente de bloqueio de ponto de verificação imunológico, medicamento anticâncer ou fingolimode (FTY720) sozinho.

[0108] Em um aspecto, a presente divulgação fornece um ácido nucleico que codifica os vírus MVAΔE5R manipulados descritos neste documento.

[0109] Em um aspecto, a presente divulgação fornece um kit que compreende os vírus MVAΔE5R projetados descritos neste documento e instruções de uso.

[0110] Em um aspecto, a presente divulgação fornece um vírus vaccinia (VACV) geneticamente modificado para compreender um gene E5R mutante (VACVΔE5R). Em algumas modalidades o vírus compreende ainda uma molécula de ácido nucleico heteróloga que codifica um ou mais dentre OX40L, hFlt3L, hIL-2, hIL-12, hIL-15, hIL-15/IL-15Rα, hIL-18, hIL-21, anti-huCTLA-4, anti-huPD-1, anti-huPD-L1, GITRL, 4-1BBL, ou CD40L, e/ou uma deleção de acordo com qualquer um ou mais dentre timidina quinase (TK) C7 (ΔC7L), E3L (ΔE3L), E3LΔ83N, B2R (ΔB2R), B19R (B18R; ΔWR200), IL18BP, K7R, C12L, B8R, B14R, N1L, C11R, K1L, M1L, N2L, ou WR199. Em algumas modalidades, o gene E5R mutante compreende a substituição de pelo menos uma porção do gene por um ou mais cassetes de genes compreendendo uma molécula de ácido nucleico heteróloga. Em algumas modalidades, um ou mais cassetes de genes compreendem uma molécula de ácido nucleico heteróloga que codifica OX40L (VACVΔE5R-OX40L). Em algumas modalidades o um ou mais cassetes de genes compreende ainda uma molécula de ácido nucleico heterólogo que codifica o ligante de tirosina quinase 3 tipo Fms humano (hFlt3L) (VACVΔE5R-OX40L-hFlt3L). Em algumas modalidades o um ou mais cassetes de genes compreende ainda uma molécula de ácido nucleico heterólogo que codifica o ligante de tirosina quinase 3 tipo Fms humano (hFlt3L) (VACVΔE5R-hFlt3L). Em algumas modalidades, o ácido nucleico

heterólogo é expresso a partir de dentro de um gene viral selecionado a partir do grupo que consiste no gene da timidina quinase (TK), o gene C7, o gene C11, o gene K3, o gene F1, o gene F2, o gene F4, o gene F6, o gene F8, o gene F9, o gene F11, o gene F14.5, o gene J2, o gene A46, o gene E3L, o gene B18R (WR200), o O gene E5R, o gene K7R, o gene C12L, o gene B8R, o gene B14R, o gene N1L, o gene K1L, o gene C16, o gene M1L, o gene N2L e o gene WR199. Em algumas modalidades, o vírus compreende ainda um gene da timidina quinase (TK) mutante. Em algumas modalidades, o gene TK mutante compreende a substituição de pelo menos uma porção do gene por um ou mais cassetes de genes compreendendo uma molécula de ácido nucleico heteróloga. Em algumas modalidades, o vírus compreende ainda um gene C7 mutante. Em algumas modalidades, o gene C7 mutante compreende uma inserção de um ou mais cassetes de genes compreendendo uma molécula de ácido nucleico heteróloga. Em algumas modalidades, o gene C7 mutante compreende a substituição de pelo menos uma porção do gene por um ou mais cassetes de genes compreendendo uma molécula de ácido nucleico heteróloga.

[0111] Em um aspecto, a presente divulgação fornece uma composição imunogênica compreendendo o vírus VACVΔE5R. Em algumas modalidades, a composição imunogênica compreende ainda um veículo farmaceuticamente aceitável. Em algumas modalidades, a composição imunogênica compreende ainda um adjuvante farmaceuticamente aceitável.

[0112] Em algumas modalidades, a presente divulgação fornece um método para tratar um tumor sólido em um indivíduo em necessidade, o método compreendendo administrar a um tumor uma composição que compreende uma quantidade eficaz do vírus VACVΔE5R ou a composição imunogênica. Em algumas modalidades, o tratamento compreende um ou mais dentre os seguintes: induzir uma resposta imunológica no indivíduo contra o tumor ou aumentar ou promover uma resposta imunológica contínua contra o tumor no indivíduo, reduzir o tamanho do tumor, erradicar o tumor, inibir o

crescimento do tumor, inibir o crescimento metastático do tumor, induzir apoptose de células de tumor ou prolongar a sobrevivência do indivíduo. Em algumas modalidades, a composição é administrada por injeção intratumoral ou intravenosa ou uma combinação simultânea ou sequencial de injeção intratumoral e intravenosa. Em algumas modalidades, o tumor é melanoma, cólon, mama, bexiga ou carcinoma da próstata. Em algumas modalidades, a composição compreende ainda um ou mais agentes selecionados a partir de: um ou mais agentes de bloqueio de ponto de verificação imunológico; um ou mais medicamentos anticâncer, fingolimode (FTY720); e qualquer combinação dos mesmos.

[0113] Em algumas modalidades, o método compreende ainda administrar separada, sequencial ou simultaneamente ao indivíduo um ou mais agentes selecionados a partir de: um ou mais agentes de bloqueio de ponto de verificação imunológico; um ou mais medicamentos anticâncer, fingolimode (FTY720); e qualquer combinação dos mesmos. Em algumas modalidades, o um ou mais agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico são selecionados a partir do grupo que consiste em anticorpo anti-PD-L1, anticorpo anti-PD-1, anticorpo anti-CTLA-4, ipilimumabe, nivolumabe, pidilizumabe, lambrolizumabe, pembrolizumabe, atezolizumabe, avelumabe, durvalumabe, MPDL3280A, BMS-936559, MEDI-4736, MSB 00107180, LAG-3, TIM3, B7-H3, B7-H4, TIGIT, AMP-224, MDX-1105, arelumabe, tremelimumabe, IMP321, BMS-986016, lirilumabe, urelumabe, PF-05082566, IPH2101, MEDI-6469, CP-870.893, Mogamulizumabe, Varlilumabe, Galiximabe, AMP-514, AUNP 12, Indoximod, NLG-919, INCB024360, CD80, CD86, ICOS, Inibidores DLBCL, BTLA, PDR001 e qualquer combinação dos mesmos; e/ou um ou mais medicamentos anticâncer são selecionados a partir do grupo que consiste em um inibidor de Mek (U0126, selumitinibe (AZD6244), PD98059, trametinibe, cobimetinibe), um inibidor de EGFR (lapatinibe (LPN), erlotinibe (ERL)), um inibidor HER2 (lapatinibe (LPN), Trastuzumabe), um inibidor de Raf (sorafenibe (SFN)), um inibidor de BRAF (dabrafenibe, vemurafenibe), um anticorpo anti-

OX40, um anticorpo agonista GITR, um anticorpo anti-CSFR, a Inibidor de CSFR, paclitaxel, agonista de TLR9 CpG e um inibidor de VEGF (Bevacizumabe) e qualquer combinação dos mesmos. Em algumas modalidades, um ou mais dentre os agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico compreendem o anticorpo anti-PD-L1. Em algumas modalidades, um ou mais dentre os agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico compreendem o anticorpo anti-PD-1. Em algumas modalidades, um ou mais dentre os agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico compreendem o anticorpo anti-CTLA-4. Em algumas modalidades, a combinação do vírus VACVΔE5R com o agente de bloqueio do ponto de verificação imunológico, medicamento anticâncer e/ou fingolimode (FTY720) tem um efeito sinérgico no tratamento do tumor em comparação com a administração do vírus VACVΔE5R ou de o agente de bloqueio de ponto de verificação imunológico, medicamento anticâncer ou fingolimode (FTY720) sozinho.

[0114] Em outro aspecto, a presente divulgação fornece um método de estimulação de uma resposta imunológica compreendendo administrar a um indivíduo uma quantidade eficaz do vírus ou a composição imunogênica. Em algumas modalidades, o método compreende ainda administrar separada, sequencial ou simultaneamente ao indivíduo um ou mais agentes selecionados a partir de: um ou mais agentes de bloqueio de ponto de verificação imunológico; um ou mais medicamentos anticâncer, fingolimode (FTY720); e qualquer combinação dos mesmos. Em algumas modalidades, o um ou mais agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico são selecionados a partir do grupo que consiste em anticorpo anti-PD-L1, anticorpo anti-PD-1, anticorpo anti-CTLA-4, ipilimumabe, nivolumabe, pidilizumabe, lambrolizumabe, pembrolizumabe, atezolizumabe, avelumabe, durvalumabe, MPDL3280A, BMS-936559, MEDI-4736, MSB 00107180, LAG-3, TIM3, B7-H3, B7-H4, TIGIT, AMP-224, MDX-1105, arelumabe, tremelimumabe, IMP321, BMS-986016, lirilumabe, urelumabe, PF-05082566, IPH2101, MEDI-6469, CP-870.893,

Mogamulizumabe, Varlilumabe, Galiximabe, AMP-514, AUNP 12, Indoximod, NLG-919, INCB024360, CD80, CD86, ICOS, Inibidores DLBCL, BTLA, PDR001 e qualquer combinação dos mesmos; e/ou um ou mais medicamentos anticâncer são selecionados a partir do grupo que consiste em um inibidor de Mek (U0126, selumitinibe (AZD6244), PD98059, trametinibe, cobimetinibe), um inibidor de EGFR (lapatinibe (LPN), erlotinibe (ERL)), um inibidor HER2 (lapatinibe (LPN), Trastuzumabe), um inibidor de Raf (sorafenibe (SFN)), um inibidor de BRAF (dabrafenibe, vemurafenibe), um anticorpo anti-OX40, um anticorpo agonista GITR, um anticorpo anti-CSFR, a Inibidor de CSFR, paclitaxel, agonista de TLR9 CpG e um inibidor de VEGF (Bevacizumabe) e qualquer combinação dos mesmos. Em algumas modalidades, um ou mais dentre os agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico compreendem o anticorpo anti-PD-L1. Em algumas modalidades, um ou mais dentre os agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico compreendem o anticorpo anti-PD-1. Em algumas modalidades, um ou mais dentre os agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico compreendem o anticorpo anti-CTLA-4. Em algumas modalidades, a combinação do vírus VACVΔE5R com o agente de bloqueio do ponto de verificação imunológico, medicamento anticâncer e/ou fingolimode (FTY720) tem um efeito sinérgico na estimulação de uma resposta imunológica em comparação com a administração do vírus VACVΔE5R ou do agente de bloqueio de ponto de verificação imunológico, medicamento anticâncer ou fingolimode (FTY720) sozinho.

[0115] Em um aspecto, a presente divulgação fornece um ácido nucleico que codifica os vírus VACVΔE5R manipulados da presente tecnologia.

[0116] Em um aspecto, a presente divulgação fornece um kit compreendendo os vírus VACVΔE5R manipulados da presente tecnologia e instruções de uso.

[0117] Em um aspecto, a presente divulgação fornece um vírus mixoma (MYXV) geneticamente modificado para compreender um gene M31R

mutante (MYXVΔM31R). Em algumas modalidades o vírus compreende ainda uma molécula de ácido nucleico heteróloga que codifica um ou mais dentre OX40L, hFlt3L, hIL-2, hIL-12, hIL-15, hIL-15/IL-15Rα, hIL-18, hIL-21, anti-huCTLA-4, anti-huPD-1, anti-huPD-L1, GITRL, 4-1BBL, ou CD40L, e/ou uma deleção de qualquer um ou mais dentre ortólogos de mixoma do vírus vaccinia timidina quinase (TK) C7 (ΔC7L), E3L (ΔE3L), E3LΔ83N, B2R (ΔB2R), B19R (B18R; ΔWR200), IL18BP, K7R, C12L, B8R, B14R, N1L, C11R, K1L, M1L, N2L, ou WR199. Em algumas modalidades, o gene M31R mutante compreende a substituição de pelo menos uma porção do gene por um ou mais cassetes de genes compreendendo uma molécula de ácido nucleico heteróloga. Em algumas modalidades, um ou mais cassetes de genes compreendem uma molécula de ácido nucleico heteróloga que codifica OX40L (MYXVΔM31R-OX40L). Em algumas modalidades o um ou mais cassetes de genes compreende ainda uma molécula de ácido nucleico heterólogo que codifica o ligante de tirosina quinase 3 tipo Fms humano (hFlt3L) (MYXVΔM31R-OX40L-hFlt3L). Em algumas modalidades o um ou mais cassetes de genes compreende ainda uma molécula de ácido nucleico heterólogo que codifica o ligante de tirosina quinase 3 tipo Fms humano (hFlt3L) (MYXVΔM31R-hFlt3L). Em algumas modalidades, o ácido nucleico heterólogo é expresso a partir de dentro de um myxoma ortólogo de gene viral vaccinia selecionado a partir do grupo que consiste no gene da timidina quinase (TK), o gene C7, o gene C11, o gene K3, o gene F1, o gene F2, o gene F4, o gene F6, o gene F8, o gene F9, o gene F11, o gene F14.5, o gene J2, o gene A46, o gene E3L, o gene B18R (WR200), o O gene E5R, o gene K7R, o gene C12L, o gene B8R, o gene B14R, o gene N1L, o gene K1L, o gene C16, o gene M1L, o gene N2L e o gene WR199. Em algumas modalidades, o vírus compreende ainda um ortólogo de myxoma mutante de um gene da timidina quinase (TK) mutante. Em algumas modalidades, o gene TK mutante compreende a substituição de pelo menos uma porção do gene por um ou mais cassetes de genes compreendendo uma molécula de ácido

nucleico heteróloga. Em algumas modalidades, o vírus compreende ainda um ortólogo de myxoma mutante de um gene C7 do vírus vaccinia. Em algumas modalidades, o gene C7 mutante compreende uma inserção de um ou mais cassetes de genes compreendendo uma molécula de ácido nucleico heteróloga. Em algumas modalidades, o gene C7 mutante compreende a substituição de pelo menos uma porção do gene por um ou mais cassetes de genes compreendendo uma molécula de ácido nucleico heteróloga.

[0118] Em um aspecto, a presente divulgação fornece uma composição imunogênica compreendendo o vírus MYXVΔM31R. Em algumas modalidades, a composição imunogênica compreende ainda um veículo farmaceuticamente aceitável. Em algumas modalidades, a composição imunogênica compreende ainda um adjuvante farmaceuticamente aceitável.

[0119] Em algumas modalidades, a presente divulgação fornece um método para tratar um tumor sólido em um indivíduo em necessidade, o método compreendendo administrar a um tumor uma composição que compreende uma quantidade eficaz do vírus MYXVΔM31R ou a composição imunogênica. Em algumas modalidades, o tratamento compreende um ou mais dentre os seguintes: induzir uma resposta imunológica no indivíduo contra o tumor ou aumentar ou promover uma resposta imunológica contínua contra o tumor no indivíduo, reduzir o tamanho do tumor, erradicar o tumor, inibir o crescimento do tumor, inibir o crescimento metastático do tumor, induzir apoptose de células de tumor ou prolongar a sobrevivência do indivíduo. Em algumas modalidades, a composição é administrada por injeção intratumoral ou intravenosa ou uma combinação simultânea ou sequencial de injeção intratumoral e intravenosa. Em algumas modalidades, o tumor é melanoma, cólon, mama, bexiga ou carcinoma da próstata.

[0120] Em algumas modalidades, a composição compreende ainda um ou mais agentes selecionados a partir de: um ou mais agentes de bloqueio de ponto de verificação imunológico; um ou mais medicamentos anticâncer, fingolimode (FTY720); e qualquer combinação dos mesmos. Em algumas

modalidades, o método compreende ainda administrar separada, sequencial ou simultaneamente ao indivíduo um ou mais agentes selecionados a partir de: um ou mais agentes de bloqueio de ponto de verificação imunológico; um ou mais medicamentos anticâncer, fingolimode (FTY720); e qualquer combinação dos mesmos. Em algumas modalidades, o um ou mais agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico são selecionados a partir do grupo que consiste em anticorpo anti-PD-L1, anticorpo anti-PD-1, anticorpo anti-CTLA-4, ipilimumabe, nivolumabe, pidilizumabe, lambrolizumabe, pembrolizumabe, atezolizumabe, avelumabe, durvalumabe, MPDL3280A, BMS-936559, MEDI-4736, MSB 00107180, LAG-3, TIM3, B7-H3, B7-H4, TIGIT, AMP-224, MDX-1105, arelumabe, tremelimumabe, IMP321, BMS-986016, lirilumabe, urelumabe, PF-05082566, IPH2101, MEDI-6469, CP-870.893, Mogamulizumabe, Varlilumabe, Galiximabe, AMP-514, AUNP 12, Indoximod, NLG-919, INCB024360, CD80, CD86, ICOS, Inibidores DLBCL, BTLA, PDR001 e qualquer combinação dos mesmos; e/ou um ou mais medicamentos anticâncer são selecionados a partir do grupo que consiste em um inibidor de Mek (U0126, selumitinibe (AZD6244), PD98059, trametinibe, cobimetinibe), um inibidor de EGFR (lapatinibe (LPN), erlotinibe (ERL)), um inibidor HER2 (lapatinibe (LPN), Trastuzumabe), um inibidor de Raf (sorafenibe (SFN)), um inibidor de BRAF (dabrafenibe, vemurafenibe), um anticorpo anti-OX40, um anticorpo agonista GITR, um anticorpo anti-CSFR, a Inibidor de CSFR, paclitaxel, agonista de TLR9 CpG e um inibidor de VEGF (Bevacizumabe) e qualquer combinação dos mesmos. Em algumas modalidades, um ou mais dentre os agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico compreendem o anticorpo anti-PD-L1. Em algumas modalidades, um ou mais dentre os agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico compreendem o anticorpo anti-PD-1. Em algumas modalidades, um ou mais dentre os agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico compreendem o anticorpo anti-CTLA-4. Em algumas modalidades, a combinação do vírus MYXVΔM31R com o agente de bloqueio do ponto de

verificação imunológico, medicamento anticâncer e/ou fingolimode (FTY720) tem um efeito sinérgico no tratamento do tumor em comparação com a administração do vírus MYXVΔM31R ou de o agente de bloqueio de ponto de verificação imunológico, medicamento anticâncer ou fingolimode (FTY720) sozinho.

[0121] Em outro aspecto, a presente divulgação fornece um método de estimulação de uma resposta imunológica compreendendo administrar a um indivíduo uma quantidade eficaz do vírus ou a composição imunogênica. Em algumas modalidades, o método compreende ainda administrar separada, sequencial ou simultaneamente ao indivíduo um ou mais agentes selecionados a partir de: um ou mais agentes de bloqueio de ponto de verificação imunológico; um ou mais medicamentos anticâncer, fingolimode (FTY720); e qualquer combinação dos mesmos. Em algumas modalidades, o um ou mais agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico são selecionados a partir do grupo que consiste em anticorpo anti-PD-L1, anticorpo anti-PD-1, anticorpo anti-CTLA-4, ipilimumabe, nivolumabe, pidilizumabe, lambrolizumabe, pembrolizumabe, atezolizumabe, avelumabe, durvalumabe, MPDL3280A, BMS-936559, MEDI-4736, MSB 00107180, LAG-3, TIM3, B7-H3, B7-H4, TIGIT, AMP-224, MDX-1105, arelumabe, tremelimumabe, IMP321, BMS-986016, lirilumabe, urelumabe, PF-05082566, IPH2101, MEDI-6469, CP-870.893, Mogamulizumabe, Varlilumabe, Galiximabe, AMP-514, AUNP 12, Indoximod, NLG-919, INCB024360, CD80, CD86, ICOS, Inibidores DLBCL, BTLA, PDR001 e qualquer combinação dos mesmos; e/ou um ou mais medicamentos anticâncer são selecionados a partir do grupo que consiste em um inibidor de Mek (U0126, selumitinibe (AZD6244), PD98059, trametinibe, cobimetinibe), um inibidor de EGFR (lapatinibe (LPN), erlotinibe (ERL)), um inibidor HER2 (lapatinibe (LPN), Trastuzumabe), um inibidor de Raf (sorafenibe (SFN)), um inibidor de BRAF (dabrafenibe, vemurafenibe), um anticorpo anti-OX40, um anticorpo agonista GITR, um anticorpo anti-CSFR, a Inibidor de CSFR, paclitaxel, agonista de TLR9 CpG e um inibidor de VEGF (Bevacizumabe) e

qualquer combinação dos mesmos. Em algumas modalidades, um ou mais dentre os agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico compreendem o anticorpo anti-PD-L1. Em algumas modalidades, um ou mais dentre os agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico compreendem o anticorpo anti-PD-1. Em algumas modalidades, um ou mais dentre os agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico compreendem o anticorpo anti-CTLA-4. Em algumas modalidades, a combinação do vírus MYXVΔM31R com o agente de bloqueio do ponto de verificação imunológico, medicamento anticâncer e/ou fingolimode (FTY720) tem um efeito sinérgico na estimulação de uma resposta imunológica em comparação com a administração do vírus MYXVΔM31R ou do agente de bloqueio de ponto de verificação imunológico, medicamento anticâncer ou fingolimode (FTY720) sozinho.

[0122] Em um aspecto, a presente divulgação fornece um ácido nucleico que codifica os vírus MYXVΔM31R manipulados da presente tecnologia.

[0123] Em um aspecto, a presente divulgação fornece um kit compreendendo os vírus MYXVΔM31R manipulados da presente tecnologia e instruções de uso.

[0124] Em um aspecto, a presente divulgação fornece um vírus vaccinia (VACV) geneticamente modificado para compreender um gene B2R mutante (VACVΔB2R).

[0125] Em algumas modalidades o vírus VACVΔB2R compreende ainda uma molécula de ácido nucleico heteróloga que codifica um ou mais dentre OX40L, hFlt3L, hIL-2, hIL-12, hIL-15, hIL-15/IL-15Rα, hIL-18, hIL-21, anti-huCTLA-4, anti-huPD-1, anti-huPD-L1, GITRL, 4-1BBL, ou CD40L, e/ou uma deleção de acordo com qualquer um ou mais dentre timidina quinase (TK) C7 (ΔC7L), E3L (ΔE3L), E3LΔ83N, B19R (B18R; ΔWR200), IL18BP, K7R, C12L, B8R, B14R, N1L, C11R, K1L, M1L, N2L, ou WR199. Em algumas modalidades, o vírus VACVΔB2R é selecionado a partir de um ou mais dentre

VACVΔE3L83NΔB2R, VACVΔE5RΔB2R, VACVΔE3L83NΔE5RΔB2R, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-hIL-12-ΔB2R. Em algumas modalidades, o gene B2R mutante compreende a substituição de pelo menos uma porção do gene por um ou mais cassetes de genes compreendendo uma molécula de ácido nucleico heteróloga. Em algumas modalidades, um ou mais cassetes de genes compreendem uma molécula de ácido nucleico heteróloga que codifica OX40L (VACVΔB2R-OX40L). Em algumas modalidades o um ou mais cassetes de genes compreende ainda uma molécula de ácido nucleico heterólogo que codifica o ligante de tirosina quinase 3 tipo Fms humano (hFlt3L) (VACVΔB2R-OX40L-hFlt3L). Em algumas modalidades o um ou mais cassetes de genes compreende ainda uma molécula de ácido nucleico heterólogo que codifica o ligante de tirosina quinase 3 tipo Fms humano (hFlt3L) (VACVΔB2R-hFlt3L). Em algumas modalidades, o ácido nucleico heterólogo é expresso a partir de dentro de um gene viral selecionado a partir do grupo que consiste no gene da timidina quinase (TK), o gene C7, o gene C11, o gene K3, o gene F1, o gene F2, o gene F4, o gene F6, o gene F8, o gene F9, o gene F11, o gene F14.5, o gene J2, o gene A46, o gene E3L, o gene B18R (WR200), o O gene E5R, o gene K7R, o gene C12L, o gene B8R, o gene B14R, o gene N1L, o gene K1L, o gene C16, o gene M1L, o gene N2L e o gene WR199.

[0126] Em algumas modalidades, a presente divulgação fornece uma composição imunogênica compreendendo o vírus VACVΔB2R. Em algumas modalidades, a composição imunogênica compreende ainda um veículo farmaceuticamente aceitável. Em algumas modalidades, a composição imunogênica compreende ainda um adjuvante farmaceuticamente aceitável.

[0127] Em algumas modalidades, a presente divulgação fornece um método para tratar um tumor sólido em um indivíduo em necessidade, o método compreendendo administrar a um tumor uma composição que compreende uma quantidade eficaz do vírus VACVΔB2R ou a composição imunogênica.

[0128] Em algumas modalidades, o tratamento compreende um ou mais dentre os seguintes: induzir uma resposta imunológica no indivíduo contra o tumor ou aumentar ou promover uma resposta imunológica contínua contra o tumor no indivíduo, reduzir o tamanho do tumor, erradicar o tumor, inibir o crescimento do tumor, inibir o crescimento metastático do tumor, induzir apoptose de células de tumor ou prolongar a sobrevivência do indivíduo.

[0129] Em algumas modalidades, a composição é administrada por injeção intratumoral ou intravenosa ou uma combinação simultânea ou sequencial de injeção intratumoral e intravenosa.

[0130] Em algumas modalidades, o tumor é melanoma, cólon, mama, bexiga ou carcinoma da próstata.

[0131] Em algumas modalidades, a composição compreende ainda um ou mais agentes selecionados a partir de: um ou mais agentes de bloqueio de ponto de verificação imunológico; um ou mais medicamentos anticâncer, fingolimode (FTY720); e qualquer combinação dos mesmos. Em algumas modalidades, o método compreende ainda administrar separada, sequencial ou simultaneamente ao indivíduo um ou mais agentes selecionados a partir de: um ou mais agentes de bloqueio de ponto de verificação imunológico; um ou mais medicamentos anticâncer, fingolimode (FTY720); e qualquer combinação dos mesmos. Em algumas modalidades, o um ou mais agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico são selecionados a partir do grupo que consiste em anticorpo anti-PD-L1, anticorpo anti-PD-1, anticorpo anti-CTLA-4, ipilimumabe, nivolumabe, pidilizumabe, lambrolizumabe, pembrolizumabe, atezolizumabe, avelumabe, durvalumabe, MPDL3280A, BMS-936559, MEDI-4736, MSB 00107180, LAG-3, TIM3, B7-H3, B7-H4, TIGIT, AMP-224, MDX-1105, arelumabe, tremelimumabe, IMP321, BMS-986016, lirilumabe, urelumabe, PF-05082566, IPH2101, MEDI-6469, CP-870.893, Mogamulizumabe, Varlilumabe, Galiximabe, AMP-514, AUNP 12, Indoximod, NLG-919, INCB024360, CD80, CD86, ICOS, Inibidores DLBCL, BTLA, PDR001 e qualquer combinação dos mesmos; e/ou um ou mais medicamentos

anticâncer são selecionados a partir do grupo que consiste em um inibidor de Mek (U0126, selumitinibe (AZD6244), PD98059, trametinibe, cobimetinibe), um inibidor de EGFR (lapatinibe (LPN), erlotinibe (ERL)), um inibidor HER2 (lapatinibe (LPN), Trastuzumabe), um inibidor de Raf (sorafenibe (SFN)), um inibidor de BRAF (dabrafenibe, vemurafenibe), um anticorpo anti-OX40, um anticorpo agonista GITR, um anticorpo anti-CSFR, a Inibidor de CSFR, paclitaxel, agonista de TLR9 CpG e um inibidor de VEGF (Bevacizumabe) e qualquer combinação dos mesmos. Em algumas modalidades, um ou mais dentre os agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico compreendem o anticorpo anti-PD-L1. Em algumas modalidades, um ou mais dentre os agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico compreendem o anticorpo anti-PD-1. Em algumas modalidades, um ou mais dentre os agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico compreendem o anticorpo anti-CTLA-4. Em algumas modalidades, na combinação do vírus VACVΔB2R com o agente de bloqueio do ponto de verificação imunológico, medicamento anticâncer e/ou fingolimode (FTY720) tem um efeito sinérgico no tratamento do tumor em comparação com a administração do vírus VACVΔE5R ou de o agente de bloqueio de ponto de verificação imunológico, medicamento anticâncer ou fingolimode (FTY720) sozinho.

[0132] Em algumas modalidades, a presente divulgação fornece um método de estimulação de uma resposta imunológica compreendendo administrar a um indivíduo uma quantidade eficaz do vírus ou a composição imunogênica. Em algumas modalidades, o método compreende ainda administrar separada, sequencial ou simultaneamente ao indivíduo um ou mais agentes selecionados a partir de: um ou mais agentes de bloqueio de ponto de verificação imunológico; um ou mais medicamentos anticâncer, fingolimode (FTY720); e qualquer combinação dos mesmos. Em algumas modalidades, o um ou mais agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico são selecionados a partir do grupo que consiste em anticorpo anti-PD-L1, anticorpo

anti-PD-1, anticorpo anti-CTLA-4, ipilimumabe, nivolumabe, pidilizumabe, lambrolizumabe, pembrolizumabe, atezolizumabe, avelumabe, durvalumabe, MPDL3280A, BMS-936559, MEDI-4736, MSB 00107180, LAG-3, TIM3, B7-H3, B7-H4, TIGIT, AMP-224, MDX-1105, arelumabe, tremelimumabe, IMP321, BMS-986016, lirilumabe, urelumabe, PF-05082566, IPH2101, MEDI-6469, CP-870.893, Mogamulizumabe, Varlilumabe, Galiximabe, AMP-514, AUNP 12, Indoximod, NLG-919, INCB024360, CD80, CD86, ICOS, Inibidores DLBCL, BTLA, PDR001 e qualquer combinação dos mesmos; e/ou um ou mais medicamentos anticâncer são selecionados a partir do grupo que consiste em um inibidor de Mek (U0126, selumitinibe (AZD6244), PD98059, trametinibe, cobimetinibe), um inibidor de EGFR (lapatinibe (LPN), erlotinibe (ERL)), um inibidor HER2 (lapatinibe (LPN), Trastuzumabe), um inibidor de Raf (sorafenibe (SFN)), um inibidor de BRAF (dabrafenibe, vemurafenibe), um anticorpo anti-OX40, um anticorpo agonista GITR, um anticorpo anti-CSFR, a Inibidor de CSFR, paclitaxel, agonista de TLR9 CpG e um inibidor de VEGF (Bevacizumabe) e qualquer combinação dos mesmos. Em algumas modalidades, um ou mais dentre os agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico compreendem o anticorpo anti-PD-L1. Em algumas modalidades, um ou mais dentre os agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico compreendem o anticorpo anti-PD-1. Em algumas modalidades, um ou mais dentre os agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico compreendem o anticorpo anti-CTLA-4. Em algumas modalidades, a combinação do vírus VACVΔB2R com o agente de bloqueio do ponto de verificação imunológico, medicamento anticâncer e/ou fingolimode (FTY720) tem um efeito sinérgico na estimulação de uma resposta imunológica em comparação com a administração do vírus VACVΔB2R ou do agente de bloqueio de ponto de verificação imunológico, medicamento anticâncer ou fingolimode (FTY720) sozinho.

[0133] Em algumas modalidades, a presente divulgação fornece um ácido nucleico que codifica o vírus VACVΔB2R da presente tecnologia.

[0134] Em algumas modalidades, a presente divulgação fornece um kit que compreende o vírus VACVΔB2R da presente tecnologia e instruções de uso.

[0135] Em um aspecto, a presente divulgação fornece um vírus mixoma (MYXV) caracterizado pelo fato de ser geneticamente modificado para compreender um ou mais mutantes selecionados a partir de (i) um gene M63R mutante (MYXVΔM63R); (ii) um gene M64R mutante (MYXVΔM64R); e (iii) um gene M62R mutante (MYXVΔM62R). Em algumas modalidades o vírus compreende ainda uma molécula de ácido nucleico heteróloga que codifica um ou mais dentre OX40L, hFlt3L, hIL-2, hIL-12, hIL-15, hIL-15/IL-15Rα, hIL-18, hIL-21, anti-huCTLA-4, anti-huPD-1, anti-huPD-L1, GITRL, 4-1BBL, ou CD40L, e/ou uma deleção de qualquer um ou mais dentre ortólogos de mixoma do vírus vaccinia timidina quinase (TK) C7 (ΔC7L), E3L (ΔE3L), E3LΔ83N, B2R (ΔB2R), B19R (B18R; ΔWR200), IL18BP, K7R, C12L, B8R, B14R, N1L, C11R, K1L, M1L, N2L, ou WR199 (ΔWR199), ou de myxoma M31R (ΔM31R). Em algumas modalidades, o gene M63R, gene M64R, e/ou gene M62R mutante compreende a substituição de pelo menos uma porção do gene por um ou mais cassetes de genes compreendendo uma molécula de ácido nucleico heteróloga. Em algumas modalidades, o ácido nucleico heterólogo é expresso a partir de dentro de um myxoma ortólogo de gene viral vaccinia selecionado a partir do grupo que consiste no gene da timidina quinase (TK), o gene C7, o gene C11, o gene K3, o gene F1, o gene F2, o gene F4, o gene F6, o gene F8, o gene F9, o gene F11, o gene F14.5, o gene J2, o gene A46, o gene E3L, o gene B2R gene B18R (WR200), o gene E5R, o gene K7R, o gene C12L, o gene B8R, o gene B14R, o gene N1L, o gene K1L, o gene C16, o gene M1L, o gene N2L e o gene WR199.

[0136] Em algumas modalidades, a presente divulgação fornece uma composição imunogênica compreendendo o vírus MYXV da presente tecnologia. Em algumas modalidades, a composição imunogênica compreende ainda um veículo farmaceuticamente aceitável. Em algumas modalidades, a

composição imunogênica compreende ainda um adjuvante farmaceuticamente aceitável.

[0137] Em algumas modalidades, a presente divulgação fornece um método para tratar um tumor sólido em um indivíduo em necessidade, o método compreendendo administrar a um tumor uma composição que compreende uma quantidade eficaz do vírus MYXV da presente tecnologia ou a composição imunogênica. Em algumas modalidades, o tratamento compreende um ou mais dentre os seguintes: induzir uma resposta imunológica no indivíduo contra o tumor ou aumentar ou promover uma resposta imunológica contínua contra o tumor no indivíduo, reduzir o tamanho do tumor, erradicar o tumor, inibir o crescimento do tumor, inibir o crescimento metastático do tumor, induzir apoptose de células de tumor ou prolongar a sobrevivência do indivíduo. Em algumas modalidades, a composição é administrada por injeção intratumoral ou intravenosa ou uma combinação simultânea ou sequencial de injeção intratumoral e intravenosa. Em algumas modalidades, o tumor é melanoma, cólon, mama, bexiga ou carcinoma da próstata.

[0138] Em algumas modalidades, a composição compreende ainda um ou mais agentes selecionados a partir de: um ou mais agentes de bloqueio de ponto de verificação imunológico; um ou mais medicamentos anticâncer, fingolimode (FTY720); e qualquer combinação dos mesmos. Em algumas modalidades, o método compreende ainda administrar separada, sequencial ou simultaneamente ao indivíduo um ou mais agentes selecionados a partir de: um ou mais agentes de bloqueio de ponto de verificação imunológico; um ou mais medicamentos anticâncer, fingolimode (FTY720); e qualquer combinação dos mesmos. Em algumas modalidades, o um ou mais agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico são selecionados a partir do grupo que consiste em anticorpo anti-PD-L1, anticorpo anti-PD-1, anticorpo anti-CTLA-4, ipilimumabe, nivolumabe, pidilizumabe, lambrolizumabe, pembrolizumabe, atezolizumabe, avelumabe, durvalumabe, MPDL3280A, BMS-936559, MEDI-

4736, MSB 00107180, LAG-3, TIM3, B7-H3, B7-H4, TIGIT, AMP-224, MDX-1105, arelumabe, tremelimumabe, IMP321, BMS-986016, lirilumabe, urelumabe, PF-05082566, IPH2101, MEDI-6469, CP-870.893, Mogamulizumabe, Varlilumabe, Galiximabe, AMP-514, AUNP 12, Indoximod, NLG-919, INCB024360, CD80, CD86, ICOS, Inibidores DLBCL, BTLA, PDR001 e qualquer combinação dos mesmos; e/ou um ou mais medicamentos anticâncer são selecionados a partir do grupo que consiste em um inibidor de Mek (U0126, selumitinibe (AZD6244), PD98059, trametinibe, cobimetinibe), um inibidor de EGFR (lapatinibe (LPN), erlotinibe (ERL)), um inibidor HER2 (lapatinibe (LPN), Trastuzumabe), um inibidor de Raf (sorafenibe (SFN)), um inibidor de BRAF (dabrafenibe, vemurafenibe), um anticorpo anti-OX40, um anticorpo agonista GITR, um anticorpo anti-CSFR, a Inibidor de CSFR, paclitaxel, agonista de TLR9 CpG e um inibidor de VEGF (Bevacizumabe) e qualquer combinação dos mesmos. Em algumas modalidades, um ou mais dentre os agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico compreendem o anticorpo anti-PD-L1. Em algumas modalidades, um ou mais dentre os agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico compreendem o anticorpo anti-PD-1. Em algumas modalidades, um ou mais dentre os agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico compreendem o anticorpo anti-CTLA-4. Em algumas modalidades, a combinação dos vírus MYXVΔM62R, MYXVΔM63R e/ou MYXVΔM64R com o agente de bloqueio do ponto de verificação imunológico, medicamento anticâncer e/ou fingolimode (FTY720) tem um efeito sinérgico no tratamento do tumor em comparação com a administração do vírus MYXVΔM62R, MYXVΔM63R e/ou MYXVΔM64R ou do agente de bloqueio do ponto de verificação imunológico, medicamento anticâncer ou fingolimode (FTY720) sozinho.

[0139] Em algumas modalidades, a presente divulgação fornece um método de estimulação de uma resposta imunológica compreendendo administrar a um indivíduo uma quantidade eficaz do vírus ou a composição

imunogênica. Em algumas modalidades, o método compreende ainda administrar separada, sequencial ou simultaneamente ao indivíduo um ou mais agentes selecionados a partir de: um ou mais agentes de bloqueio de ponto de verificação imunológico; um ou mais medicamentos anticâncer, fingolimode (FTY720); e qualquer combinação dos mesmos. Em algumas modalidades, o um ou mais agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico são selecionados a partir do grupo que consiste em anticorpo anti-PD-L1, anticorpo anti-PD-1, anticorpo anti-CTLA-4, ipilimumabe, nivolumabe, pidilizumabe, lambrolizumabe, pembrolizumabe, atezolizumabe, avelumabe, durvalumabe, MPDL3280A, BMS-936559, MEDI-4736, MSB 00107180, LAG-3, TIM3, B7-H3, B7-H4, TIGIT, AMP-224, MDX-1105, arelumabe, tremelimumabe, IMP321, BMS-986016, lirilumabe, urelumabe, PF-05082566, IPH2101, MEDI-6469, CP-870.893, Mogamulizumabe, Varlilumabe, Galiximabe, AMP-514, AUNP 12, Indoximod, NLG-919, INCB024360, CD80, CD86, ICOS, Inibidores DLBCL, BTLA, PDR001 e qualquer combinação dos mesmos; e/ou um ou mais medicamentos anticâncer são selecionados a partir do grupo que consiste em um inibidor de Mek (U0126, selumitinibe (AZD6244), PD98059, trametinibe, cobimetinibe), um inibidor de EGFR (lapatinibe (LPN), erlotinibe (ERL)), um inibidor HER2 (lapatinibe (LPN), Trastuzumabe), um inibidor de Raf (sorafenibe (SFN)), um inibidor de BRAF (dabrafenibe, vemurafenibe), um anticorpo anti-OX40, um anticorpo agonista GITR, um anticorpo anti-CSFR, a Inibidor de CSFR, paclitaxel, agonista de TLR9 CpG e um inibidor de VEGF (Bevacizumabe) e qualquer combinação dos mesmos. Em algumas modalidades, um ou mais dentre os agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico compreendem o anticorpo anti-PD-L1. Em algumas modalidades, um ou mais dentre os agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico compreendem o anticorpo anti-PD-1. Em algumas modalidades, um ou mais dentre os agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico compreendem o anticorpo anti-CTLA-4. Em algumas modalidades, a combinação do vírus MYXV com o agente de bloqueio do ponto

de verificação imunológico, medicamento anticâncer e/ou fingolimode (FTY720) tem um efeito sinérgico na estimulação de uma resposta imunológica em comparação com a administração do vírus MYXV ou do agente de bloqueio de ponto de verificação imunológico, medicamento anticâncer ou fingolimode (FTY720) sozinho.

[0140] Em algumas modalidades, a presente divulgação fornece um ácido nucleico que codifica o vírus MYXV.

[0141] Em algumas modalidades, o vírus compreende ainda uma molécula de ácido nucleico heteróloga que codifica hIL-12. Em algumas modalidades, o vírus compreende MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40LΔWR199-hIL-12. Em algumas modalidades, o vírus compreende ainda um gene C11R mutante (MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40LΔWR199-hIL-12ΔC11R). Em algumas modalidades, o vírus compreende ainda uma molécula de ácido nucleico que codifica hIL-15/IL-15Rα. Em algumas modalidades o vírus compreende ainda um mutante ΔE3L83N, um mutante timidina quinase (ΔTK), um mutante B2R (ΔB2R), um mutante WR199 (ΔWR199) e um mutante WR200) (ΔSR200) e compreendendo uma molécula de ácido nucleico que codifica anti-CTLA-4 e uma molécula de ácido nucleico que codifica IL-12 (VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200). Em algumas modalidades, o vírus VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200 compreende ainda uma molécula de ácido nucleico que codifica hIL-15/IL-15Rα (VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200- hIL-15/IL-15Rα). Em algumas modalidades, o vírus VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200 compreende ainda um gene C11R mutante (ΔC11R) (VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200ΔC11R). Em algumas modalidades, o vírus VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200ΔC11R compreende ainda uma molécula de ácido

nucleico que codifica hIL-15/IL-15Rα (VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200- hIL-15/IL-15Rα ΔC11R).

[0142] Em algumas modalidades, os vírus MYXV da presente tecnologia são geneticamente modificados para compreender um gene M62R mutante (ΔM62R), um gene M63R mutante (ΔM63R) e um gene M64R mutante (ΔM64R) (MYXVΔM62RΔM63RΔM64R).

[0143] Em um aspecto, a presente divulgação fornece um poxvírus recombinante selecionado a partir do grupo que consiste em: MVAΔE3L-OX40L, MVAΔC7L-OX40L, MVAΔC7L-hFlt3L-OX40L, MVAΔC7LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, VACVΔC7L-OX40L, VACVΔC7L-hFlt3L-OX40L, VACVΔE5R, VACV-TK--anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L, VACVΔB2R, VACVE3LΔ83NΔB2R, VACVΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83NΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12-ΔB2R, MYXVΔM31R, MYXVΔM31R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM63R, MYXVΔM64R, MVAΔWR199, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L- ΔWR199, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12ΔC11R, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mO1940 12ΔC11R-hIL-15/IL-15α, VACVΔE5R-IL-15/IL-15Rα, VACVΔE5R-IL-15/IL-15Rα-OX40L, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R- hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200-hIL-15/15/IL E3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200ΔC11R, VACVΔE3L83N-ΔTK- anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200-hIL-15/IL-15RαΔC11R, MYXVΔM63RΔM64R, MYXVΔM62R, MYXVΔM62RΔM63RΔM64R, MYXVΔM31R, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R, MYXVΔM63RΔM64R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64 ΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12,

MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-IL-15/IL-15Rα, MYXVΔM62RΔM63RΔM64R ΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-CTLA-4-anti-CTLA-4 e MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-IL-15/IL-15Rα-anti-CTLA-4.

[0144] Em algumas modalidades, a presente divulgação fornece uma sequência de ácido nucleico que codifica o poxvírus recombinante.

[0145] Em algumas modalidades, a presente divulgação fornece um kit que compreende o poxvírus recombinante.

[0146] Em algumas modalidades, a presente divulgação fornece uma composição imunogênica compreendendo o poxvírus recombinante. Em algumas modalidades, a composição imunogênica compreende ainda um veículo farmaceuticamente aceitável. Em algumas modalidades, a composição imunogênica compreende ainda um adjuvante farmaceuticamente aceitável.

[0147] Em algumas modalidades, a presente divulgação fornece um método para tratar um tumor sólido em um indivíduo em necessidade, o método compreendendo administrar a um tumor uma composição que compreende uma quantidade eficaz do poxvírus recombinante ou a composição imunogênica. Em algumas modalidades, o tratamento compreende um ou mais dentre os seguintes: induzir uma resposta imunológica no indivíduo contra o tumor ou aumentar ou promover uma resposta imunológica contínua contra o tumor no indivíduo, reduzir o tamanho do tumor, erradicar o tumor, inibir o crescimento do tumor, inibir o crescimento metastático do tumor, induzir apoptose de células de tumor ou prolongar a sobrevivência do indivíduo.

[0148] Em algumas modalidades, a composição é administrada por injeção intratumoral ou intravenosa ou uma combinação simultânea ou sequencial de injeção intratumoral e intravenosa.

[0149] Em algumas modalidades, o tumor é melanoma, cólon, mama, bexiga ou carcinoma da próstata.

[0150] Em algumas modalidades, a composição compreende ainda um ou mais agentes selecionados a partir de: um ou mais agentes de bloqueio

de ponto de verificação imunológico; um ou mais medicamentos anticâncer, fingolimode (FTY720); e qualquer combinação dos mesmos. Em algumas modalidades, o método compreende ainda administrar separada, sequencial ou simultaneamente ao indivíduo um ou mais agentes selecionados a partir de: um ou mais agentes de bloqueio de ponto de verificação imunológico; um ou mais medicamentos anticâncer, fingolimode (FTY720); e qualquer combinação dos mesmos. Em algumas modalidades, o um ou mais agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico são selecionados a partir do grupo que consiste em anticorpo anti-PD-L1, anticorpo anti-PD-1, anticorpo anti-CTLA-4, ipilimumabe, nivolumabe, pidilizumabe, lambrolizumabe, pembrolizumabe, atezolizumabe, avelumabe, durvalumabe, MPDL3280A, BMS-936559, MEDI-4736, MSB 00107180, LAG-3, TIM3, B7-H3, B7-H4, TIGIT, AMP-224, MDX-1105, arelumabe, tremelimumabe, IMP321, BMS-986016, lirilumabe, urelumabe, PF-05082566, IPH2101, MEDI-6469, CP-870.893, Mogamulizumabe, Varlilumabe, Galiximabe, AMP-514, AUNP 12, Indoximod, NLG-919, INCB024360, CD80, CD86, ICOS, Inibidores DLBCL, BTLA, PDR001 e qualquer combinação dos mesmos; e/ou um ou mais medicamentos anticâncer são selecionados a partir do grupo que consiste em um inibidor de Mek (U0126, selumitinibe (AZD6244), PD98059, trametinibe, cobimetinibe), um inibidor de EGFR (lapatinibe (LPN), erlotinibe (ERL)), um inibidor HER2 (lapatinibe (LPN), Trastuzumabe), um inibidor de Raf (sorafenibe (SFN)), um inibidor de BRAF (dabrafenibe, vemurafenibe), um anticorpo anti-OX40, um anticorpo agonista GITR, um anticorpo anti-CSFR, a Inibidor de CSFR, paclitaxel, agonista de CpG e um inibidor de VEGF (Bevacizumabe) e qualquer combinação dos mesmos. Em algumas modalidades, um ou mais dentre os agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico compreendem o anticorpo anti-PD-L1. Em algumas modalidades, um ou mais dentre os agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico compreendem o anticorpo anti-PD-1. Em algumas modalidades, um ou mais dentre os agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico compreendem o anticorpo anti-

CTLA-4. Em algumas modalidades, a combinação de poxvírus recombinante com o agente de bloqueio do ponto de verificação imunológico, medicamento anticâncer e/ou fingolimode (FTY720) tem um efeito sinérgico no tratamento do tumor em comparação com a administração de poxvírus recombinante ou do agente de bloqueio do ponto de verificação imunológico, medicamento anticâncer ou fingolimode (FTY720) sozinho.

[0151] Em algumas modalidades, a presente divulgação fornece um método de estimulação de uma resposta imunológica compreendendo administrar a um indivíduo uma quantidade eficaz do vírus ou a composição imunogênica. Em algumas modalidades, o método compreende ainda administrar separada, sequencial ou simultaneamente ao indivíduo um ou mais agentes selecionados a partir de: um ou mais agentes de bloqueio de ponto de verificação imunológico; um ou mais medicamentos anticâncer, fingolimode (FTY720); e qualquer combinação dos mesmos. Em algumas modalidades, o um ou mais agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico são selecionados a partir do grupo que consiste em anticorpo anti-PD-L1, anticorpo anti-PD-1, anticorpo anti-CTLA-4, ipilimumabe, nivolumabe, pidilizumabe, lambrolizumabe, pembrolizumabe, atezolizumabe, avelumabe, durvalumabe, MPDL3280A, BMS-936559, MEDI-4736, MSB 00107180, LAG-3, TIM3, B7-H3, B7-H4, TIGIT, AMP-224, MDX-1105, arelumabe, tremelimumabe, IMP321, BMS-986016, lirilumabe, urelumabe, PF-05082566, IPH2101, MEDI-6469, CP-870.893, Mogamulizumabe, Varlilumabe, Galiximabe, AMP-514, AUNP 12, Indoximod, NLG-919, INCB024360, CD80, CD86, ICOS, Inibidores DLBCL, BTLA, PDR001 e qualquer combinação dos mesmos; e/ou um ou mais medicamentos anticâncer são selecionados a partir do grupo que consiste em um inibidor de Mek (U0126, selumitinibe (AZD6244), PD98059, trametinibe, cobimetinibe), um inibidor de EGFR (lapatinibe (LPN), erlotinibe (ERL)), um inibidor HER2 (lapatinibe (LPN), Trastuzumabe), um inibidor de Raf (sorafenibe (SFN)), um inibidor de BRAF (dabrafenibe, vemurafenibe), um anticorpo anti-OX40, um anticorpo agonista GITR, um anticorpo anti-CSFR, a Inibidor de

CSFR, paclitaxel, agonista de CpG e um inibidor de VEGF (Bevacizumabe) e qualquer combinação dos mesmos. Em algumas modalidades, um ou mais dentre os agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico compreendem o anticorpo anti-PD-L1. Em algumas modalidades, um ou mais dentre os agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico compreendem o anticorpo anti-PD-1. Em algumas modalidades, um ou mais dentre os agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico compreendem o anticorpo anti-CTLA-4. Em algumas modalidades, a combinação do poxvírus recombinante com o agente de bloqueio do ponto de verificação imunológico, medicamento anticâncer e/ou fingolimode (FTY720) tem um efeito sinérgico na estimulação de uma resposta imunológica em comparação com a administração do vírus MYXV ou do agente de bloqueio de ponto de verificação imunológico, medicamento anticâncer ou fingolimode (FTY720) sozinho.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[0152] A FIG. 1 é um diagrama esquemático de recombinação homóloga entre o vetor DNA pCB de plasmídeo e o DNA genômico viral MVAΔE3L no locus do gene da timidina quinase (TK; J2R). O plasmídeo pCB-gpt foi usado para inserir o gene OX40L murino sob o controle do promotor sintético inicial e tardio de vaccinia (PsE/L) no locus TK. Neste caso, o marcador de seleção de medicamentos (gpt) está sob o controle do promotor p7.5 de vaccinia. O cassete de expressão foi flanqueado por uma sequência parcial das regiões do flanco do gene TK (TK-L e TK-R) em cada lado.

[0153] As FIGS. 2A-2B mostram a verificação da expressão de OX40L a partir do vírus recombinante MVAΔE3L-TK(-)-mOX40L. **A FIG. 2A** é uma imagem de amplificação por PCR do gene mOX40L e do gene TK no genoma viral MVAΔE3L e MVAΔE3L-TK(-)-mOX40L. **A FIG. 2B:** Gráficos FACS representativos que mostram a expressão de mOX40L em células B16-F10 infectadas com MVAΔE3L-TK(-)-mOX40L. Resumidamente, células de melanoma de murino B16-F10 foram infectadas a um MOI de 10 durante 24

horas. As células foram então coradas com anticorpo anti-mOX40L conjugado com PE.

[0154] As FIGS. 3A-3H são uma série de representações gráficas de dados que mostram que a injeção intratumoral de MVAΔE3L-OX40L gerou mais células T efetoras infiltrantes de tumor ativadas em tumores distantes em comparação com MVAΔE3L no modelo de tumor bilateral B16-F10. Foi utilizado o modelo de implantação de tumor bilateral de melanoma murino B16-F10. Resumidamente, células de melanoma B16-F10 foram implantadas intradermicamente nos flancos esquerdo e direito de camundongos C57B/6J ($5x10^5$ no flanco direito e $2,5x10^5$ no flanco esquerdo). Sete dias após a implantação do tumor, $2x10^7$ pfu de MVAΔE3L, MVAΔE3L-OX40L ou PBS foi injetado por via intratumoral (IT) nos tumores maiores no flanco direito duas vezes, com três dias de intervalo. Os tumores foram coletados 2 dias após a segunda injeção e os linfócitos infiltrantes do tumor foram analisados por FACS. **As FIGS. 3A-3C.** Gráficos de pontos representativos de células B^+ $CD8^+$ Granzyme em tumores não injetados após tratamento com MVAΔE3L, MVAΔE3L-OX40L ou PBS. **A FIG. 3D.** Gráfico de porcentagens de células B^+ $CD8^+$ T Granzyme fora das células $CD8^+$. Dados são meios± SEM (n=3 ou 4). (** *P* <0,01; *teste t*). **As FIGS. 3E-3G.** Gráficos de pontos representativos de células B^+ $CD4^+$ Granzyme em tumores não injetados após tratamento com MVAΔE3L, MVAΔE3L-OX40L ou PBS. **A FIG. 3H.** Gráfico de porcentagens de células B^+ $CD4^+$ T Granzyme fora das células $CD4^+$. Dados são médias±SEM (n=3 ou 4). (***P*<0.01; ****P*<0.001, *teste t*).

[0155] As FIGS. 4A e 4B são blots ELISPOT representativos e um gráfico que mostra que a injeção IT de MVAΔE3L-OX40L gerou mais células CD8+ T antitumorais nos baços em comparação com MVA. Camundongos com B16-F10 foram tratados com injeção IT de MVAΔE3L, MVAΔE3L-hFlt3L a $2x10^7$ pfu, ou PBS duas vezes, com três dias de intervalo. Os baços foram coletados 2 dias após a segunda injeção. O ensaio ELISPOT foi realizado por

co-cultura de células B16-F10 irradiadas (150.000) e células $CD8^+$ T purificadas (300.000) em uma placa de 96 cavidades. **A FIG. 4A:** Imagem de ELISPOT de amostras triplicadas da esquerda para a direita. **A FIG. 4B:** Gráfico de pontos de IFN-γ^+ por 300.000 células $CD8^+$ T purificadas. Cada barra representa a amostra do baço de um camundongo individual (n=3 ou 4).

[0156] As FIGS. 5A e 5B mostram um diagrama esquemático de recombinação homóloga em duas etapas para gerar MVA∆C7L-hFlt3L-TK(-)-muOX40L. **A FIG. 5A:** Primeira etapa: recombinação homóloga entre o vetor DNA pUC57 de plasmídeo e o DNA genômico viral MVA no gene C6 e C8 que flanqueia o locus C7 para inserir hFlt3L e cassete de expressão de GFP no locus C7 (substituindo o gene C7). O gene Flt3L humano está sob o controle do promotor sintético inicial e tardio de vaccinia (PsE/L). GFP está sob o controle do promotor vaccinia P7.5. **A FIG. 5B:** Segunda etapa: recombinação homóloga entre o vetor DNA pCB de plasmídeo e o DNA genômico viral MVA∆C7L-hFlt3L no locus do gene TK (J2R) para inserir muOX40L e cassete de expressão de marcador de seleção de medicamento no locus do gene TK (J2R). O gene OX40L murino está sob o controle do promotor sintético inicial e tardio de vaccinia (PsE/L). O marcador de seleção de medicamentos gpt está sob o controle do promotor P7.5 de vaccinia. **A FIG. 5C** mostra que DNAs genômicos virais foram analisados por PCR para verificar a expressão de OX40L e hFlt3L e confirmar a inserção dos transgenes.

[0157] A FIG. 6 são uma série de gráficos de pontos da análise FACS que demonstra a expressão de hFlt3L em linhas de células B16-F10 e SK-MEL-28 infectadas com MVA∆C7L-hFlt3L ou MVA∆C7L-hFlt3L-TK(-)-muOX40L. As células foram infectadas a um MOI de 10 por 24 horas antes da coloração do anticorpo e análise FACS. MVA∆C7L, MVA∆C7L-hFlt3L ou MVA∆C7L-hFlt3L-TK(-)-células infectadas com muOX40L expressaram marcador GFP.

[0158] A FIG. 7 são uma série de gráficos de pontos da análise FACS que demonstra a expressão de OX40L murino em linhas de células B16-

F10 e SK-MEL-28 infectadas com MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-muOX40L. As células foram infectadas a um MOI de 10 por 24 horas antes da coloração do anticorpo e análise FACS.

[0159] As FIGS. 8A-8C são uma série de representações gráficas de dados que mostram que a injeção intratumoral de MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-muOX40L gerou mais células $CD8^+$ T efetoras infiltrantes de tumor ativadas em tumores distantes em comparação com MVAΔC7L, MVAΔ C7L-hFlt3L ou MVAΔC7L-hFlt3L inativado por calor em um modelo de melanoma murino bilateral B16-F10. Resumidamente, células de melanoma B16-F10 foram implantadas intradermicamente nos flancos esquerdo e direito de camundongos C57B/6J ($5x10^5$ no flanco direito e $2,5x10^5$ no flanco esquerdo). Sete dias após a implantação do tumor, injeções intratumorais (IT) ($2x10^7$ pfu) de MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-muOX40L, MVAΔC7L, MVAΔC7L-hFlt3L ou MVAΔC7L inativado por calor -hFlt3L foram realizados para os tumores maiores no flanco direito duas vezes, com três dias de intervalo. Os tumores distantes não injetados foram coletados 2 dias após a segunda injeção e os linfócitos infiltrantes do tumor foram analisados por FACS. **A FIG. 8A:** Gráficos de pontos representativos de células B^+ $CD8^+$ T Granzyme em tumores não injetados após tratamento com PBS, MVAΔC7L, MVAΔC7L-hFlt3L, MVAΔC7L-hFlt3L-muOX40L ou Heat-iMVAΔC7L-hFlt3L. **A FIG. 8B:** Gráfico dos números absolutos de células $CD8^+$ T por grama de tumores não injetados distantes. Dados são médias±SEM (n=4 ou 5). (**P*<0.05; ***P*<0.01; *teste t*). **A FIG. 8C.** Gráfico dos números absolutos de células Granzyme B^+CD8^+ T por grama de tumores não injetados distantes. Dados são médias±SEM (n=4 ou 5). (**P*<0.05; ***P*<0.01; *teste t*).

[0160] As FIGS. 9A-9C são uma série de representações gráficas de dados que mostram que a injeção intratumoral de MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-muOX40L gerou mais células $CD4^+$ T efetoras infiltrantes de tumor ativadas em tumores distantes em comparação com MVAΔC7L, MVAΔ C7L-hFlt3L ou

MVAΔC7L-hFlt3L inativado por calor em um modelo de melanoma murino bilateral B16-F10. Resumidamente, células de melanoma B16-F10 foram implantadas intradermicamente nos flancos esquerdo e direito de camundongos C57B/6J ($5x10^5$ no flanco direito e $2,5x10^5$ no flanco esquerdo). Sete dias após a implantação do tumor, injeções intratumorais (IT) ($2x10^7$ pfu) de MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-muOX40L, MVAΔC7L, MVAΔC7L-hFlt3L ou MVAΔC7L inativado por calor -hFlt3L foram realizados para os tumores maiores no flanco direito duas vezes, com três dias de intervalo. Os tumores distantes não injetados foram coletados 2 dias após a segunda injeção e os linfócitos infiltrantes do tumor foram analisados por FACS. **A FIG. 9A:** Gráficos de pontos representativos de células B^+ $CD4^+$ T Granzyme em tumores não injetados após tratamento com PBS, MVAΔC7L, MVAΔC7L-hFlt3L, MVAΔC7L-hFlt3L-muOX40L ou Heat-iMVAΔC7L-hFlt3L. **A FIG. 9B:** Gráfico dos números absolutos de células $CD4^+$ T por grama de tumores não injetados distantes. Dados são médias±SEM (n=4 ou 5). (**P*<0.05; ***P*<0.01; *teste t*). **A FIG. 9C.** Gráfico dos números absolutos de células Granzyme B^+CD4^+ T por grama de tumores não injetados distantes. Dados são médias±SEM (n=4 ou 5). (**P*<0.05; ***P*<0.01; *teste t*).

[0161] As FIGS. 10A e **10B** são blots ELISPOT representativos e um gráfico que mostra que a injeção IT de MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-muOX40L gerou respostas de células $CD8^+$ T antitumorais mais fortes nos baços em comparação com MVAΔC7L, MVAΔC7L-hFlt3L, ou MVAΔC7L-hFlt3L inativado por calor. Camundongos com B16-F10 foram tratados com injeção IT de MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-muOX40L, MVAΔC7L, MVAΔC7L-hFlt3L a $2x10^7$ pfu, ou MVAΔC7L-hFlt3L inativado por calor hFlt3L duas vezes, com três dias de intervalo. Os baços foram coletados 2 dias após a segunda injeção. O ensaio ELISPOT foi realizado por co-cultura de células B16-F10 irradiadas (150.000) e células $CD8^+$ T purificadas (300.000) em uma placa de 96 cavidades. **A FIG. 10A:** Imagem de ELISPOT de amostras triplicadas da esquerda para a direita.

A FIG. 10B: Gráfico de pontos de IFN-γ^+ por 300.000 células $CD8^+$ T purificadas. Cada barra representa a amostra do baço de um camundongo individual (n=5).

[0162] As FIGS. 11A-11G são representações gráficas de dados que mostram a combinação de IT MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-muOX40L e anticorpo de bloqueio de ponto de verificação imunológico de administração sistêmica anti-CTLA-4 ou anti-PD-L1 retarda o crescimento do tumor e prolonga a sobrevivência em modelo de implantação tumoral bilateral de melanoma B16-F10 murino. **A FIG. 11A** é um esquema de implantação de tumor e tratamento para um modelo de implantação de tumor bilateral B16-F10. Resumidamente, células de melanoma B16-F10 foram implantadas intradermicamente nos flancos esquerdo e direito de camundongos C57B/6J ($5x10^5$ no flanco direito e $1x10^5$ no flanco esquerdo). Nove dias após a implantação do tumor, as injeções intratumorais ($2x10^7$ pfu) de MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)mOX40L foram realizadas duas vezes por semana para os tumores maiores no flanco direito. O anticorpo anti-CTLA-4 ou anti-PD-L1 a 250 µg por camundongo foi administrado por via intraperitoneal. Os tamanhos dos tumores foram medidos e a sobrevivência dos camundongos foi monitorada. **As FIGS. 11B e 11C** são representações gráficas de dados mostrando volumes de injetados (**FIG. 11B**) e não injetados (**FIG. 11C**) tumores ao longo dos dias após PBS, MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L, MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L mais anticorpo anti-CTLA-4, MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L mais tratamentos com anticorpos anti-PD-L1. **As FIGS. 11D e 11E** são representações gráficas de dados mostrando volumes de injetados (**FIG. 11D**) e não injetados (**FIG. 11E**) tumores e no Dia 7 e Dia 11 após PBS, MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L, MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L mais anticorpo anti-CTLA-4, MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L mais tratamentos de anticorpo anti-PD-L1. **A FIG. 11F** é um gráfico da curva de sobrevivência Kaplan-Meier de camundongos com tumor tratados com PBS, MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L, MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L mais anticorpo anti-CTLA-4, MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L

mais tratamentos de anticorpo anti-PD-L1. (n=10, ** *P*<0,01; *** *P*<0,001; teste de Mantel-Cox). **A FIG. 11G** é uma tabela que mostra a sobrevivência média de camundongos tratados com PBS, MVA∆C7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L, MVA∆C7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L anticorpo anti-CTLA-4, MVA∆C7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L mais anticorpo anti-PD-L1.

[0163] A FIG. 12 são uma série de representações gráficas de dados que mostram curvas de crescimento de tumor em camundongos tratados em um modelo de tumor grande unilateral B16-F10. Resumidamente, as células de melanoma B16-F10 foram implantadas por via intradérmica para o flanco direito da C57B/6J ($5x10^5$ células). Onze dias após a implantação, os vírus foram injetados intratumoralmente duas vezes por semana, e os anticorpos anti-CTLA-4 ou anti-PD-L1 foram injetados duas vezes por semana por via intraperitoneal.

[0164] As FIGS. 13A e 13B são diagramas esquemáticos de recombinação homóloga em duas etapas para gerar MVA∆C7L-hFlt3L-TK(-)-huOX40L. **A FIG. 13A:** Primeira etapa: recombinação homóloga entre o vetor DNA pUC57 de plasmídeo e o DNA genômico viral MVA no gene C6 e C8 que flanqueia o locus C7 para inserir hFlt3L e cassete de expressão de GFP no locus C7 (substituindo o gene C7). O gene Flt3L humano está sob o controle do promotor sintético inicial e tardio de vaccinia (PsE/L). GFP está sob o controle do promotor vaccinia P7.5. **A FIG. 13B:** Segunda etapa: recombinação homóloga entre DNA de plasmídeo pUC57∆TK-hOX40L-mCherry e DNA genômico viral MVA MC7L-hFlt3L nos loci J1R e J3R (TK-R e TK-L) flanqueando o gene J2R (TK) para inserir huOX40L e mCherry cassete de expressão no locus do gene TK (J2R). O gene OX40L humano está sob o controle do promotor sintético precoce e tardio da vaccinia (PsE/L). mCherry está sob o controle do promotor vaccinia P7.5. **A FIG. 13C.** Verificação por PCR de três clones independentes de MVA∆C7L-hFlt3L-TK(-)-huOX40L, recombinante, que contém o gene hOX40L e a inserção do gene hFlt3L, mas

não possui o gene TK (J2R). H1, h2 e H3 são MVA recombinantes individuais. "+": Controle positivo para a reação de PCR.

[0165] As FIGS. 14A e **14B** são dois gráficos que mostram um crescimento em várias etapas do MVA parental e vírus recombinantes, incluindo MVA∆C7L-hFlt3L, MVA∆C7L-hFlt3L-TK(-)-muOX40L, MVA∆C7L-hFlt3L-TK(-)-hOX40L em fibroblastos primários de embrião de galinha (CEFs). **A FIG. 14A** é uma curva de crescimento de várias etapas desses vírus em CEFs. Resumidamente, os CEFs foram infectados com os vírus mencionados acima a um MOI de 0,05. As células foram coletadas em 1, 24, 48 e 72 h. Os títulos virais foram determinados em células BHK21 por diluição em série e contagem de foco GFP^+sob microscópio confocal. **A FIG. 14B** mostram o log (alteração de vezes) dos títulos virais 72h após a infecção ao longo de 1h após a infecção.

[0166] As FIGS. 15A e **15B** são uma série de gráficos de pontos representativos de dados FACS mostrando a expressão de hOX40L em células BHK21 e células dendríticas derivadas de monócitos humanos (mo-DCs) infectadas pelo vírus MVA∆C7L-hFlt3L-TK(-)-hOX40L. **A FIG. 15A:** As células BHK21 foram falsamente infectadas ou infectadas com MVA∆C7L-hFlt3L ou com MVA∆C7L-hFlt3L-TK(-)-hOX40L a um MOI de 10. As células foram coletadas 24 horas após a infecção e coradas com anticorpo anti-hOX40L conjugado com PE antes das análises FACS. **A FIG. 15B:** moDCs humanos foram tratados com poli I: C a 10 µg/mL ou infectados com Heat-iMVA, MVA∆C7L-TK (-) ou MVA∆C7L-hFlt3L-TK(-)-hOX40L em MOI de 1 24 horas após a infecção, as células foram coletadas e coradas com anticorpo anti-hOX40L conjugado com PE antes das análises FACS. Células de melanoma B16-F10 murino não tratadas foram usadas como um controle negativo.

[0167] As FIGS. 16A e **16B** são uma série de representações gráficas de dados mostrando os níveis de mRNA de hOX40L em MVA∆C7L-hFlt3L-TK(-)-hOX40L-infectado BHK21(**FIG. 16A**) e células B16-F10 (**FIG. 16B)**. As células BHK21 ou B16-F10 foram infectadas com MVA ou MVA∆C7L-

hFlt3L-TK(-)-hOX40L a um MOI de 10. Às 8 e 16 horas após a infecção, as células foram coletadas e os RNAs foram extraídos. Análises quantitativas de RT-PCR foram realizadas para examinar a expressão do gene E3L viral e do gene hOX40L.

[0168] A FIG. 17 é um diagrama esquemático que mostra o fluxo de trabalho de construção de plasmídeos de expressão do gene viral precoce do vírus vaccinia. 72 genes virais iniciais foram selecionados. A PCR foi realizada para amplificar o gene de interesse do genoma do vírus vaccinia. Os adaptadores foram adicionados a ambas as extremidades dos produtos de PCR por uma segunda rodada de PCR. Em seguida, os fragmentos de DNA foram clonados em pDONR^{TM}/ZEO, e em seguida, em pcDNA^{TM}3.2-DEST, um vetor de expressão de mamífero. Os construtos de DNA foram posteriormente verificados por sequenciamento. Os DNAs de plasmídeo foram então usados para transfectar em células HEK-293T, juntamente com outros plasmídeos, que serão descritos abaixo.

[0169] A FIG. 18 mostra a estratégia de varredura de luciferase dupla. Em células HEK293T, plasmídeos de expressão de cGAS e STING foram co-transfectados com plasmídeo de luciferase IFN-β e pRL-TK. Plasmídeos de expressão de genes virais ou vetores foram transfectados juntos. Após 24 h, o sinal da luciferase foi medido. A atividade da luciferase relativa foi expressa como unidades arbitrárias normalizando a atividade da luciferase do pirilampo para a atividade da luciferase do Renilla.

[0170] As FIGS. 19A-19C mostram os resultados de varredura de luciferase dupla de ORFs de vírus vaccinia que inibem a atividade de IFNβ-luc dependente de cGAS/STING. **As FIGS. 19A-19C.** As células HEK293T foram transfectadas com plasmídeos que expressam repórter IFNβ-luc, cGAS murino, STING humano e ORFs de vírus vaccinia como indicado. Os ensaios de luciferase dupla foram realizados 24 horas após a transfecção. O gene E1A do adenovírus foi usado como controle positivo.

[0171] As FIGS. 20A-20E. O vírus vaccinia B18, E5, K7, C11 e B14 inibe a atividade do promotor IFNβ induzida por cGAS/STING. As células HEK293T foram transfectadas com IFNB luciferase repórter, cGAS, STING e plasmídeos de expressão como indicado, e a atividade da luciferase foi testada 24h após a transfecção. **A FIG. 20A:** O cGAS de camundongo foi co-transfectado com plasmídeos de expressão. **A FIG. 20B:** O cGAS humano foi co-transfectado com plasmídeos de expressão. **A FIG. 20C.** O cGAS de camundongo foi co-transfectado com ORFs de vaccinia marcados com FLAG de K7R, E5R, B14R, C11R e B18R. **As FIGS. 20D e 20E** são gráficos que mostram a indução de IFNB em células que superexpressam E5, B14, K7 ou B18 por infecção por calor-iMVA (**FIG. 20D**) ou tratamento ISD (**FIG. 20E**).

[0172] A FIG. 21 mostram os resultados adicionais de varredura de luciferase dupla de ORFs de vírus vaccinia que inibem a atividade de IFNβ-luc dependente de cGAS/STING. As células HEK293T foram transfectadas com plasmídeos que expressam repórter IFNβ-luc, cGAS murino, STING humano e ORFs de vírus vaccinia como indicado. Os ensaios de luciferase dupla foram realizados 24 horas após a transfecção. O gene E1A do adenovírus foi usado como controle positivo.

[0173] A FIG. 22 mostra a sequência do genoma MVA conforme estabelecido na SEQ ID NO: 1, e dado pelo GenBank No. de Acesso U94848.1.

[0174] A FIG. 23 mostra a sequência do genoma do vírus vaccinia (cepa Western Reserve; WR) conforme estabelecido na SEQ ID NO: 2, e dado pelo GenBank No. de Acesso AY243312.1.

[0175] A FIG. 24A e **24B** são dois gráficos que mostram um crescimento em várias etapas da vacina e dos vírus recombinantes, incluindo E3LΔ83N-TK$^-$-hFlt3L-anti-muCTLA-4, E3LΔ83N-TK$^-$-hFlt3L-anti-muCTLA-4/C7L$^-$-mOX40L, e VAC-TK$^-$-anti-muCTLA-4/C7L$^-$-mOX40L em células de melanoma B16-F10 murino. **A FIG. 24A** é um crescimento em várias etapas desses vírus em células B16-F10. Resumidamente, as células B16-F10 foram

infectadas com os vírus mencionados acima a um MOI de 0,1. As células foram coletadas em 1, 24, 48 e 72h após a infecção e os rendimentos virais (log pfu) foram determinados por titulação em células BSC40. Os rendimentos virais foram plotados contra horas após a infecção. **A FIG. 24B** mostra o log (alteração de vezes) dos títulos virais 72h após a infecção ao longo de 1h após a infecção.

[0176] A FIG. 25 mostra uma análise de Western blot de anticorpo anti-mCTLA-4, OX40L murino e expressão de Flt3L humano em E3LΔ83N-TK$^-$-hFlt3L-anti-muCTLA-4 ou E3LΔ83N-TK$^-$-hFlt3L-anti-muCTLA-4/C7L$^-$-mOX40L células de melanoma B16-F10 de murino infectadas com vírus. As células B16-F10 foram infectadas ou falsamente infectadas com vírus E3LΔ83N-TK$^-$-hFlt3L-anti-muCTLA-4 ou E3LΔ83N-TK$^-$-hFlt3L-anti-muCTLA-4/C7L$^-$-mOX40L em um MOI de 10. Os lisados de células foram coletados às 7, 24 e 48h após a infecção, e os polipeptídeos nos lisados celulares foram separados utilizando SDS-PAGE a 10%. IgG anti-camundongo conjugado com HRP (cadeia pesada e leve), anticorpo anti-mOX40L e anticorpo Flt3L anti-humano foram usados para detectar o anticorpo anti-mCTLA-4, OX40L murino e proteína Flt3L humana, respectivamente.

[0177] A FIG. 26 mostra a expressão de superfície da proteína OX40L murino em vírus E3LΔ83N-TK$^-$-hFlt3L-anti-muCTLA-4/C7L$^-$-mOX40L ou VAC-TK$^-$-anti-mCTLA-4/C7L$^-$-mOX40L infectado com células de melanoma B16- F10 murino. Resumidamente, as células B16-F10 foram infectadas ou falsamente infectadas com vírus E3LΔ83N-TK$^-$-vetor, E3LΔ83N-TK$^-$-hFlt3L-anti-muCTLA-4/C7L$^-$-vetor, E3LΔ83N-TK$^-$-hFlt3L-anti-muCTLA-4/C7L$^-$-mOX40L, ou VAC-TK$^-$-anti-mCTLA-4/C7L$^-$-mOX40L em um MOI de 5. As células foram coletadas 24 horas após a infecção e coradas com anticorpo anti-mOX40L conjugado com PE e analisadas por FACS. Os dados foram analisados com software FlowJo (*FlowJo, Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ*).

[0178] A FIG. 27 mostra um esquema de implantação de tumor e tratamento para um modelo de implantação de tumor unilateral de melanoma

murino B16-F10. Resumidamente, $5x10^5$ células de melanoma B16-F10 foram implantadas por via intradérmica para o flanco direito de camundongos C57B/6J. Nove dias após a implantação do tumor, $4x10^7$ pfu de MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)mOX40L foram injetados intratumoralmente duas vezes por semana. O anticorpo anti-PD-L1 a 250 µg por camundongo foi administrado por via intraperitoneal. Os tamanhos dos tumores foram medidos e a sobrevivência dos camundongos foi monitorada.

[0179] As FIGS. 28A-28C são representações gráficas de dados mostrando volumes de tumores ao longo dos dias após tratamentos com PBS (**FIG. 28A**), MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L (**FIG. 28B**), ou MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L mais anticorpo anti-PD-L1 (**FIG. 28C**).

[0180] As FIGS. 29A e 29B demonstram estudos de sobrevivência de camundongos tratados com PBS, MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L, ou MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L mais anticorpo anti-PD-L1. **A FIG. 29A** é um gráfico da curva de sobrevivência Kaplan-Meier de camundongos com tumor tratados com PBS, MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L, ou MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L mais tratamentos com anticorpo anti-PD-L1. (n=5 ~ 10, ** *P* <0,01; *** *P* <0,001; teste de Mantel-Cox). **A FIG. 29B** é uma tabela que mostra a sobrevivência média de camundongos tratados com PBS, MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L, MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L mais anticorpo anti-PD-L1.

[0181] A FIG. 30 mostra um esquema de implantação de tumor e tratamento para um modelo de implantação de tumor unilateral de MC38. Resumidamente, $5x10^5$ células de melanoma MC38 foram implantadas por via intradérmica para o flanco direito de camundongos C57B/6J. Nove dias após a implantação do tumor, $4x10^7$ pfu de MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)mOX40L foram injetados intratumoralmente duas vezes por semana. O anticorpo anti-PD-L1 a 250 µg por camundongo foi administrado por via intraperitoneal. Os tamanhos dos tumores foram medidos e a sobrevivência dos camundongos foi monitorada.

[0182] As FIGS. 31A-31C são representações gráficas de dados mostrando volumes de tumores ao longo dos dias após tratamentos com PBS (**FIG. 31A**), MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L (**FIG. 31B**), ou MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L mais anticorpo anti-PD-L1 (**FIG. 31C**).

[0183] As FIGS. 32A e 32B demonstram estudos de sobrevivência de camundongos tratados com PBS, MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L, ou MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L mais anticorpo anti-PD-L1. **A FIG. 32A** é um gráfico da curva de sobrevivência Kaplan-Meier de camundongos com tumor tratados com PBS, MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L, ou MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L mais tratamentos com anticorpo anti-PD-L1. (n=4 ~ 8, ** *P* <0,01; *** *P* <0,001; teste de Mantel-Cox). **A FIG. 32B** é uma tabela que mostra a sobrevivência média de camundongos tratados com PBS, MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L, ou MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L mais anticorpo anti-PD-L1.

[0184] A FIG. 33 mostra um esquema de implantação de tumor e tratamento para um modelo de implantação de tumor unilateral de MB49. Resumidamente, $2,5x10^5$ células de melanoma MB49 foram implantadas por via intradérmica para o flanco direito de camundongos C57B/6J. Oito dias após a implantação do tumor, $4x10^7$ pfu de MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)mOX40L foram injetados intratumoralmente duas vezes por semana. O anticorpo anti-PD-L1 a 250 μg por camundongo foi administrado por via intraperitoneal. Os tamanhos dos tumores foram medidos e a sobrevivência dos camundongos foi monitorada.

[0185] As FIGS. 34A-34D são representações gráficas de dados mostrando volumes de tumores ao longo dos dias após tratamentos com PBS (**FIG. 34A**), MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L (**FIG. 34B**), ou MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L mais anticorpo anti-PD-L1 (**FIG. 34V**), ou anticorpo anti-PD-L1 (**FIG. 34D**).

[0186] As FIGS. 35A e 35B demonstram estudos de sobrevivência de camundongos tratados com PBS, MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L, MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L mais anticorpo anti-PD-L1 ou tratamentos

com anticorpo anti-PD-L1. **A FIG. 35A** é um gráfico da curva de sobrevivência Kaplan-Meier de camundongos com tumor tratados com PBS, MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L mais anticorpo anti-PD-L1 ou tratamentos com anticorpo anti-PD-L1. (n=10, * *P* <0,05, ** *P* <0,01; *** *P* <0,001; teste de Mantel-Cox). **A FIG. 35B** é uma tabela que mostra a sobrevivência média de camundongos tratados com PBS, MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L, MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L mais anticorpo anti-PD-L1, ou tratamentos com anticorpo anti-PD-L1.

[0187] A FIG. 36 mostra um gráfico representativo de tumores isolados a partir de uma fêmea de camundongo MMTV-PyVmT. Resumidamente, os camundongos foram tratados com injeção IT de PBS, $4x10^7$ pfu de MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L duas vezes por semana após o desenvolvimento de tumores mamários palpáveis com uma latência média de 92 dias de idade. O anticorpo anti-PD-L1 a 250 µg por camundongo foi administrado por via intraperitoneal duas vezes por semana. Os tamanhos dos tumores foram medidos e a sobrevivência dos camundongos foi monitorada.

[0188] A FIG. 37 são representações gráficas de dados que mostram volumes de tumores ao longo dos dias após tratamentos com PBS, MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L, ou MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L mais anticorpos anti-PD-L1. (P0–PBS; V1–MVAΔC7L-hFlt3L-muOX40L; C1, C2, C3–MVAΔC7L-hFlt3L-muOX40L + anti-PD-L1).

[0189] A FIG. 38 mostra gráficos de pontos representativos de células $CD8^+$ e $CD4^+$ T em tumores injetados e não injetados após o tratamento com PBS, MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-muOX40L, ou MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-muOX40L mais anticorpo anti-PD-L1.

[0190] A FIG. 39 mostra gráficos de pontos representativos de células $CD8^+CD69^+CD103^+$ T em tumores injetados e não injetados após o tratamento com PBS, MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-muOX40L, ou MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-muOX40L mais anticorpo anti-PD-L1.

[0191] A FIG. 40 mostra gráficos de pontos representativos de células $CD4^+CD69^+CD103^+$ T em tumores injetados e não injetados após o tratamento com PBS, MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-muOX40L, ou MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-muOX40L mais anticorpo anti-PD-L1.

[0192] As FIGS. 41A e 41B são gráficos de FACS representativos que mostram a expressão de hFlt3L (**FIG. 41A**) ou mOX40L (**FIG. 41B**) por linhas de células estáveis B16-F10-hFlt3L ou B16-F10-mOX40L.

[0193] A FIG. 42 é um esquema de implantação de tumor e tratamento para um modelo de implantação de tumor bilateral B16-F10. Resumidamente, $5x10^5$ células de melanoma B16-F10 foram implantadas intradermicamente nos flancos direitos de camundongos C57B/6J e $5x10^5$ células de melanoma B16-F10-hFlt3L foram implantadas intradermicamente nos flancos esquerdos de camundongos C57B/6J. Nove dias após a implantação do tumor, PBS ou $4x10^7$ pfu de MVAΔC7L foram injetados intratumoralmente duas vezes por semana nos tumores em ambos os flancos. Os tumores foram coletados 2 dias após a segunda injeção e os linfócitos infiltrantes do tumor (TILs) foram analisados por FACS.

[0194] As FIGS. 43A-43D são representações gráficas de dados que mostram volumes de tumores em ambos os flancos direito ou esquerdo de camundongos C57B/6J ao longo dos dias após tratamentos com PBS ou MVAΔC7L.

[0195] As FIGS. 44A-44E são gráficos da porcentagem de infiltração de tumor em $CD8^+$ (**FIG. 44A**), $CD8^+GranzymeB^+$ (**FIG. 44B**), $CD4^+$ (**FIG. 44C**), $CD4^+GranzymeB^+$ (**FIG. 44D**), e $CD4^+FoxP3^+$ (**FIG. 44E**) Células T após tratamentos com PBS ou MVAΔC7L. (n=5, * *P* <0,05; ** *P* <0,01; *** *P* <0,001, **** *P* <0,0001; ANOVA unilateral).

[0196] As FIGS. 45A-45E são gráficos de números absolutos de tumor de infiltração em $CD8^+$ (**FIG. 45A**), $CD8^+GranzymeB^+$ (**FIG. 45B**), $CD4^+$ (**FIG. 45C**), $CD4^+GranzymeB^+$ (**FIG. 45D**), $CD4^+FoxP3^+$ (**FIG. 45E**) Células T

por grama de tumores após tratamentos com PBS e MVA∆C7L. (n=5, * *P* <0,05; ** *P* <0,01; *** *P* <0,001, **** *P* <0,0001; ANOVA unilateral).

[0197] A FIG. 46 é um esquema de implantação de tumor e tratamento para um modelo de implantação de tumor bilateral B16-F10. Resumidamente, $5x10^5$ células de melanoma B16-F10 foram implantadas intradermicamente nos flancos direitos de camundongos C57B/6J e $5x10^5$ células de melanoma B16-F10-OX40L foram implantadas intradermicamente nos flancos esquerdos de camundongos C57B/6J. Nove dias após a implantação do tumor, PBS ou $4x10^7$ pfu de MVA∆C7L foram injetados intratumoralmente duas vezes por semana nos tumores em ambos os flancos. Os tumores foram coletados 2 dias após a segunda injeção e os linfócitos infiltrantes do tumor (TILs) foram analisados por FACS.

[0198] As FIGS. 47A-47D são representações gráficas de dados que mostram volumes de tumores em ambos os flancos direito ou esquerdo de camundongos C57B/6J ao longo dos dias após tratamentos com PBS ou MVA∆C7L.

[0199] As FIGS. 48A-48E são gráficos da porcentagem de infiltração de tumor em $CD8^+$ (**FIG. 48A**), $CD8^+GranzymeB^+$ (**FIG. 48B**), $CD4^+$ (**FIG. 48C**), $CD4^+GranzymeB^+$ (**FIG. 48D**), $CD4^+FoxP3^+$ (**FIG. 48E**) Células T após tratamentos com PBS ou MVA∆C7L. (n=5, * *P* <0,05; ** *P* <0,01; *** *P* <0,001, **** *P* <0,0001; ANOVA unilateral).

[0200] As FIGS. 49A-49E são gráficos de números absolutos de tumor de infiltração em $CD8^+$ (**FIG. 49A**), $CD8^+GranzymeB^+$ (**FIG. 49B**), $CD4^+$ (**FIG. 49C**), $CD4^+GranzymeB^+$ (**FIG. 49D**), $CD4^+FoxP3^+$ (**FIG. 49E**) Células T por grama de tumores após tratamentos com PBS e MVA∆C7L. (n=5, * *P* <0,05; ** *P* <0,01; *** *P* <0,001, **** *P* <0,0001; ANOVA unilateral).

[0201] As FIGS. 50A e 50B mostram o mecanismo de ação do FTY720 e sua estrutura química. **A FIG. 50A** é adaptado a partir de um desenho em Gong *et al. Front. Immunol.* (2014), as células T nativas circulam entre os órgãos linfóides e o sangue. Após a infecção ou implantação do tumor,

as células apresentadoras de antígeno apresentam antígeno para as células T cognatas, que então se proliferam e se diferenciam em células T efetoras e células T de memória. As células T efetoras são recrutadas para o local da infecção ou tumores e células T de memória recirculam. FTY720 (**FIG. 50B**), um modulador do receptor de esfingosina-1-fosfato, bloqueia a saída de linfócitos dos órgãos linfoides.

[0202] A FIG. 51 é um esquema de implantação de tumor e tratamento para um modelo de implantação de tumor unilateral B16-F10. Resumidamente,$5x10^5$ células de melanoma B16-F10 foram implantadas por via intradérmica para o flanco direito de camundongos C57B/6J. Nove dias após a implantação do tumor, PBS ou $4x10^7$ pfu de MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-muOX40L foram injetados intratumoralmente duas vezes. FTY720 a 25 µg por camundongo foi administrado por via intraperitoneal diariamente durante o tratamento, começando 1 dia antes da primeira injeção de MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-muOX40L. Os tamanhos dos tumores foram medidos e a sobrevivência dos camundongos foi monitorada.

[0203] As FIGS. 52A-52D são representações gráficas de dados mostrando volumes de tumores em camundongos C57B/6J ao longo dos dias após tratamentos com PBS ou MVAΔC7L com ou sem tratamento com FTY720.

[0204] As FIGS. 53A e 53B são representações gráficas de dados mostrando volumes de tumores em camundongos C57B/6J ao longo dos dias após tratamentos com PBS ou MVAΔC7L com ou sem tratamento com FTY720.

[0205] As FIGS. 53C e 53D são gráficos da curva de sobrevivência de Kaplan-Meier de camundongos com tumor tratados com PBS ou MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L com ou sem FTY720 (n=5 ~ 10, ** *P* <0,01; *** *P* <0,001; teste de Mantel-Cox).

[0206] As FIGS. 54A e 54B mostram organização de domínio e conservação de sequência de vaccinia E5 entre a família de poxvírus. **A FIG.**

54A é um diagrama esquemático de vaccinia E5. E5 é a proteína 328-aa, que é composta por um domínio N-terminal seguido por dois domínios BEN. BEN é nomeado após sua presença em BANP/SMAR1, poxvírus E5R e NAC1. As proteínas contendo o domínio BEN estão envolvidas na organização da cromatina, na regulação da transcrição e, possivelmente, na organização do DNA viral. **A FIG. 54B** é um diagrama esquemático que demonstra que o vaccinia E5 é altamente conservado na família dos poxvírus.

[0207] As FIGS. 55A- 55C mostram que VACVΔE5R é altamente atenuado em um modelo de infecção intranasal. **A FIG. 55A** mostra um esquema para gerar vírus VACVΔE5R por meio de de recombinação homóloga nos loci E4L e E6R que flanqueiam o gene E5R do genoma de vaccinia. **A FIG. 55B** mostra a perda de peso ao longo dos dias após a infecção intranasal com WT VACV ($2x10^6$ pfu), VACVΔE5R ($2x10^6$ pfu) ou VACVΔE5R ($2x10^7$ pfu). **A FIG. 55C** mostra curvas de sobrevivência Kaplan-Meier de camundongos infectados com WT VACV ($2x10^6$ pfu) ou VACVΔE5R ($2x10^6$ pfu ou $2x10^7$ pfu).

[0208] As FIGS. 56A e 56B demonstra que a infecção com VACVΔE5R de BMDCs induz a expressão do gene *IFNB* e secreção de proteínas IFN-β. **A FIG. 56A** mostra resultados de RT-PCR de BMDCs que foram infectados com MVA, VACV ou VACVΔE5R em um MOI de 10. As células foram coletadas 8h após a infecção. RNAs foram extraídos e RT-PCRs foram realizados. **A FIG. 56B** mostra que os BMDCs foram infectados com MVA, VACV ou VACVΔE5R a um MOI de 10. Os sobrenadantes foram coletados 21 horas após a infecção. Os níveis de proteína IFN-β foram determinados por ELISA.

[0209] As FIGS. 57A-57D mostram a indução do gene *IFNB* por MVAΔE5R e MVAΔK7R em BMDCs e BMDMs. **A FIG. 57A** mostra um esquema para gerar vírus MVAΔE5R por meio de de recombinação homóloga nos loci E4L e E6R flanqueando o gene E5R do genoma MVA. **A FIG. 57B** mostra um esquema para gerar vírus MVAΔK7R por meio de de recombinação homóloga nos loci K5,6L e F1L flanqueando o gene K7R do genoma MVA. **A**

FIG. 57C mostram que os BMDCs foram infectados com MVA, MVAΔE5R ou MVAΔK7R em MOI de 10. As células foram coletadas 6h após a infecção. *A* expressão do gene IFNB foi medida por RT-PCR. **A FIG. 57D** mostra que os BMDMs foram infectados com MVA, MVAΔE5R ou MVAΔK7R em MOI de 10. As células foram coletadas 6h após a infecção. *A* expressão do gene IFNB foi medida por RT-PCR.

[0210] As FIGS. 58A-58C mostram que os BMDCs foram infectados com MVA ou MVAΔE5R em um MOI de 10. As células foram coletadas 6h após a infecção. IFNA (**FIG. 58A**), CCL4 (**FIG. 58B**), e CCL5 (**FIG. 58C**) as expressões de gene foram determinadas por RT-PCR quantitativo.

[0211] As FIGS. 59A-59C mostram que a infecção por MVAΔE5R de BMDCs induz níveis elevados de IFNB e expressão do gene E3R viral e secreção de proteína IFN-β a partir de BMDCs. **A FIG. 59A e 59B** mostram análises de PCR quantitativo em tempo real (RT-PCR) de IFNB (**FIG. 59A**) e E3R viral (**FIG. 59B**) expressão do gene induzida por MVAΔE5R ou MVAΔE5R inativado por calor ("aquecido-iMVAΔE5R"). Os BMDCs foram gerados por cultura de células da medula óssea na presença de mGM-CSF. As células foram infectadas com vírus MVAΔE5R ou aquecido-iMVAΔE5R em MOIs de 0,25, 1, 3 ou 10. As células foram lavadas após 1h de infecção e meio fresco foi adicionado. As células foram coletadas 14h após a infecção. As expressões dos genes IFNB e E3 foram determinadas por RT-PCR. **A FIG.** 59C **BMDCs** foram infectados com vírus MVAΔE5R ou aquecido-iMVAΔE5R a MOIs de 0,25, 1, 3 ou 10. Os sobrenadantes foram coletados 14 horas após a infecção. As concentrações de IFN-β nos sobrenadantes foram medidas por ELISA.

[0212] As FIGS. 60A-60D mostram que a expressão do gene IFNB induzida por MVAΔE5R e a secreção de IFN-β eram dependentes de cGAS. **A FIG. 60A** mostra a indução de IFNA por MVAΔE5R em WT e $cGAS^{-/-}$ BMDCs. **A FIG. 60B** mostra a indução de IFNA por MVAΔE5R em WT e $cGAS^{-/-}$ BMDCs. **A FIG. 60C** mostra a expressão do gene E3R da vaccinia em WT e $cGAS^{-/-}$ BMDCs infectados com MVARE5R. Os BMDCs foram infectados com

MVA ou MVAΔE5R a um MOI de 10. As células foram coletadas 6h após a infecção. Os RNAs foram extraídos. Foi realizada análise de PCR quantitativa em tempo real. **A FIG. 60D** mostra que MVAΔE5R induz níveis mais elevados de secreção de proteína IFN-β em comparação com Heat-iMVA ou Heat-iMVAΔE5R, e a indução é completamente dependente de cGAS. WT ou $cGAS^{-/-}$ BMDCs foram infectados com MVA, MVAΔE5R em um MOI de 10, Heat-iMVA ou Heat-iMVAΔE5R em um equivalente de MOI. Os sobrenadantes foram coletados 8 e 16h após a infecção. Os níveis de proteína IFN-β nos sobrenadantes foram medidos por ELISA.

[0213] As FIGS. 61A e 61B mostram a expressão do gene IFNB induzida por MVAΔE5R e a secreção de proteínas a partir de BMDCs é dependente de STING. **A FIG. 61 A** mostram BMDCs a partir de camundongos WT ou $STING^{Gt/Gt}$ foram infectados com MVA, MVAΔE5R ou Heat-iMVAΔE5R. As células foram coletadas 8h após a infecção e a análise de RT-PCR foi realizada. A indução dobrada da expressão do gene IFNB é mostrada. **A FIG. 61B** mostra que macrófagos derivados da medula óssea (BMDMs) foram gerados por cultura de células da medula óssea de camundongos WT ou $STING^{Gt/Gt}$ na presença de M-CSF (fator de estimulação de colônia de macrófagos). Os BMDMs foram infectados com MVA, MVAΔE5R, Heat-iMVA ou Heat-iMVAΔE5R. Os sobrenadantes foram coletados 16h após a infecção e os níveis de proteína de IFN-β foram medidos por ELISA.

[0214] As FIGS. 62A-62D mostram que a secreção de proteína IFN-β induzida por MVAΔE5R requer IRF3, IRF7 e IFNAR. **A FIG. 62** mostra que WT ou $IRF3^{-/-}$ BMDCs foram infectadas com MVA, MVAΔE5R, Heat-iMVA, ou Heat-iMVAΔE5R. Os sobrenadantes foram coletados 8 e 16h após a infecção. Os níveis de IFN-β foram determinados por ELISA. **A FIG. 62B** mostra que WT ou $IRF3^{-/-}$ BMDMs foram infectados com MVA, MVAΔE5R, Heat-iMVA ou Heat-iMVAΔE5R. Os sobrenadantes foram coletados 8 e 16h após a infecção. Os níveis de IFN-β foram determinados por ELISA. **A FIG. 62C** mostra que WT ou $IRF7^{-/-}$ BMDCs foram infectados com MVAΔE5R em um MOI de 10. Os

sobrenadantes foram coletados 21 horas após a infecção. Os níveis de IFN-β nos sobrenadantes foram determinados por ELISA. **A FIG. 62D** mostra que WT, cGAS$^{-/-}$, ou IFNAR$^{-/-}$ BMDCs foram infectados com MVA, MVAΔE5R, Heat-iMVA ou Heat-IMVAΔE5R. Os sobrenadantes foram coletados 16 horas após a infecção. Os níveis de IFN-β foram determinados por ELISA.

[0215] As FIGS. 63A-63C demonstram que a degradação de cGAS induzida por WT VACV é mediada por uma via dependente de proteassoma. **A FIG. 63A** mostra que fibroblastos embrionários murinos foram pré-tratados com cicloheximida (CHX), um inibidor proteassomal, MG132, um inibidor de pan-caspase, Z-VAD ou um inibidor VIII de AKT1/2 por 30 min. MEFs foram então infectados com WT VACV na presença de cada medicamento. As células foram coletadas 6h após a infecção. A análise de Western blot foi realizada com anticorpos anti-cGAS e anti-GAPDH. **A FIG. 63B** mostra que os MEFs foram tratados com DMSO ou MG132. As células foram coletadas em 2, 4 e 6h após o tratamento. A análise de Western blot foi realizada com anticorpos anti-cGAS e anti-GAPDH. **A FIG. 63C** demonstra que a infecção por WT VACV de BMDCs resultou na degradação de cGAS, enquanto VACVΔE5R não. Na presença de MG132, a degradação de cGAS induzida por WT VACV foi bloqueada. Os BMDCs foram infectados com WT VACV ou VACV em MOI de 10 na presença ou ausência de MG132. As células foram coletadas em 2, 4 e 6h após a infecção. As análises de Western blot foram realizadas usando anticorpos anti-cGAS e anti-GAPDH.

[0216] A FIG. 64 demonstra que o gene E5R em MVA é importante na mediação da degradação de cGAS em BMDCs. Os BMDCs foram infectados com MVA ou MVAΔE5R a um MOI de 10. As células foram coletadas 2, 4, 6, 8 e 12 horas após a infecção. A análise de Western blot foi realizada usando anticorpos anti-cGAS e anti-GAPDH.

[0217] A FIG. 65 demonstra que MVAΔE5R induz níveis mais elevados de Stat2 fosforilado em comparação com MVA. Os BMDCs foram infectados com MVA ou MVAΔE5R a um MOI de 10. As células foram

coletadas 2, 4, 6, 8 e 12 horas após a infecção. A análise de Western blot foi realizada usando anticorpos anti-fosfo-STAT2, anti-STAT2 e anti-GAPDH.

[0218] A FIG. 66 mostra que MVAΔE5R induz níveis elevados de produção de cGAMP em BMDCs infectados. 2,5x10^6 BMDCs foram infectados com MVA ou MVAΔE5R a um MOI de 10. As células foram coletadas 2, 4, 6 e 8h após a infecção. As concentrações de cGAMP foram medidas incubando lisados de células com células THP1-Dual™ diferenciadas permeabilizadas, que foram derivadas a partir da linha de células de monócitos THP-1 humana por integração estável de duas construções repórter induzíveis. Os sobrenadantes foram coletados em 24 h, e as atividades da luciferase (como uma indicação para a ativação da via de IRF) foram medidas. Os níveis de cGAMP foram calculados por comparação com os padrões de cGAMP.

[0219] As FIGS. 67A e 67B mostram que MVAΔE5R induz secreção da proteína IFN-β de células dendríticas plasmocitóides. **A FIG. 67 A** mostra 1,2x10^5 pDCs (B220$^+$PDCA-1$^+$) separados de esplenócitos foram infectados com MVA, Heat-iMVA ou MVAΔE5R. Esplenócitos não infectados foram incluídos como controle. Os sobrenadantes foram coletados 18 horas após a infecção. Os níveis de IFN-β nos sobrenadantes foram medidos por ELISA. **FIG.67B** mostra 4x10^5 pDCs (B220$^+$PDCA-1$^+$) separados a partir de Flt3L-BMDCs foram infectados com MVA, Heat-iMVA ou MVAΔE5R. Os pDCs separados não infectados foram incluídos como um controle. Os sobrenadantes foram coletados 18 horas após a infecção. Os níveis de IFN-β nos sobrenadantes foram medidos por ELISA.

[0220] A FIG. 68 mostra que a secreção de IFN-β induzida por MVAΔE5R a partir de pDCs é dependente de cGAS. Os pDCs foram separados a partir de BMDCs cultivados com Flt3L (B220$^+$PDCA-1$^+$) obtidos a partir de camundongos WT, cGAS$^{-/-}$, ou MyD88$^{-/-/-}$. 2x10^5 células foram infectadas com MVA ou MVAΔE5R. O controle NT foi incluído. Os sobrenadantes foram coletados 18 horas após a infecção. Os níveis de IFN-β nos sobrenadantes foram medidos por ELISA.

[0221] A FIG. 69 mostra que a infecção por MVAΔE5R induz a secreção de proteína IFN-β a partir de $CD103^+$ DCs por meio de de uma via dependente de cGAS. Os $CD103^+$ DCs foram separados a partir de BMDCs cultivados com Flt3L ($CD11c^+CD103^+$) obtidos a partir de camundongos WT, $cGAS^{-/-}$, ou $MyD88^{-/-/-}$. $2x10^5$ células foram infectadas com MVA ou MVAΔE5R. O controle NT foi incluído. Os sobrenadantes foram coletados 18 horas após a infecção. Os níveis de IFN-β nos sobrenadantes foram medidos por ELISA.

[0222] A FIG. 70 mostra que a infecção por MVAΔE5R de BMDCs resulta em níveis mais baixos de morte de células em comparação com MVA. Os BMDCs foram infectados com MVA ou MVAΔE5R a um MOI de 10. As células foram coletadas 16h após a infecção e coradas com corante de viabilidade fixável LIVE/DEAD e submetidas a análise de citometria de fluxo.

[0223] As FIGS. 71A e 71B mostram que a infecção por MVAΔE5R promove a maturação de DC de uma maneira dependente de cGAS. BMDCs a partir de camundongos WT e $cGAS^{-/-}$ foram infectados com MVA-OVA ou MVAΔE5R-OVA em MOI de 10. As células foram coletadas 16h após a infecção e coradas para marcadores de maturação DC: CD40 (**FIG. 71A**) e CD86 (**FIG. 71B**).

[0224] As FIGS. 72A-72G mostra que a infecção por MVAΔE5R de BMDCs promove a apresentação cruzada de antígeno conforme medido pela ativação de células T. Os BMDCs foram infectados com MVA, MVAΔE5R, Heat-iMVA ou Heat-iMVAΔE5R em MOI de 3 por 3h e depois incubados com OVA por 3 h. OVA foi lavado e as células foram então incubadas com células OT-I (que reconhece o peptídeo $OVA_{257-264}$ SIINFEKL) durante 3 dias. As células OT-1 foram coradas com anticorpos anti-CD69 e anti-CD8 e analisadas por citometria de fluxo. Os sobrenadantes foram coletados e os níveis de IFN-γ foram determinados por ELISA. Os gráficos de pontos demonstram células CD8+ que expressam CD69.

[0225] A FIG. 73 mostra que a infecção por MVAΔE5R de BMDCs promove a apresentação cruzada de antígeno conforme medido pela produção

de IFN-γ por células T ativadas. Os BMDCs foram infectados com MVA, MVAΔE5R, Heat-iMVA ou Heat-iMVAΔE5R em MOI de 3 por 3h e depois incubados com OVA por 3 h. OVA foi lavado e as células foram então incubadas com células OT-I (que reconhece o peptídeo $OVA_{257-264}$ SIINFEKL) durante 3 dias. As células OT-1 foram coradas com anticorpos anti-CD69 e anti-CD8 e analisadas por citometria de fluxo. Os sobrenadantes foram coletados e os níveis de IFN-γ foram determinados por ELISA. **A FIG. 73** mostra os níveis de IFN-γ nos sobrenadantes da co-cultura de células BMDC:T.

[0226] A FIG. 74 mostra que a infecção por VACVΔE5R de BMDCs promove a apresentação cruzada de antígeno conforme medido pela produção de IFN-γ por células T ativadas. Os BMDCs foram infectados com MVA, MVAΔE5R ou VACVΔE5R em MOI de 3 por 3 h; ou BMDCs foram incubados com cGAMP ou controle simulado durante 3h. Os BMDCs foram subsequentemente incubados com OVA por 3h e, em seguida, o OVA foi lavado. As células foram então incubadas com células OT-I (que reconhecem o peptídeo $OVA_{257-264}$ SIINFEKL) por 3 dias. Os sobrenadantes foram coletados e os níveis de IFN-γ foram determinados por ELISA.

[0227] As FIGS. 75A-75C mostram que a deleção do gene E5R de MVA melhora a eficácia da vacinação. **A FIG. 75A** é um esquema de estratégia de vacinação. No dia 0, camundongos C57BL/6J foram vacinados com MVA-OVA ou MVAΔE5R-OVA a $2x10^7$ pfu por meio de escarificação da pele ou injeção intradérmica. Os baços foram coletados a partir de camundongos sacrificados uma semana depois e co-cultivados com o peptídeo $OVA_{257-264}$ (SIINFEKL) (10μg/mL) BMDCs pulsados por 12 h. Os níveis intracelulares de IFN-γ em células $CD8^+$ T foram então medidos por citometria de fluxo. (*p< 0,05,***p< 0,01). **A FIG. 75B** mostra células $CD8^+$ T ativadas após vacinação por meio de escarificação da pele com MVA-OVA ou MVAΔE5R-OVA. **A FIG. 75C** mostra células $CD8^+$ T ativadas após vacinação por meio de de injeção intradérmica de MVA-OVA ou MVAΔE5R-OVA.

[0228] As FIGS. 76A e 76B mostram que a infecção por MVA∆E5R induz a expressão do gene IFNB e a secreção de IFN-β de fibroblastos primários murinos de uma maneira dependente de cGAS. Fibroblastos dérmicos da pele foram gerados a partir de camundongos WT e cGAS$^{-/-}$ C57B/6J fêmeas. As células foram infectadas com MVA, MVA∆E5R, Heat-iMVA ou Heat-iMVA∆E5R. As células e os sobrenadantes foram coletados 16h após a infecção. **A FIG.76A** mostra os resultados de RT-PCR da expressão do gene IFNB em células de WT e cGAS$^{-/-}$ **A FIG. 76B** mostra os níveis de proteína IFN-β nos sobrenadantes de células WT e cGAS$^{-/-}$ infectadas, conforme medido por ELISA.

[0229] As FIGS. 77A-77D mostram que MVA∆E5R ganha sua capacidade de replicar seu DNA em fibroblastos dérmicos primários de pele deficientes em cGAS ou IFNAR1. Fibroblastos dérmicos primários de pele de camundongos WT, cGAS$^{-/-}$ou IFNAR1$^{-/-}$foram infectados com MVA ou MVA∆E5R em um MOI de 3. As células foram coletadas 1, 4, 10 e 24h após a infecção. Os números de cópias do DNA viral foram determinados por PCR quantitativo. **A FIG. 77A** mostra os números de cópias de DNA em fibroblastos dérmicos de pele de WT, cGAS$^{-/-}$ ou IFNAR1$^{-/-}$ infectados por MVA. **A FIG. 77B** mostra a alteração em comparação com os números de cópias de DNA 1h após a infecção com MVA. **A FIG. 77C** mostra os números de cópias de DNA em fibroblastos dérmicos de pele de WT, cGAS$^{-/-}$ ou IFNAR1$^{-/-}$ infectados por MVA∆E5R. **A FIG. 77D** mostra a alteração em comparação com os números de cópias de DNA 1h após a infecção com MVA∆E5R.

[0230] As FIGS. 78A-78D mostram que MVA∆E5R ganha sua capacidade de gerar vírus progênie infecciosa em fibroblastos dérmicos primários de pele deficientes em cGAS. Fibroblastos dérmicos primários de pele de camundongos WT, cGAS$^{-/-}$ou IFNAR1$^{-/-}$foram infectados com MVA ou MVA∆E5R em um MOI de 0,05. As células foram coletadas 1, 24, e 48h após a infecção. Os títulos virais foram determinados por titulação em células BHK21. **A FIG. 78A** mostra títulos de MVA ao longo do tempo após a infecção em

fibroblastos dérmicos de pele de WT, cGAS$^{-/-}$ ou IFNAR1$^{-/-}$. **A FIG. 78** mostra a alteração em comparação com os títulos virais em 1h após a infecção com MVA. **A FIG. 78C** mostra títulos de MVAΔE5R ao longo do tempo após a infecção em fibroblastos dérmicos de pele de WT, cGAS$^{-/-}$ ou IFNAR1$^{-/-}$. **A FIG. 78D** mostra a alteração em comparação com os títulos virais em 1h após a infecção com MVAΔE5R.

[0231] As FIGS. 79A e 79B mostram que a infecção por MVAΔE5R de células de melanoma murino induz a expressão do gene IFNB e a secreção da proteína IFN-β de uma maneira dependente de STING. **A FIG. 79A** mostra resultados de RT-PCR de indução de IFNB por MVAΔE5R em células de melanoma murino WT B16-F10 e células STING$^{-/-}$ B16-F10. As células WT e STING$^{-/-}$ B16-F10 foram infectadas com MVA ou MVAΔE5R a um MOI de 10. As células foram coletadas 18h após a infecção. Os RNAs foram extraídos e a análise quantitativa de PCR em tempo real foi realizada. **A FIG. 79B** mostra resultados de ELISA dos níveis de proteína de IFN-β nos sobrenadantes de células WT e STING$^{-/-}$ B16-F10 infectadas com MVA ou MVAΔE5R, coletadas em 18h após a infecção.

[0232] A FIG. 80 mostra que a infecção por MVAΔE5R de células de melanoma murino induz a liberação de ATP, que é uma marca registrada da morte de células imunogênicas. As células B16-F10 foram infectadas com vaccinia WT, MVA ou MVAΔE5R a um MOI de 10. Os sobrenadantes foram coletados 48 horas após a infecção. Os níveis de ATP foram determinados usando *ATPlite 1step Luminescence ATP Detection Assay System (PerkinElmer, Waltham, MA*).

[0233] A FIG. 81 mostra um esquema de geração de MVAΔE5R recombinante expressando hFlt3L e hOX40L por meio de de recombinação homóloga nos loci E4L e E6R do genoma de MVA. O vetor pUC57 é usado para inserir um único cassete de expressão projetado para expressar hFlt3L e hOX40L usando o promotor precoce e tardio sintético viral de vaccinia (PsE/L). A sequência de codificação de hFlt3L e hOX40L foi separada por um cassete

incluindo um sítio de clivagem de furina seguido por uma sequência Pep2A. A recombinação homóloga que ocorreu nos loci E4L e E6R resulta na inserção do cassete de expressão para hFlt3L e hOX40L.

[0234] As FIGS. 82A e 82B mostram que o vírus MVAΔE5R-hFlt3L-hOX40L recombinante tem a inserção esperada conforme determinado por análise de PCR. A pista 1 mostra a escada de 1kb mais DNA da Fermentas. A pista 2 mostra uma banda com tamanho esperado de 1120 bp usando pares de iniciadores F0/R5. A pista 3 mostra uma banda com tamanho esperado de 1166 bp usando pares de iniciadores F2/R2. A pista 4 mostra uma banda com tamanho esperado de 1136 bp usando pares de iniciadores F5/R0.

[0235] As FIGS. 83A-83C mostram que o vírus MVAΔE5R-hFlt3L-hOX40L expressa tanto hFlt3L quanto hOX40L na superfície de células infectadas. **A FIG. 83A** são gráficos de pontos da análise FACS da expressão de hFlt3L no eixo Y e expressão de hOX40L no eixoxde células BHK21 infectadas com MVA ou MVAΔE5R-hFlt3L-hOX40L por 24 h. As células foram infectadas em um MOI de 10. Uma infecção simulada, nenhum controle de vírus foi incluído. **A FIG. 83B** são gráficos de pontos da análise FACS da expressão de hFlt3L no eixo Y e expressão de hOX40L no eixoxde melanoma murino B16-F10 infectado com MVA ou MVAΔE5R-hFlt3L-hOX40L por 24 h. As células foram infectadas em um MOI de 10. Uma infecção simulada, nenhum controle de vírus foi incluído. **A FIG. 83C** são gráficos de pontos da análise FACS da expressão de hFlt3L no eixo Y e expressão de hOX40L no eixoxde células de melanoma humano SK-MEL28 infectadas com MVA ou MVAΔE5R-hFlt3L-hOX40L por 24 h. As células foram infectadas em um MOI de 10. Uma infecção simulada, nenhum controle de vírus foi incluído.

[0236] A FIG. 84 mostra os resultados de Western blot da expressão de hFlt3L e hOX40L em células BHK21 infectadas com MVAΔE5R-hFlt3L-hOX40L. As células BHK21 foram falsamente infectadas ou infectadas com MVA ou MVAΔE5R-hFlt3L-hOX40L. Os lisados de células foram coletados 24h

após a infecção. A análise de Western blot foi realizada usando anticorpos anti-hFlt3L e anti-hOX40L.

[0237] As FIGS. 85A e 85B mostram um esquema para gerar VACV-TK$^-$-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-mOX40L. **A FIG. 85A** mostra um diagrama esquemático do vetor pCB com um único cassete de expressão projetado para expressar a cadeia pesada e leve do anticorpo usando o promotor precoce e tardio sintético viral de vaccinia (PsE/L). A sequência de codificação da cadeia pesada (muIgG2a) e da cadeia leve de 9D9 foi separada por um cassete incluindo um sítio de clivagem de furina seguido por uma sequência de peptídeo 2A (Pep2A) para permitir o salto de ribossomo. O plasmídeo pCB contendo o gene anti-mu-CTLA-4 sob o controle de vaccinia PsE/L, bem como o *gene de xantina-guanina fosforibosil transferase de E. coli* (gpt) sob o controle do promotor P7.5 de vaccinia flanqueado pelo gene da timidina quinase (TK) em ambos os lados. O vírus recombinante expressando anti-mu-CTLA-4 a partir do locus TK foi gerado por meio de de recombinação homóloga no locus TK entre o DNA do plasmídeo pCB e o DNA genômico viral. A **FIG. 85B** é o diagrama esquemático do uso do promotor inicial e tardio sintético viral vaccinia (PsE/L) para expressar Flt3L humano e OX40L murino como uma proteína de fusão em um único cassete de expressão. A sequência de codificação de Flt3L humano e OX40L murino foi separada por um cassete incluindo um sítio de clivagem de furina seguido por uma sequência de peptídeo 2A (Pep2A). Foi construído um plasmídeo pUC57 contendo Flt3L humano e gene de fusão OX40L murino flanqueado pelos genes E4L e E6R em ambos os lados. O vírus recombinante expressando Flt3L humano e proteína de fusão OX40L murino do locus E5R foi gerado por meio de de recombinação homóloga nos loci E4L e E6R entre o plasmídeo pUC57 e o DNA genômico viral.

[0238] As FIGS. 86A-86C mostram o esquema e os resultados da análise de PCR para verificar o vírus vaccinia recombinante VACV-TK$^-$-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-mOX40L, bem como os resultados de Western blot na

expressão de anticorpos anti-CTLA -4 pelas células infectadas com o vírus recombinante. A **FIG. 86A** mostra o diagrama esquemático dos iniciadores usados para amplificar os diferentes fragmentos de genes de cassete de expressão inseridos do plasmídeo de expressão pUC57. O par de iniciadores f1/r1 foi usado para gerar um fragmento de PCR de 2795 pb, que contém todo o cassete de expressão. Este par de iniciadores também foi usado para verificar a pureza do vírus recombinante. O par de iniciadores f0/r5 foi usado para confirmar que o cassete de expressão foi inserido na posição certa no genoma do vírus. O gene Flt3L humano foi amplificado usando o par de iniciadores f1/r3 ou fo/r2 a partir de VACV-TK$^-$-anti-muCTLA-4-E5R$^-$-hFlt3L-mOX40L. O gene OX40L murino foi gerado usando o par de iniciadores f4/r1. E, finalmente, o par de iniciadores pCB-R4 e TK-F5 foi usado para gerar o gene anti-mu-CTLA-4 inserido no locus TK a partir do vírus recombinante VACV-TK$^-$-anti-muCTLA-4-E5R$^-$-hFlt3L-mOX40L ou MVA-TK$^-$-anti-muCTLA-4-E5R$^-$-hFlt3L-mOX40L. A **FIG. 86B** mostra a imagem de gel dos resultados de PCR usando os pares de iniciadores descritos na **FIG. 86A** e uma tabela que exibe os tamanhos predicados dos fragmentos de DNA amplificados com os pares de iniciadores. A **FIG. 86C** mostra os resultados de Western blot de células de melanoma humano SK-MEL-28 simulando infectadas ou infectadas com o vetor E3LΔ83N-TK$^-$, E3LΔ83N-TK$^-$-hFlt3L-anti-muCTLA-4, E3LΔ83N-TK$^-$-hFlt3L-anti-muCTLA-4-C7L$^-$-mOX40L, VACV, VACV-TK$^-$-anti-muCTLA-4-C7L$^-$-mOX40L, ou VACV-TK$^-$-anti-muCTLA-4-E5R$^-$-hFlt3L-mOX40L em um MOI de 10. Os lisados de células foram coletados 24 horas após a infecção e os polipeptídeos foram separados utilizando SDS-PAGE a 10%. O anticorpo IgG anti-camundongo ligado a HRP (cadeia pesada e leve) foi usado para detectar comprimento total (FL), cadeia pesada (HC) e cadeia leve (LC) de anticorpos anti-muCTLA-4.

[0239] A FIG. 87 mostra os alinhamentos de sequência de proteínas de ortólogos E5 de vários membros da família dos poxvírus.

[0240] A FIG. 88A mostra os alinhamentos de sequência de proteína de E5 do vírus vaccinia e do vírus vaccinia modificado Ankara (MVA). **A FIG.**

88B mostra os alinhamentos de sequência de proteína de E5 do vírus vaccinia e do vírus myxoma.

[0241] As FIGS. 89A e 89B mostram que o vírus mixoma M31R inibe a via de IFN-β induzida por cGAS e STING. **A FIG. 89A** mostra que as células HEK293T foram transfectadas com plasmídeos que expressam cGAS murino, STING humano juntamente com o plasmídeo que expressa o controle do vetor de E5R, M31R ou pcDNA. Após 24 h, os sinais de luciferase foram determinados. **A FIG. 89B** mostra que as células HEK293T foram transfectadas com plasmídeos que expressam STING humano juntamente com o plasmídeo que expressa o controle do vetor de E5R, M31R ou pcDNA. Após 24 h, os sinais de luciferase foram determinados.

[0242] As FIGS. 90A e 90B mostram que vaccinia E5 promove ubiquitinação de cGAS. **A FIG. 90A** mostra que as células HEK293T foram transfectadas com Flag-cGAS e HA-ubiquitina. Após 24 h, as células foram infectadas com WT VACV ou VACVΔE5R. A lise de células foi coletada após 6 h. O cGAS foi imunoprecipitado com anticorpo anti-Flag e a ubiquitinação foi detectada por anticorpo anti-HA. **A FIG. 90B** mostra a análise de Western blot de cGAS e β-actina em lisados de células inteiras (WCL).

[0243] As FIGS. 91A-91C são representações gráficas de dados que mostram IT MVAΔE5R que atrasa o crescimento do tumor e prolonga a sobrevivência no modelo de implantação de tumor unilateral de melanoma murino B16-F10. **A FIG. 91A** é um esquema de implantação de tumor e tratamento para um modelo de implantação de tumor unilateral B16-F10. Resumidamente, $5x10^5$ células de melanoma B16-F10 foram implantadas por via intradérmica para o flanco direito de camundongos C57B/6J. Oito dias após a implantação do tumor, PBS, $4x10^7$ pfu de MVA, MVAΔE5R ou Heat-iMVA foram injetados intratumoralmente duas vezes por semana. Os tamanhos dos tumores foram medidos e a sobrevivência dos camundongos foi monitorada. **A FIG. 91B** é um gráfico da curva de sobrevivência de Kaplan-Meier de camundongos com tumor tratados com tratamentos PBS, MVA, MVAΔE5R ou

Heat-iMVA. (n=5, *P<0,05; **P<0,01; teste de Mantel-Cox). **A FIG. 91C** é uma tabela que mostra a sobrevivência média de camundongos tratados com PBS, MVA, MVAΔE5R ou Heat-iMVA.

[0244] As FIGS. 92A-92E mostram que a infecção por MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)mOX40LΔE5R de BMDCs resulta em níveis mais elevados de expressão do gene IFNB e IFN-ß secreção de proteína em comparação com MVAΔE5R. **As FIGS. 92A-92C** mostram diagramas esquemáticos de geração de vírus MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40LΔE5R. A primeira etapa envolve a geração de MVAΔC7L-hFlt3L por meio de recombinação homóloga nos loci C8L e C6R, substituindo o gene C7L por hFlt3L sob o controle do promotor PsE/L (**FIG. 92A**). A segunda etapa envolve a geração de MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L por meio de recombinação homóloga nos loci TK, substituindo o gene TK por mOX40L sob o controle do promotor PsE/L (**FIG. 92B**). O vírus resultante foi descrito nas **FIGS 5A e 5B**. A terceira etapa é gerar MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40LΔE5R por meio de recombinação homóloga nos loci E4L e E6R, substituindo o gene E5R por mCherry sob o controle do promotor P7.5 (**FIG. 92C**). **A FIG. 92D** mostra resultados de RT-PCR da expressão do gene IFNB em BMDCs infectados com MVAΔE5R, MVAΔE5R, MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L, ou MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)mOX40LΔE5R. WT e $IFNAR^{-/-}$ BMDCs foram falsamente infectados ou infectados com MVAΔE5R, MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L, ou MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)mOX40LΔE5R em um MOI de 10. As células foram coletadas 16h após a infecção e RT-PCR foi realizado. **A FIG. 92E** mostra resultados de ELISA de níveis de proteína IFN-ß nos sobrenadantes de BMDCs infectados com MVAΔE5R, MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L, ou MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)mOX40LΔE5R. WT e $IFNAR^{-/-}$ BMDCs foram falsamente infectados ou infectados com MVAΔE5R, MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L, ou MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)mOX40LΔE5R em um MOI de 10. Os sobrenadantes foram coletados 16h após a infecção e ELISA foi realizado para medir níveis de proteína IFN-ß.

[0245] As FIGS. 93A e 93B mostram o esquema de geração de MVAΔC7LΔE5R-hFlt3L-mOX40L e MVAΔC7L-OVA-ΔE5R-hFlt3L-mOX40L. **A FIG. 93A** mostra o esquema de geração de MVAΔC7LΔE5R-hFlt3L-mOX40L. O plasmídeo pUC57 é construído para usar o promotor inicial e tardio sintético viral vaccinia (PsE/L) para expressar Flt3L humano e OX40L murino como uma proteína de fusão em um único cassete de expressão. A sequência de codificação de Flt3L humano e OX40L murino foi separada por um cassete incluindo um sítio de clivagem de furina seguido por uma sequência de peptídeo 2A (Pep2A). O vírus recombinante que expressa Flt3L humano e proteína de fusão OX40L murino do locus E5R foi gerado por meio de de recombinação homóloga nos loci E4L e E5R entre o plasmídeo pUC57 e o genoma viral MVAΔC7L. **A FIG. 93B** mostra o esquema de geração de MVAΔC7L-OVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L. O vírus recombinante que expressa Flt3L humano e proteína de fusão OX40L murino do locus E5R foi gerado por meio de de recombinação homóloga nos loci E4L e E5R entre o plasmídeo pUC57 e o genoma viral MVAΔC7L-OVA.

[0246] As FIGS. 94A e 94B. **A FIG. 94A**: Ensaio de luciferase dupla de células HEK293T transfectadas com repórter de luciferase ISRE-pirilampo, um plasmídeo de controle pRL-TK que expressa *luciferase de Renilla*, juntamente com mixoma M62R, Mixoma M62R-HA, Mixoma M64R, Mixoma M64R-HA, expressão de C7L de vacínia ou plasmídeo de controle. 24h após a transfecção, as células foram tratadas com IFN-β por mais 24 horas antes da coleta. **A FIG. 94B**: Ensaio de luciferase dupla de células HEK293T transfectadas com repórter de luciferase IFNB-pirilampo, um plasmídeo de controle pRL-TK que expressa *luciferase de Renilla* e plasmídeo expressando STING, juntamente com mixoma M62R, Mixoma M62R-HA, Mixoma M64R, Mixoma M64R-HA, expressão de vaccinia C7L ou plasmídeo de controle. As células foram coletadas 24h após a transfecção.

[0247] A FIG. 95 mostra um esquema de geração de MVAΔE5R recombinante expressando hFlt3L e mOX40L por meio de de recombinação

homóloga nos loci E4L e E6R do genoma de MVA. O vetor pUC57 foi usado para inserir um único cassete de expressão projetado para expressar hFlt3L e mOX40L usando o promotor precoce e tardio sintético viral de vaccinia (PsE/L). A sequência de codificação de hFlt3L e mOX40L foi separada por um cassete incluindo um sítio de clivagem de furina seguido por uma sequência Pep2A. A recombinação homóloga que ocorreu nos loci E4L e E6R resulta na inserção do cassete de expressão para hFlt3L e mOX40L.

[0248] As FIGs. 96A e 96B mostram que o vírus MVA∆E5R-hFlt3L-mOX40L expressa tanto hFlt3L quanto mOX40L na superfície de células infectadas. **A FIG. 96A** mostra os gráficos de pontos da análise FACS da expressão de hFlt3L no eixo Y e expressão de mOX40L no eixoxde células BHK21, células de melanoma murino B16-F10 ou células de melanoma humano SK-MEL28. As células foram infectadas com MVA ou MVA∆E5R-hFlt3L-mOX40L a um MOI de 10 por 24h. Nenhum controle de infecção simulada por vírus foi incluído. **A FIG. 96B** mostra os gráficos de intensidade de fluorescência média (MFI) de Flt3L humano e OX40L murino em células BHK21, B16-F10 e SK-MEL28 infectadas com MVA, MVA∆E5R-hFlt3L-mOX40L ou PBS.

[0249] As FIGS. 97-102 são uma série de representações gráficas de dados que mostram que a injeção intratumoral de MVA∆E5R-hFlt3L-mOX40L gerou células T efetoras infiltrantes de tumor mais ativadas em tumores distantes injetados e não injetados, bem como nos baços em comparação com MVA, MVA∆E5R ou Heat-iMVA em um modelo de tumor bilateral B16-F10. **A FIG. 97** mostra o esquema experimental. Resumidamente, células de melanoma B16-F10 foram implantadas intradermicamente nos flancos esquerdo e direito de camundongos C57B/6J ($5x10^5$ no flanco direito e $2,5x10^5$ no flanco esquerdo). Sete dias após a implantação do tumor, $2x10^7$ pfu de MVA∆E5R-hFlt3L-mOX40L, MVA, MVA∆E5R, uma quantidade equivalente de Heat-iMVA ou PBS foi injetado por via intratumoral (IT) no maior tumores no flanco direito duas vezes, com três dias de intervalo. Os baços foram coletados

2 dias após a segunda injeção, as análises ELISPOT foram realizadas para avaliar as células T específicas do tumor nos baços. Os tumores injetados e não injetados também foram isolados e os linfócitos infiltrantes do tumor foram analisados por FACS.

[0250] As FIGS. 98A-98B. O ensaio ELISPOT foi realizado por co-cultura de células B16-F10 irradiadas (150.000) e esplenócitos (1.000.000) em uma placa de 96 cavidades. **A FIG. 98A** mostra a imagem de ELISPOT de amostras triplicadas da esquerda para a direita. **A FIG. 98B** mostra o gráfico de pontos de IFN-γ+ por 1.000.000 células CD8+ T purificadas. Cada barra representa a amostra de baço de camundongo individual (n=3-8) (* *P* <0,05; ** *P* <0,01, *teste t*).

[0251] As FIGS. 99A-99C. **A FIG. 99A** mostra os gráficos de pontos representativos de células Granzyme B^+ $CD8^+$ T em tumores não injetados após tratamento com MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L, Heat-iMVA, ou PBS. **A FIG. 99B** mostra o gráfico de porcentagens de células $CD8^+$ T fora das células $CD3^+$. Dados são médias±SEM (n=5-9). (***P*<0.01; ****P*<0.001, *teste t*). **A FIG. 99C** mostra o gráfico de porcentagens de células B+ CD8+ T Granzyme fora das células $CD8^{)+}$. Dados são médias±SEM (n=5-9) (** *P* <0,01; *** *P* <0,001, *teste t*).

[0252] As FIGS. 100A-100C. **A FIG. 100A** mostra os gráficos de pontos representativos de células Granzyme B^+ $CD4^+$ T em tumores não injetados após tratamento com MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L, Heat-iMVA, ou PBS. **A FIG. 100B** mostra o gráfico de porcentagens de células $CD4^+$ T fora das células $CD3^+$. Dados são médias±SEM (n=5-9). (**P* <0,05; *teste t*). **A FIG. 100C** mostra o gráfico de porcentagens de células B+ CD4+ T Granzyme fora das células $CD4^{)+}$. Dados são médias±SEM (n=5-9) (***P* <0,01; ****P* <0,001, *teste t*).

[0253] As FIGS. 101A-101C. **A FIG. 101A** mostra os gráficos de pontos representativos de células Granzyme B^+ $CD8^+$ T em tumores injetados

após tratamento com MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L, Heat-iMVA, ou PBS. **A FIG. 101B** mostra o gráfico de porcentagens de células $CD8^+$ T fora das células $CD3^+$. Dados são médias±SEM (n=5-9). **** *P* <0,0001, *teste t*). **A FIG. 101C** mostra o gráfico de porcentagens de células B+ CD8+ T Granzyme fora das células $CD8^{)+}$. Dados são médias±SEM (n=5-9) (* *P* <0,05; **** *P* <0,0001, *teste t*).

[0254] As FIGS. 102A-102C. **A FIG. 102A** mostra os gráficos de pontos representativos de células Granzyme B^+ $CD4^+$ T em tumores injetados após tratamento com MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L, Heat-iMVA, ou PBS. **A FIG. 102B** mostra o gráfico de porcentagens de células $CD4^+$ T fora das células $CD3^+$. Dados são médias±SEM (n=5-9). (** *P* <0,01; *teste t*). **A FIG. 102C** mostra o gráfico de porcentagens de células B+ CD4+ T Granzyme fora das células $CD4^{)+}$. Dados são médias±SEM (n=5-9) (* *P* <0,05; ** *P* <0,01; **** *P* <0,0001, *teste t*).

[0255] As FIGS. 103A-104C são uma série de representações gráficas de dados que mostram que a injeção intratumoral de MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L reduziu as células T reguladoras $FoxP3^+CD4^+$ nos tumores injetados, mas não nos tumores não injetados. **A FIG. 103A** mostra os gráficos de pontos representativos de células $FoxP3^+$ $CD4^+$ em tumores injetados após tratamento com MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L, Heat-iMVA, ou PBS. **A FIG. 103B** mostra o gráfico de porcentagens de células $FoxP3^+$ $CD4^+$ T fora das células $CD4^+$. Dados são médias±SEM (n=5-9). (***P*<0.01; ****P*<0.001, *teste t*). **A FIG. 103C** mostra o gráfico de números absolutos de células $FoxP3^+CD4^+$ T por grama de tumor. Dados são médias±SEM (n=5-9). (* *P* <0,05, *teste t*). **A FIG. 104A** mostra os gráficos de pontos representativos de células $FoxP3^+$ $CD4^+$ em tumores não injetados após tratamento com MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L, Heat-iMVA, ou PBS. **A FIG. 104B** mostra o gráfico de porcentagens de células $FoxP3^+$ $CD4^+$ T fora das células $CD4^+$. Dados são médias±SEM (n=5-9). **A FIG.**

104C mostra o gráfico de números absolutos de células FoxP3$^+$CD4$^+$ T por grama de tumor. Dados são médias±SEM (n=5-9).

[0256] As FIGS. 105A a 109C são uma série de representações gráficas de dados que mostram que a injeção intratumoral de MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L que reduz preferencialmente células T reguladoras OX40$^+$FoxP3$^+$CD4$^+$ nos tumores injetados. **A FIG. 105A** mostra os gráficos de pontos representativos de células OX40$^+$FoxP3$^+$CD4$^+$ em tumores não injetados após tratamento com MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L, Heat-iMVA, ou PBS. **A FIG. 105B** mostra o gráfico de porcentagens de células OX40$^+$FoxP3$^+$CD4$^+$ T fora das células CD4$^+$ em tumores injetados. Dados são médias±SEM (n=5-9). (***P*<0.01; ****P*<0.001, *teste t*). **A FIG. 105C** mostra o gráfico de números absolutos de células OX40$^+$FoxP3$^+$CD4$^+$ T por grama de tumor. Dados são médias±SEM (n=5-9). (* *P* <0,05, *teste t*).

[0257] A FIG. 106A mostra os gráficos de pontos representativos de células OX40$^+$FoxP3$^+$CD4$^+$ em tumores não injetados após tratamento com MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L, Heat-iMVA, ou PBS. **A FIG. 106B** mostra o gráfico de porcentagens de células OX40$^+$FoxP3$^+$ CD4$^+$ T fora das células CD4$^+$. Dados são médias±SEM (n=5-9). **A FIG. 106C** mostra o gráfico de números absolutos de células OX40$^+$FoxP3$^+$CD4$^+$ T por grama de tumor. Dados são médias±SEM (n=5-9).

[0258] A FIG. 107A mostra os gráficos de pontos representativos de células OX40$^+$FoxP3$^+$CD4$^+$ em tumores não injetados após tratamento com MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L, Heat-iMVA, ou PBS. **A FIG. 107B** mostra o gráfico de porcentagens de células OX40$^+$FoxP3$^+$ CD4$^+$ T fora das células CD4$^+$. Dados são médias±SEM (n=5-9). **A FIG. 107C** mostra o gráfico de números absolutos de células OX40$^+$FoxP3$^+$CD4$^+$ T por grama de tumor. Dados são médias±SEM (n=5-9).

[0259] A FIG. 108 mostra os gráficos de pontos representativos de células $OX40^+$ $CD8^+$ em tumores não injetados após tratamento com MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L, Heat-iMVA, ou PBS.

[0260] As FIGS. 109A-109C são uma série de representações gráficas de dados que mostram que a injeção intratumoral de MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L que resulta em mais redução de células T reguladoras $FoxP3^+CD4^+$ nos tumores injetados em comparação com MVAΔE5R. **A FIG. 109A** mostra os gráficos de pontos representativos de células $FoxP3^+$ $CD4^+$ em tumores injetados após tratamento com MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L, MVAΔE5R, ou PBS. **A FIG. 109B** mostra o gráfico de porcentagens de células $FoxP3^+CD4^+$CD4+ T fora das células $CD4^+$ em tumores injetados. Dados são médias±SEM (n=5-9). (**P*<0.05; ***P*<0.01, *teste t*). **A FIG. 109C** mostra o gráfico de números absolutos de células $FoxP3^+CD4^+$ T por grama de tumor. Dados são médias±SEM (n=5-9). (** *P* <0,01, *teste t*).

[0261] As FIGS. 110-115C são uma série de representações gráficas de dados que mostram que a injeção intratumoral de MVAΔE5R-hFlt3L-mOX4 gerou células $CD8^+$ e $CD4^+$ T efetoras infiltrantes de tumor mais ativadas nos tumores distantes injetados e não injetados em camundongos $OX40^{-/-}$em comparação com camundongos WT em um modelo de melanoma murino bilateral B16-F10. **A FIG. 110** mostra o esquema experimental. Resumidamente, células de melanoma B16-F10 foram implantadas intradermicamente nos flancos esquerdo e direito de camundongos C57B/6J ($5x10^5$ no flanco direito e $2,5x10^5$ no flanco esquerdo). Dez dias após a implantação do tumor, injeções intratumorais ($4x10^7$ pfu) de MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L ou PBS foram realizadas nos tumores maiores no flanco direito duas vezes, com três dias de intervalo. Ambos os tumores distantes injetados e não injetados foram coletados 2 dias após a segunda injeção e os linfócitos infiltrantes do tumor foram analisados por FACS.

[0262] A FIG. 111A mostra os gráficos de pontos representativos de células Granzyme B^+ $CD8^+$ T em tumores injetados a partir de camundongos WT e $OX40^{-/-}$ após tratamento com MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L- ou PBS. **A FIG. 111B** mostra o gráfico de porcentagens de células $CD8^+$ T fora das células $CD3^+$. Dados são médias±SEM (n=4-10). **A FIG. 111C** mostra o gráfico de números absolutos de células $CD8^+$ T por grama de tumor. Dados são médias±SEM (n=4-10). **A FIG. 111D** mostra o gráfico de porcentagens de células B+ CD8+ T Granzyme fora das células $CD8^+$. Dados são médias±SEM (n=4-10). **A FIG. 111E** mostra o gráfico de números absolutos de células Granzyme B^+ $CD8^+$ T por grama de tumor. Dados são médias±SEM (n=4-10).

[0263] A FIG. 112A mostra os gráficos de pontos representativos de células Granzyme B^+ $CD4^+$ T em tumores injetados a partir de camundongos WT e $OX40^{-/-}$ após tratamento com MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L- ou PBS. **A FIG. 112B** mostra o gráfico de porcentagens de células $CD4^+$ T fora das células $CD3^+$. Dados são médias±SEM (n=4-10). **A FIG. 112C** mostra o gráfico de números absolutos de células $CD4^+$ T por grama de tumor. Dados são médias±SEM (n=4-10). **A FIG. 112D** mostra o gráfico de porcentagens de células B+ CD4+ T Granzyme fora das células $CD4^+$. Dados são médias±SEM (n=4-10). **A FIG. 112E** mostra o gráfico de números absolutos de células Granzyme B^+ $CD4^+$ T por grama de tumor. Dados são médias±SEM (n=4-10).

[0264] A FIG. 113A mostra que a injeção IT de MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L falha em reduzir as células $FoxP3^+CD4^+$ T nos tumores injetados de camundongos $OX40^{-/-}$. Gráficos de pontos representativos de células $FoxP3^+CD4^+$ T em tumores injetados a partir de camundongos WT e $OX40^{-/-}$ após tratamento com MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L- ou PBS. **A FIG. 113B** mostra o gráfico de porcentagens de células $FoxP3^+CD4^+$ T fora das células $CD4^+$ em dados que são médias ±SEM (n=4-10).

[0265] As FIGS. 114A-115C demonstram que a injeção IT de MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L reduz células $OX40^+FoxP3^+CD4^+$ e $OX40^+FoxP3^-$

$CD4^+$ T nos tumores injetados de camundongos WT. **A FIG. 114A** mostra os gráficos de pontos representativos de células $OX40^+FoxP3^+CD4^+$ T em tumores injetados a partir de camundongos WT e $OX40^{-/-}$ após tratamento com MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L- ou PBS. **A FIG. 114B** mostra o gráfico de porcentagens de células $OX40^+FoxP3^+$ $CD4^+$ T fora das células $CD4^+$. Dados são médias±SEM (n=4-10). **A FIG. 114C** mostra o gráfico de números absolutos de células $OX40^+FoxP3^+CD4^+$ T por grama de tumor. Dados são médias±SEM (n=4-10).

[0266] A FIG. 115A mostra os gráficos de pontos representativos de células $OX40^+FoxP3^+CD4^+$ T em tumores injetados a partir de camundongos WT e $OX40^{-/-}$ após tratamento com MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L- ou PBS. **A FIG. 115B** mostra o gráfico de porcentagens de células $OX40^+FoxP3^+$ $CD4^+$ T fora das células $CD4^+$. Dados são médias±SEM (n=4-10). **A FIG. 115C** mostra o gráfico de números absolutos de células $OX40^+FoxP3^+CD4^+$ T por grama de tumor. Dados são médias±SEM (n=4-10).

[0267] As FIGS. 116A-119C são uma série de representações gráficas de dados que mostram que a injeção intratumoral de MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L resulta em mais proliferação e ativação de células $CD8^+$ e $CD4^+$ efetoras infiltrantes de tumor em tumores distantes não injetados a partir de camundongos $OX40^{-/-}$ em comparação com camundongos WT. **A FIG. 116A** mostra os gráficos de pontos representativos de células Granzyme B^+ $CD8^+$ T em tumores não injetados a partir de camundongos WT e $OX40^{-/-}$ após tratamento com MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L- ou PBS. **A FIG. 116B** mostra o gráfico de porcentagens de células $CD8^+$ T fora das células $CD45^+$. Dados são médias±SEM (n=5-10). **A FIG. 116C** mostra o gráfico de números absolutos de células $CD8^+$ T por grama de tumor. Dados são médias±SEM (n=5-10). **A FIG. 116D** mostra o gráfico de porcentagens de células B+ CD8+ T Granzyme fora das células $CD8^{+\cdot}$ Dados são médias±SEM (n=5-10). **A FIG. 116E** mostra o

gráfico de números absolutos de células Granzyme B^+ $CD8^+$ T por grama de tumor. Dados são médias±SEM (n=5-10).

[0268] A FIG. 117A mostra os gráficos de pontos representativos de células $Ki67^+$ $CD8^+$ T em tumores não injetados a partir de camundongos WT e $OX40^{-/-}$ após tratamento com MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L- ou PBS. **A FIG. 117B** mostra o gráfico de porcentagens de células $Ki67^+$ $CD8^+$ T fora das células $CD8^+$. Dados são médias±SEM (n=5-10). **A FIG. 117C** mostra o gráfico de números absolutos de células $Ki67^+CD8^+$ T por grama de tumor. Dados são médias±SEM (n=5-10).

[0269] A FIG. 118A mostra os gráficos de pontos representativos de células Granzyme B^+ $CD4^+$ T em tumores não injetados a partir de camundongos WT e $OX40^{-/-}$ após tratamento com MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L- ou PBS. **A FIG. 118B** mostra o gráfico de porcentagens de células $CD4^+$ T fora das células $CD45^+$. Dados são médias±SEM (n=5-10). **A FIG. 118C** mostra o gráfico de números absolutos de células $CD4^+$ T por grama de tumor. Dados são médias±SEM (n=5-10). **A FIG. 118D** mostra o gráfico de porcentagens de células B+ CD4+ T Granzyme fora das células $CD4^+$. Dados são médias±SEM (n=5-10). **A FIG. 118E** mostra o gráfico de números absolutos de células Granzyme B^+ $CD4^+$ T por grama de tumor. Dados são médias±SEM (n=5-10).

[0270] A FIG. 119A mostra os gráficos de pontos representativos de células $Ki67^+$ $CD4^+$ T em tumores não injetados a partir de camundongos WT e $OX40^{-/-}$ após tratamento com MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L- ou PBS. **A FIG. 119B** mostra o gráfico de porcentagens de células $Ki67^+$ $CD4^+$ T fora das células $CD4^+$. Dados são médias±SEM (n=5-10). **A FIG. 119C** mostra o gráfico de números absolutos de células $Ki67^+CD4^+$ T por grama de tumor. Dados são médias±SEM (n=5-10).

[0271] As FIGS. 120-124B são uma série de representações gráficas de dados que mostram que a injeção intratumoral de MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L foi capaz de induzir efeitos antitumorais sem recrutar células T

dos órgãos linfóides. **A FIG. 120** mostra o esquema experimental. Resumidamente, células de melanoma B16-F10 foram implantadas intradermicamente nos flancos esquerdo e direito de camundongos C57B/6J ($5x10^5$ no flanco direito e $2,5x10^5$ no flanco esquerdo). Nove dias após a implantação do tumor, injeções intratumorais ($4x10^7$ pfu) de MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L ou PBS foram realizadas nos tumores maiores no flanco direito duas vezes, com 9 e 12 dias. Os tumores injetados foram coletados 2 dias após a segunda injeção e os linfócitos infiltrantes do tumor foram analisados por FACS. FTY720 (25 µg), que bloqueia a saída de linfócitos a partir dos órgãos linfóides, foi administrado aos camundongos por via intrapertonal no dia 7, 9, 11 e 13.

[0272] A FIG. 121 (painel superior) mostra os gráficos de volumes de tumor de tumores injetados e não injetados ao longo do tempo. Dados são médias±SEM (n=7-8). **A FIG. 121** (painel inferior) mostra os gráficos de volumes de tumor de ambos os tumores injetados e não injetados no dia 6 após a primeira injeção. Dados são médias±SEM (n=7-8).

[0273] As FIGS. 122A-122D mostra os gráficos de pontos representativos de células Granzyme B^+ $CD8^+$ T em tumores injetados a partir de camundongos após tratamento com MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L ou PBS em combinação com distribuição intraperitoneal de FTY720 ou DMSO. **A FIG. 122B** mostra o gráfico de porcentagens de células $CD8^+$ T fora das células $CD45^+$. Dados são médias±SEM (n=7-8). **A FIG. 122C** mostra o gráfico de porcentagens de células B+ CD8+ T Granzyme fora das células $CD8^{+.}$ Dados são médias±SEM (n=7-8). **A FIG. 122D** mostra o gráfico de porcentagens de células $Ki67^+$ $CD8^+$ T fora das células $CD8^+$. Dados são médias±SEM (n=7-8).

[0274] A FIG. 123A mostra os gráficos de pontos representativos de células Granzyme B^+ $CD8^+$ T em TDLNs de tumores injetados a partir de camundongos após tratamento com MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L ou PBS em combinação com distribuição intraperitoneal de FTY720 ou DMSO. **A FIG.**

123B mostra o gráfico de porcentagens de células $CD8^+$ T fora das células $CD3^+$. Dados são médias±SEM (n=7-8). **A FIG. 123C** mostra o gráfico de porcentagens de células B+ CD8+ T Granzyme fora das células $CD8^{+.}$ Dados são médias±SEM (n=7-8).

[0275] A FIG. 124A mostra os gráficos de pontos representativos de células $Ki67^+$ $CD8^+$ T em TDLNs de tumores injetados a partir de camundongos após tratamento com MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L ou PBS em combinação com distribuição intraperitoneal de FTY720 ou DMSO. **A FIG. 124B** mostra o gráfico de porcentagens de células $Ki67^+$ $CD8^+$ T fora das células $CD8^+$. Dados são médias±SEM (n=7-8).

[0276] As FIGS. 125-129C são representações gráficas de dados que mostram que a administração intratumoral de MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L atrasa o crescimento do tumor, ativa as células $CD8^+$ T e reduz as células T $FoxP3^+$ $CD4^+$ nos tumores injetados em um modelo de implantação de tecido adiposo de câncer de mama AT3 murino. **A FIG. 125** é um esquema de implantação de tumor e tratamento para modelo de implantação de tecido adiposo AT3 de câncer de mama murino. Resumidamente, células AT3 ($1x10^6$) foram implantadas no 4º tecido adiposo dos camundongos C57B/6J. 14 dias após a implantação do tumor, injeções intratumorais ($6x10^7$ pfu) de MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L, ou Heat-iMVA, ou PBS, foram realizadas duas vezes, com três dias de intervalo. Os tumores injetados foram medidos e coletados para análise FACS.

[0277] A FIG. 126A mostra o gráfico de volumes de tumor de tumores AT3 injetados após tratamento com MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L, ou Heat-iMVA ou PBS ao longo do tempo. Dados são médias ±SEM (n=5). Gráfico do peso do tumor de tumores injetados no dia 6 após a primeira injeção. Dados são médias ±SEM (n=5). **A FIG. 126B** mostra que o tumor pesa no dia 6. *=p<0,05.

[0278] A FIG. 127A mostra os gráficos de pontos representativos de células Granzyme B^+ $CD8^+$ T em tumores AT3 injetados após tratamento com MVA∆E5R-hFlt3L-mOX40L, ou Heat-iMVA ou PBS. **A FIG. 127B** mostra o gráfico de porcentagens de células $CD8^+$ T fora das células $CD3^+$. Dados são médias ±SEM (n=5). **A FIG. 127C** mostra o gráfico de números absolutos de células $CD8^+$ T por grama de tumor. Dados são médias ±SEM (n=5). **A FIG. 127D** mostra o gráfico de porcentagens de células B+ CD8+ T Granzyme fora das células $CD8^{+.}$ Dados são médias ±SEM (n=5). **A FIG. 127E** mostra o gráfico de números absolutos de células Granzyme B^+ $CD8^+$ T por grama de tumor. Dados são médias ±SEM (n=5).

[0279] A FIG. 128A mostra os gráficos de pontos representativos de células Granzyme B^+ $CD4^+$ T em tumores AT3 injetados após tratamento com MVA∆E5R-hFlt3L-mOX40L, ou Heat-iMVA ou PBS. **A FIG. 128B** mostra o gráfico de porcentagens de células $CD4^+$ T fora das células $CD3^+$. Dados são médias ±SEM (n=5). **A FIG. 128C** mostra o gráfico de números absolutos de células $CD4^+$ T por grama de tumor. Dados são médias ±SEM (n=5). **A FIG. 128D** mostra o gráfico de porcentagens de células B+ CD4+ T Granzyme fora das células $CD4^{+.}$ Dados são médias ±SEM (n=5). **A FIG. 128E** mostra o gráfico de números absolutos de células Granzyme B^+ $CD4^+$ T por grama de tumor. Dados são médias ±SEM (n=5).

[0280] A FIG. 129A mostra os gráficos de pontos representativos de células $FoxP3^+$ $CD4^+$ T em tumores AT3 injetados após tratamento com MVA∆E5R-hFlt3L-mOX40L, ou Heat-iMVA ou PBS. **A FIG. 129B** mostra o gráfico de porcentagens de células $FoxP3^+$ $CD4^+$ T fora das células $CD4^+$. Dados são médias ±SEM (n=5). **A FIG. 129C** mostra o gráfico de números absolutos de células $FoxP3^+CD4^+$ T por grama de tumor. Dados são médias ±SEM (n=5).

[0281] As FIGS. 130-131B são representações gráficas de dados que mostram que a combinação de administração IT de MVA∆E5R-hFlt3L-

mOX40L e administração intraperitoneal de anti-PD-L1 que resulta em eficácia terapêutica aumentada em um modelo de implantação de melanoma B16-F10 bilateral.

[0282] A FIG. 130 mostra o esquema experimental. Resumidamente, células de melanoma B16-F10 foram implantadas intradermicamente nos flancos esquerdo e direito de camundongos C57B/6J ($5x10^5$ no flanco direito e $1x10^5$ no flanco esquerdo). Sete dias após a implantação do tumor, 4 $x10^7$ pfu de MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L ou PBS foi injetado por via intratumoral (IT) nos tumores maiores no flanco direito duas vezes por semana. Um grupo de camundongos também recebeu anticorpo anti-PD-L1 (250 µg) duas vezes por semana em conjunto com IT de MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L. Os volumes do tumor e a sobrevivência dos camundongos foram monitorados.

[0283] A FIG. 131A mostra os volumes de tumor de tumores injetados e não injetados em camundongos tratados com PBS ou MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L por via intratumoral, ou com a combinação de IT de MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L mais IP de anti-PD-L1. **A FIG. 131B** mostra a curva de sobrevivência de Kaplan Meier dos três grupos.

[0284] As FIGS. 132A-134B são representações gráficas de dados que mostram que a infecção por MVAΔE5R-hFlt3L-hOX40L de BMDCs que induz a expressão do gene IFNB e secreção de proteínas IFN-ß A infecção de tumores humanos (doença de Paget extramamária) com MVAΔE5R-hFlt3L-hOX40L ex vivo resulta no aumento de células Granzyme B^+ $CD8^+$ T e na redução de células $FoxP3^+CD4^+$ T.

[0285] A FIG. 132A mostra os resultados de RT-PCR de BMDCs que foram infectados com MVA ou MVAΔE5R-hFlt3L-hOX40L em um MOI de 10. As células foram coletadas 6h após a infecção. RNAs foram extraídos e RT-PCRs foram realizados. **A FIG. 132B** mostra os níveis de proteína IFN-β em BMDCs infectados com MVA ou MVAΔE5R-hFlt3L-hOX40L em um MOI de

10. Os sobrenadantes foram coletados 19 horas após a infecção. Os níveis de proteína IFN-β foram determinados por ELISA.

[0286] A FIG. 133A mostra os gráficos de pontos representativos de células Granzyme B^+ $CD8^+$ T em tumores humanos após infecção com MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L ou PBS por dois dias. **A FIG. 133B** mostra os gráficos de pontos representativos de células $FoxP3^+CD4^+$ T em tumores humanos após infecção com MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L ou PBS por dois dias.

[0287] A FIG. 134A mostra o gráfico de porcentagens de células $Granzyme^+CD8^+$ T fora das células $CD8^+$ após infecção com MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L ou controle de PBS por dois dias. Dados são médias ±SEM (n=3). **A FIG. 134B** mostra o gráfico de porcentagens de células $FoxP3^+CD4^+$ T fora das células $CD4^+$ após infecção com MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L ou controle de PBS por dois dias. Dados são médias ±SEM (n=3).

[0288] As FIGS. 135A-137B são representações gráficas de dados mostrando que MVAΔE3LΔE5R induz níveis mais elevados de IFN tipo I em BMDCs e células de melanoma B16-F10 em comparação com MVAΔE5R ou MVAΔE3L.

[0289] As FIGS. 135A-135C mostram um esquema de geração de MVAΔE3LΔE5R e MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40L recombinantes por meio de de recombinação homóloga nos loci E2L e E4L do genoma MVAΔE5R ou MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L. A recombinação homóloga que ocorreu nos loci E2L e E4L resulta na deleção do gene E3L do genoma MVAΔE5R ou MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L.

[0290] A FIG. 136 mostra que a infecção por MVAΔE3LΔE5R de BMDCs induziu níveis mais elevados de expressão do gene IFNB em comparação com MVAΔE5R, MVA ou Heat-iMVA. BMDCs a partir de camundongos WT ou $cGAS^{-/-}$ foram infectados com MVA, Heat-iMVA, MVAΔE5R ou MVAΔE3LΔE5R em um MOI de 10. As células foram coletadas

6h após a infecção e os RNAs foram extraídos. Análises de RT-PCR quantitativas foram realizadas para examinar a expressão do gene IFNB.

[0291] As FIGS. 137A-137B mostram que a infecção por MVAΔE3LΔE5R de células de melanoma B16-F10 murino induz níveis mais elevados de expressão do gene IFNB e secreção de proteína IFN-ß em comparação com MVAΔE3L ou MVAΔE5R. **A FIG. 137A** mostra as análises de RT-PCR quantitativas com células WT ou $MDA5^{-/-}$, ou $STING^{-/-}MDA5^{-/-}$ B16-F10 infectadas com MVAΔE3L, ou MVAΔE5R ou MVAΔE3LΔE5R em um MOI de 10. As células foram coletadas 16h após a infecção e os RNAs foram extraídos. Análises de RT-PCR quantitativas foram realizadas para examinar a expressão do gene IFNB. **A FIG. 137B** mostra níveis de proteína IFN-ß em células WT ou $MDA5^{-/-}$, ou $STING^{-/-}MDA5^{-/-}$ B16-F10 infectadas com MVAΔE3L, ou MVAΔE5R, ou MVAΔE3LΔE5R em um MOI de 10. Os sobrenadantes foram coletados 24h após a infecção e os níveis de proteína IFN-ß nos sobrenadantes foram determinados por ELISA.

[0292] As FIGS. 138-139B são representações gráficas de dados mostrando MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40L expressos por transgenes humanos Flt3L e OX40L murinos em células de melanoma B16-F10 e administração intratumoral de células antitumorais sistêmicas mais fortes induzidas por MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40L em respostas em um modelo de melanoma murino B16-F10.

[0293] A FIG. 138 mostra os dados FACS que demonstram a expressão de mOX40L e hFlt3L em células B16-F10 infectadas com MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L ou com MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40L. As células B16-F10 foram infectadas com MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L ou com MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40L ou com MVAΔE3LΔE5R a um MOI de 10. As células foram lavadas 1 hora depois e coletadas 24 horas após a infecção. As células foram isoladas com anticorpo anti-mOX40L ou anti-hFlt3L para FACS.

[0294] As FIGS. 139A-139B mostra que a injeção intratumoral de MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40L gerou células T específicas de antitumor mais

fortes nos baços em comparação com MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L. Resumidamente, células de melanoma B16-F10 foram implantadas intradermicamente nos flancos esquerdo e direito de camundongos C57B/6J ($5x10^5$ no flanco direito e $2,5x10^5$ no flanco esquerdo). Sete dias após a implantação do tumor, $2x10^7$ pfu de MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40L, uma quantidade equivalente de Heat-iMVA ou PBS foi injetado por via intratumoral (IT) no maior tumores no flanco direito duas vezes, com três dias de intervalo. Os baços foram coletados 2 dias após a segunda injeção, as análises ELISPOT foram realizadas para avaliar as células T específicas do tumor nos baços. O ensaio ELISPOT foi realizado por co-cultura de células B16-F10 irradiadas (150.000) e esplenócitos (1.000.000) em uma placa de 96 cavidades. **A FIG. 139A** mostra aiImagem de ELISPOT de amostras em triplicado de esplenócitos combinados de camundongos no mesmo grupo de tratamento. **A FIG. 139 B** mostra o gráfico de pontos IFN-γ^+ por 1.000.000 de esplenócitos. Cada ponto representa amostras de baço de um camundongo individual (n=5-6) (* *P* <0,05; ** *P* <0,01, *teste t*).

[0295] As FIGS. 140-141B são representações gráficas de dados que mostram a administração intratumoral de MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40L administrado o crescimento de células de tumor WT e □$2M^{-/-}$ B16-F10.

[0296] A FIG. 140 mostra o esquema experimental. Resumidamente, células de tumor WT ou $b2M^{-/-}$ B16-F10 ($2x10^5$) (que foram geradas pela tecnologia CRISPR-cas9 no laboratório dos inventores) foram implantadas por via intradermica nos flancos direitos de camundongos C57BL/6J. 10 dias após a implantação do tumor, os tumores foram injetados com MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40L duas vezes por semana. Os volumes do tumor foram medidos e a sobrevivência dos camundongos foi monitorada.

[0297] A FIG. 141A mostra os volumes de tumor dos tumores WT e $b2M^{-/-}$ B16-F10 injetados em camundongos tratados com PBS ou MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L por via intratumoral. **A FIG. 141B** mostra a curva de sobrevivência de Kaplan Meier dos quatro grupos.

[0298] As FIGS. 142-148 são uma série de representações gráficas de dados que mostram que a injeção intratumoral de MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40L gerou mais células T efetoras infiltrantes de tumor ativadas e porcentagem reduzida de macrófagos e DCs em tumores injetados em comparação com MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L em um modelo de implantação de tumor bilateral AT3.

[0299] A FIG. 142 mostra o esquema experimental. Resumidamente, 10^5 AT3 células de câncer da mama foram implantados no 4º tecido adiposo de camundongos C57B/6J. Doze dias após a implantação do tumor, $6x10^7$ pfu de MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40L ou PBS foi injetado por via intratumoral (IT) nos tumores em ambos os flancos duas vezes, com três dias de intervalo. Os tumores injetados foram isolados. Linfócitos infiltrantes de tumor e células mielóides foram analisados por FACS.

[0300] A FIG. 143A mostra os gráficos de pontos representativos de células Granzyme B^+ $CD8^+$ T em tumores injetados após tratamento com MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L, ou MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40L. **A FIG. 143B** mostra o gráfico de porcentagens de células $CD8^+$ T fora das células $CD45^+$. Dados são médias±SEM (n=4-6). (***P*<0.01; ****P*<0.001, *teste t*). **A FIG. 143C** mostra o gráfico do número absoluto de células $CD8^+$ T. Dados são médias±SEM (n=4-6). (***P*<0.01; ****P*<0.001, *teste t*). **A FIG. 143D** mostra o gráfico de porcentagens de células B+ CD8+ T Granzyme fora das células $CD8^{+\cdot}$ Dados são médias±SEM (n=4-6) (** *P* <0,01; *** *P* <0,001, *teste t*). **A FIG. 143E** mostra o gráfico do número absoluto de células Granzyme B^+ $CD8^+$ $T^{\cdot}$ Dados são médias±SEM (n=4-6) (** *P* <0,01; *** *P* <0,001, *teste t*).

[0301] A FIG. 144A mostra os gráficos de pontos representativos de células $Ki67^+$ $CD8^+$ T em tumores injetados após tratamento com MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L ou MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40L. **A FIG. 144B** mostra o gráfico de porcentagens de células $Ki67^+$ $CD8^+$ T fora de células $CD8^{+\cdot}$ Os

dados são médias ±SEM (n=4-6) (**P <0,01; ***P <0,001, *teste t*). **A FIG. 144C** mostra o gráfico do número absoluto de células Ki67$^+$ CD8$^+$ T. Dados são médias±SEM (n=4-6) (** P <0,01; *** P <0,001, *teste t*).

[0302] A FIG. 145A mostra os gráficos de pontos representativos de células Granzyme B$^+$ CD4$^+$ T em tumores injetados após tratamento com MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40L. **A FIG. 145B** mostra o gráfico de porcentagens de células CD4$^+$ T fora das células CD3$^+$. Dados são médias±SEM (n=4-6). (**P<0.01; ***P<0.001, *teste t*). **A FIG. 145C** mostra o gráfico do número absoluto de células CD4$^+$ T. Dados são médias±SEM (n=4-6). (**P<0.01; ***P<0.001, *teste t*). **A FIG. 145D** mostra o gráfico de porcentagens de células B+ CD4+ T Granzyme fora das células CD4$^+$. Dados são médias±SEM (n=4-6) (** P <0,01; *** P <0,001, *teste t*). **A FIG. 145E** mostra o gráfico do número absoluto de células Granzyme B$^+$ CD4$^+$ T. Dados são médias de □Células T. Dados a P <0,01; *** P <0,001, *teste t*).

[0303] A FIG. 146A mostra os gráficos de pontos representativos de células FoxP3$^+$ CD4$^+$ T em tumores injetados após tratamento com MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L ou MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40L. **A FIG. 146B** mostra o gráfico de porcentagens de células FoxP3$^+$ CD4$^+$ T fora das células CD4$^+$. Dados são médias±SEM (n=4-6). (**P<0.01; ***P<0.001, *teste t*). **A FIG. 146C** mostra o gráfico do número absoluto de células FoxP3$^+$ CD4$^+$ T. Dados são médias ±SEM. Os dados são P <0,01; *** P <0,001, *teste t*).

[0304] A FIG. 147A mostra os gráficos de pontos representativos de células OX40$^+$FoxP3$^+$ CD4$^+$ T em tumores injetados após tratamento com MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L ou MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40L. **A FIG. 147B** mostra o gráfico de porcentagens de células OX40$^+$FoxP3$^+$ CD4$^+$ T fora das células FoxP3$^+$CD4$^+$. Dados são médias±SEM (n=4-6). (**P<0.01; ***P<0.001, *teste t*). **A FIG. 147 C** mostra o gráfico do número absoluto de células OX40$^+$FoxP3$^+$CD4$^+$ T. Dados são médias±SEM (n=4-6). (**P<0.01; ***P<0.001, *teste t*).

[0305] As FIGS. 148A-148H são séries de dados que mostram que a injeção intratumoral de MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L ou MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40L reduz a porcentagem de macrófagos e DCs em tumores injetados. **A FIG. 148A** mostra o gráfico de porcentagens de macrófagos em tumores injetados após o tratamento com MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L ou MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40L. Dados são médias±SEM (n=4-6). **A FIG. 148B** mostra o gráfico do número absoluto de macrófagos. Dados são médias±SEM (n=4-6). (***P*<0.01; ****P*<0.001, *teste t*). **A FIG. 148C** mostra o gráfico de porcentagens de CDs. Dados são médias±SEM (n=4-6). (***P*<0.01; ****P*<0.001, *teste t*). **A FIG. 148D** mostra o gráfico do número absoluto de CDs. Dados são médias±SEM (n=4-6). (***P*<0.01; ****P*<0.001, *teste t*). **A FIG. 148E** mostra o gráfico de porcentagens de $CD11b^+$DCs. Dados são médias±SEM (n=4-6). (***P*<0.01; ****P*<0.001, *teste t*). **A FIG. 148F** mostra o gráfico do número absoluto de $CD11b^+$DCs. Dados são médias±SEM (n=4-6). (***P*<0.01; ****P*<0.001, *teste t*). **A FIG. 148G** mostra o gráfico de porcentagens de $CD103^+$DCs. Dados são médias±SEM (n=4-6). (***P*<0.01; ****P*<0.001, *teste t*). **A FIG. 148H** mostra o gráfico do número absoluto de $CD103^+$DCs. Dados são médias±SEM (n=4-6). (***P*<0.01; ****P*<0.001, *teste t*).

[0306] As FIGS. 149-150 são uma série de representações gráficas de dados que mostram que a combinação de injeção intratumoral de MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40L com anticorpo anti-PD-L1 e anti-CTLA-4 teve eficácia anti-tumor superior no modelo de câncer de mama MMTV-PyMT. **A FIG. 149** mostra o esquema experimental. Após o primeiro tumor se tornar palpável, $4x10^7$ pfu de MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40L ou PBS foi injetado por via intratumoral (IT) nos tumores duas vezes por semana. 250 µg de Anti-PD-L1 e 100 µg de anticorpo anti-CTLA-4 ou anticorpo de controle de isotipo foram injetados por via intraperitoneal em cada camundongo, duas vezes por semana. Os volumes dos tumores foram medidos duas vezes por semana. **A FIG. 150** mostra o gráfico da curva de crescimento do tumor após o tratamento

com IT MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40L e anticorpo IP anti-PD-L1 e anti-CTLA-4. Dados são médias±SEM (n=3-4).

[0307] As FIGS. 151-152B são uma série de representações gráficas de dados que mostram que a deleção do gene C11R a partir de MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L aumenta a produção de IFN em BMDCs.

[0308] A FIG. 151 é um diagrama esquemático de recombinação homóloga para gerar MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40ΔC11R.

[0309] As FIGS. 152A-152B mostram que a infecção por MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40ΔC11R de BMDCs induz níveis mais elevados de expressão do gene IFNB (**FIG. 152A**) e secreção de proteína (**FIG. 152B**) em comparação com MVAΔE5R ou MVA. BMDCs a partir de camundongos WT foram infectados com MVA, MVAΔE5R ou MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40ΔC11R em um MOI de 10. Para avaliar a expressão do gene IFNB, as células foram coletadas 6h após a infecção e os RNAs foram extraídos. Análises de RT-PCR quantitativas foram realizadas para examinar a expressão do gene IFNB. Para testar a secreção da proteína IFN-b a partir de BMDCs, os sobrenadantes foram coletados 19h após a infecção. Os níveis de proteína IFN-b foram determinados por ELISA.

[0310] As FIGS. 153-154C são uma série de representações gráficas de dados que mostram que a deleção do gene WR199 a partir de MVA MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L aumenta a produção de IFN em BMDCs.

[0311] A FIG. 153 é um diagrama esquemático de recombinação homóloga para gerar MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40ΔWR199. A recombinação homóloga que ocorreu nos loci B17L e B19R resulta na deleção de WR199 e na inserção do cassete de expressão para mcherry flanqueado por dois sítios FRT.

[0312] A FIG. 154A mostra a expressão do gene IFNB em PBS, MVA, MVAΔWR199 ou Heat-iMVA, infectados por BMDCs a partir de de camundongos WT ou $cGAS^{-/-}$ em um MOI de 10. **As FIGS. 154B-154C**

mostram que a infecção por MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40ΔC11R de BMDCs induz níveis mais elevados de expressão do gene IFNB (**FIG. 154B**) e secreção de proteínas (**FIG. 154C**) em comparação com MVAΔE5R ou MVA. BMDCs a partir de camundongos WT foram infectados com MVA, MVAΔE5R ou MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40ΔC11R em um MOI de 10. Para avaliar a expressão do gene IFNB, as células foram coletadas 6h após a infecção e os RNAs foram extraídos. Análises de RT-PCR quantitativas foram realizadas para examinar a expressão do gene IFNB. Para testar a secreção da proteína IFN-ß partir de BMDCs, os sobrenadantes foram coletados 19h após a infecção. Os níveis de proteína IFN-ß foram determinados por ELISA.

[0313] A FIG. 155 mostra um esquema de geração de vírus VACVΔB2R recombinante por meio de de recombinação homóloga nos loci B1R e B3R do genoma do vírus vaccinia (WR). A recombinação homóloga que ocorreu nos loci B1R e B3R resulta na deleção do gene B2R do genoma do vírus vaccinia (WR).

[0314] As FIGS. 156A-156B mostram que VACVΔB2R foi altamente atenuado em um modelo de infecção intranasal. **A FIG. 156A** mostra a perda de peso após infecção intranasal com dose alta de VACVΔB2R (H, $2x10^7$ pfu) ou dose baixa de VACVΔB2R (L, $2x10^6$ pfu). **A FIG. 156B** mostra as curvas de sobrevivência Kaplan-Meier de camundongos infectados intranasais com alta dose de VACVΔB2R (H, $2x0^7$ pfu) ou baixa dose de VACVΔB2R (L, $2x10^6$ pfu).

[0315] As FIGS. 157A-157B mostra um diagrama esquemático de geração de vírus VACVΔE3L83NΔB2R, VACVΔE5RΔB2R e VACVΔE3L83NΔE5RΔB2R recombinantes. **A FIG. 157A** mostra que VACVΔE3L83NΔB2R foi gerado por meio de de recombinação homóloga nos loci B1R e B3R do genoma de vaccinia VACVΔE3L83N, resultando na deleção do gene B2R a partir do genoma de VACV3E3L83N. **A FIG. 157B** mostra que VACVΔE5RΔB2R e VACVΔE3L83NΔE5RΔB2R são gerados por meio de de recombinação homóloga nos loci B1R e B3R do genoma de vaccinia VACVΔE5R ou VACVΔE3L83NΔE5R, respectivamente. A recombinação

homóloga que ocorreu nos loci B1R e B3R resulta na deleção do gene B2R do genoma de VACVΔE5R ou VACVΔE3L83NΔE5R, respectivamente.

[0316] A FIG. 158 mostra que VACVΔE3L83NΔE5R, VACVΔE5RΔB2R e VACVΔE3L83NΔE5RΔB2R são altamente atenuados em um modelo de infecção intranasal. Os camundongos WT foram infectados por via intranasal com $2x10^7$ pfu de VACVΔB2R, VACVΔE5R, VACVΔE3L83NΔE5R, VACVΔE5RΔB2R, ou VACVΔE3L83NΔE5RΔB2R, e a sobrevivência e a perda de peso foram monitoradas diariamente. Esta figura mostra a perda de peso após a infecção intranasal por esses cinco vírus diferentes.

[0317] As FIGS. 159A-159B mostram que a infecção por VACVΔE5RΔB2R e VACVΔE3L83NΔE5RΔB2R de BMDC murino induzem níveis mais elevados de expressão do gene IFNB e secreção de proteína IFN-γ em comparação com VACVΔB2R ou VACVΔE5R. **A FIG. 159A** mostra a expressão do gene IFNB em células BMDC knockout WT e cGAS infectadas por VACV, VACVΔ83N, VACVΔB2R, VACVΔE5R, VACVΔE5RΔB2R, VACVΔE3L83NΔE5R, ou VACVΔE3L83NΔE5RΔB2R em um MOI de 10. As células foram coletadas 6 horas após a infecção e os RNAs foram extraídos. Análises de RT-PCR quantitativas foram realizadas para examinar a expressão do gene IFNB. **A FIG. 159B** mostra a secreção de proteína IFN-γ por células BMDC knockout WT e cGAS infectadas por VACV, VACVΔ83N, VACVΔB2R, VACVΔE5R, VACVΔE5RΔB2R, VACVΔE3L83NΔE5R, ou VACVΔE3L83NΔE5RΔB2R a um MOI de 10. Os sobrenadantes foram coletados 24h após a infecção e os níveis de proteína IFN-γ nos sobrenadantes foram determinados por ELISA.

[0318] A FIG. 160 mostra que a infecção de VACVΔE5RΔB2R e VACVΔE3L83NΔE5RΔB2R de BMDC murino induz níveis mais elevados de fosforilação de STING, IRF3 e TBK1 em comparação com VACVΔB2R ou VACVΔE5R. As células WT BMDC foram infectadas com VACV, VACVΔB2R, VACVΔE5R, VACVΔE5RΔB2R, VACVΔE3L83NΔE5R ou

VACVΔE3L83NΔE5RΔB2R a um MOI de 10. A lise de células foi coletada em diferentes pontos de tempo. A fosforilação de STING, IRF3 e TBK1 foi detectada por anticorpos contra STING, IRF3 e TBK1, fosforilado respectivamente.

[0319] A FIG. 161 mostra um esquema de estratégia passo a passo para gerar vírus VACVΔE3L83NΔTKΔE5R recombinante expressando anticorpo anti-muCTLA-4 e proteínas hFlt3L, mOX40L e mIL12 por meio de de recombinação homóloga primeiro no TK e depois nos loci E5R do VACVΔ Genoma E3L83N. O vetor pCB foi usado para inserir um único cassete de expressão para expressar as cadeias pesadas e leves do anticorpo anti-muCTLA-4 sob o controle do promotor inicial e tardio sintético do vírus vaccinia (PsE/L). A recombinação homóloga que ocorreu nos sítios TK-L e TK-R resulta na inserção do cassete de expressão do anticorpo anti-muCTLA-4 no locus TK no genoma de VACVΔE3L83N. O vetor pUC57 foi usado para inserir dois cassetes de expressão projetados para expressar a proteína de fusão hFlt3L-mOX40L e mIL-12 usando o promotor inicial e tardio sintético viral de vaccinia (PsE/L). A sequência de codificação do hFlt3L-mOX40L foi separada por um sítio de clivagem de furina seguido por uma sequência Pep2A. A sequência de codificação das subunidades p40 e p30 de mIL12 foi separada por um sítio de clivagem de furina seguido por uma sequência Pep2A. O terminal C da subunidade p30 foi marcado com uma sequência de ligação à matriz. A recombinação homóloga nos loci E4L e E6R resulta na inserção do cassete de expressão para hFlt3L-mOX40L e mIL12 no locus E5L do genoma de VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-muCTLA-4.

[0320] A FIG. 162 mostra um esquema de geração de vírus VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-muCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-mOX40L-mIL-12
recombinante com deleção do gene B2R por meio de de recombinação homóloga nos loci B1R e B3R do genoma de VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-muCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-mOX40L-mIL-12 (OV-VACVΔE5R). A recombinação homóloga que ocorreu nos loci B1R e B3R resulta na deleção do gene B2R do

genoma a partir do vírus para gerar o vírus VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-muCTLA-4ΔE5R-hFlt3L-mOX40L-mIL-12-ΔB2R (OV-VACVΔE5RΔB2R).

[0321] A FIG. 163 mostra uma curva de crescimento de várias etapas dos vírus recombinantes VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-muCTLA-4ΔE5R-hFlt3L-mOX40L-mIL-12 (OV-VACVΔE5R) e VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-muCTLA-4ΔE5R-hFlt3L-mOX40L-mIL-12-ΔB2R (OV-VACVΔE5RΔB2R) em células BSC40 em comparação com WT VACV. As células BSC40 foram infectadas com VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-muCTLA-4ΔE5R-hFlt3L-mOX40L-mIL-12, e VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-muCTLA-4ΔE5R-hFlt3L-mOX40L-mIL-12-ΔB2R a um MOI de 0,01. As amostras de vírus foram coletadas em diferentes pontos de tempo e os títulos de vírus foram determinados usando células BSC40.

[0322] As FIGS. 164A-164B mostra que a infecção por VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-muCTLA-4ΔE5R-hFlt3L-mOX40L-mIL-12-ΔB2R (OV-VACVΔE5RΔB2R) de BMDC murino induz níveis mais elevados de expressão do gene IFNB e secreção de proteína IFN-γ em comparação com VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-muCTLA-4ΔE5R-hFlt3L-mOX40L-mIL-12 (OV-VACVΔE5R). **A FIG. 164A** mostra a expressão do gene IFNB em células WT BMDC infectadas com VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-muCTLA-4ΔE5R-hFlt3L-mOX40L-mIL-12, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-muCTLA-4ΔE5R-hFlt3L-mOX40L-mIL-12-ΔB2R, ou Heat-iMVA a um MOI de 10. As células foram coletadas 6 horas após a infecção e os RNAs foram extraídos. Análises de RT-PCR quantitativas foram realizadas para examinar a expressão do gene IFNB. **A FIG. 164B** mostra a secreção da proteína IFN-γ na mesma infecção que na **FIG. 164A**. Os sobrenadantes foram coletados 24h após a infecção e os níveis de proteína IFN-γ nos sobrenadantes foram determinados por ELISA.

[0323] As FIGS. 165A-165C mostram a expressão dos transgenes anti-muCTLA-4, mOX40L ou Flt3L humano em VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-muCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-mOX40L-mIL-12 (OV-VACVΔE5R) infectadas por células B16-F10 e em tumores injetados com vírus. **A FIG. 165A** mostra um western blot demonstrando que o anti-CTLA-4 murino e o Flt3L humano são

expressos em VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-muCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-mOX40L-mIL-12 (OV-VACVΔE5R) infectado por células B16-F10. FL: comprimento total do anti-muCTLA-4; HC: cadeia pesada de anti-muCTLA-4; LC: cadeia leve de anti-muCTLA-4. **A FIG. 165B** mostra um gráfico de pontos da análise FACS da expressão de mOX40 em células de melanoma murino B16-F10. As células foram infectadas com VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-muCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-mOX40L-mIL-12 (expressando GFP) a um MOI de 10 por 24 h. Nenhum controle de infecção simulada por vírus foi incluído. As células foram coradas com anticorpo anti-mOX40L. **A FIG. 165C** mostra a expressão de mIL-12 em tumores de melanoma B16-F10 após injeção intratumoral de vírus VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-muCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-mOX40L-mIL-12 (OV-VACVΔE5R). Tumores de melanoma B16-F10 implantados por via intradermal foram injetados com 4x10 ^{7} pfu de VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-muCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-mOX40L-mIL-12 (OV-VACVΔE5R) em 100 µL de PBS e os tumores foram coletados 48 horas após o tratamento. Amostras de tumor foram lisadas e a expressão de IL-12 murino foi examinada por western blot usando anticorpo anti-p40.

[0324] As FIGS. 166A-166D. **As FIGS. 166A-166C** mostram a expressão e secreção de IL-12 murino após infecção por vírus VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-muCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-mOX40L-mIL-12 (OV-VACVΔE5R) de três vírus murinos diferentes linhagens de células de câncer. As células de tumor foram infectadas com VACV, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-muCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-mOX40L-mIL-12 ou falsamente infectadas. O sobrenadante foi coletado 24 e 48 horas após a infecção do vírus e a concentração de IL-12 no sobrenadante da cultura de células foi determinada por ELISA. **A FIG. 166A** mostra os níveis de mIL-12 em células de melanoma B16-F10 infectadas com OV-VACVΔE5R. **A FIG. 166B** mostra os níveis de mIL-12 em células de mama 4T1 infectadas com OV-VACVΔE5R. **A FIG. 166C** mostra os níveis de mIL-12 em células de câncer de cólon MC38 infectadas com OV-VACVΔE5R. **A FIG. 166D** mostra os níveis de mIL-12 séricos em camundongos tratados com OV-

VACVΔE5R. Às 48h e 72h após a injeção intratumoral do vírus, os camundongos foram sacrificados e sangue/soro foi coletado para medição de citocinas por ELISA.

[0325] As FIGS. 167A-167B mostra a eficácia anti tumoral da administração intra tumoral de VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-muCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-mOX40L-mIL-12 (OV-VACVΔE5R) quer sozinho ou em combinação com anticorpo anti-PD-L1 em um modelo de implantação de tumor B16-F10 bilateral. Resumidamente, células de melanoma B16-F10 foram implantadas intradermicamente nos flancos esquerdo e direito de camundongos C57B/6J ($5x10^5$ no flanco direito e $1x10^5$ no flanco esquerdo). Sete dias após a implantação do tumor, 4 $x10^7$ pfu quer de VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-muCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-mOX40L-mIL-12 (OV-VACVΔE5R), Heat-iMVA, ou PBS foi injetado por via intratumoral (IT) nos tumores maiores no flanco direito duas vezes por semana. Um grupo de camundongos também recebeu anticorpo anti-PD-L1 (250 μg) duas vezes por semana em conjunto com IT de VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-muCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-mOX40L-mIL-12 (OV-VACVΔE5R). Os volumes do tumor e a sobrevivência dos camundongos foram monitorados. **A FIG. 167A** mostra os volumes de tumor de ambos tumores injetados e não injetados em camundongos tratados com PBS ou VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-muCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-mOX40L-mIL-12 (OV-VACVΔE5R), Heat-iMVA por via intratumoral, ou com a combinação de IT de VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-muCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-mOX40L-mIL-12 (OV-VACVΔE5R) mais IP anti-PD-L1 **A FIG. 167B** mostra a curva de sobrevivência de Kaplan Meier dos quatro grupos.

[0326] As FIGS. 168A-168B mostram que a injeção intratumoral de VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-muCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-mOX40L-mIL-12ΔB2R (OV-VACVΔE5RΔB2R) gerou células T específicas anti tumorais mais fortes nos baços em comparação com VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-muCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-mOX40L-mIL-12 (OV-VACVΔE5R) ou Heat-iMVA. Resumidamente, células de melanoma B16-F10 foram implantadas intradermicamente nos flancos

esquerdo e direito de camundongos C57B/6J ($5x10^5$ no flanco direito e $2,5x10^5$ no flanco esquerdo). Sete dias após a implantação do tumor, $4x10^7$ pfu de OV-VACVΔE5RΔB2R, OV-VACVΔE5R, uma quantidade equivalente de Heat-iMVA ou PBS foi injetado por via intratumoral (IT) no maior tumores no flanco direito duas vezes, com três dias de intervalo. Os baços foram coletados 2 dias após a segunda injeção, as análises ELISPOT foram realizadas para avaliar as células T específicas do tumor nos baços. O ensaio ELISPOT foi realizado por co-cultura de células B16-F10 irradiadas (150.000) e esplenócitos (1.000.000) em uma placa de 96 cavidades. **A FIG. 168A:** Gráfico dos pontos de IFN-γ $^+$ por 1.000.000 de esplenócitos. Cada ponto representa esplenócitos de um camundongo individual (n=4) (* *P* <0,05; ** *P* <0,01, **** *P* <0,0001, *teste t*). **A FIG. 168B:** Imagem de ELISPOT de amostras em triplicado de esplenócitos combinados de camundongos no mesmo grupo de tratamento.

[0327] A FIG. 169 mostra um esquema de estratégia passo a passo para gerar vírus VACVΔE3L83NΔTKΔE5R recombinante expressando anticorpo anti-huCTLA-4 e proteínas hFlt3L, hOX40L e hIL12 por meio de de recombinação homóloga primeiro no TK e depois nos loci E5R do VACVΔ Genoma E3L83N. O vetor pCB foi usado para inserir um único cassete de expressão para expressar as cadeias pesadas e leves do anticorpo anti-huCTLA-4 sob o controle do promotor inicial e tardio sintético do vírus vaccinia (PsE/L). A recombinação homóloga que ocorreu nos sítios TK-L e TK-R resulta na inserção do cassete de expressão do anticorpo anti-huCTLA-4 no locus TK no genoma de VACVΔE3L83N, que foi gerado pela deleção do fragmento de DNA do gene E3L que codifica o N -terminal do aminoácido 83. O vetor pUC57 foi usado para inserir dois cassetes de expressão projetados para expressar a proteína de fusão hFlt3L-hOX40L e mIL-12 usando o promotor inicial e tardio sintético viral de vaccinia (PsE/L). A sequência de codificação do hFlt3L-mOX40L foi separada por um sítio de clivagem de furina seguido por uma sequência Pep2A. A sequência de codificação das subunidades p40 e p30 de hIL12 foi separada por um sítio de clivagem de furina seguido por uma

sequência Pep2A. O terminal C da subunidade p30 foi marcado com uma sequência de ligação à matriz. A recombinação homóloga nos loci E4L e E6R resulta na inserção do cassete de expressão para hFlt3L-hOX40L e hIL12 no locus E5L do genoma de VACV∆E3L83N-∆TK-anti-muCTLA-4.

[0328] A FIG. 170 mostra um esquema de geração de vírus mixoma recombinante (cepa Lausanne) com deleção do gene M063R por meio de de recombinação homóloga nos loci M062R e M064R do genoma mixoma∆M127-mcherry, bem como geração de vírus mixoma recombinante (cepa Lausanne) com deleção de gene M064R por meio de de recombinação homóloga nos loci M063R e M065R do genoma de mixoma∆M127-mcherry. A recombinação homóloga que ocorreu nos loci M062R e M064R resulta na deleção do gene M063R a partir do genoma do vírus para gerar o vírus Mixoma∆M063R. A recombinação homóloga que ocorreu nos loci M063R e M065R resulta na deleção do gene M064R a partir do genoma do vírus para gerar o vírus Mixoma∆M064R.

[0329] As FIGS. 171A-171B mostram que a infecção de Mixoma∆M064R e Mixoma∆M063R de BMDC murino induzem níveis mais elevados de expressão do gene IFNB e secreção de proteína IFN-B em comparação com o vírus mixoma parental expressando mcherry (Mixoma-mcherry), que também contém uma deleção do gene M0127. As células BMDC foram infectadas com Mixoma-mcherry, Mixoma∆M063R, Mixoma∆M064R ou MVA em um MOI de 10. As células foram coletadas 6 horas após a infecção e os RNAs foram extraídos. Análises de RT-PCR quantitativas foram realizadas para examinar a expressão do gene IFNB. **A FIG. 171A** mostra o resultado de RT-PCR da expressão do gene IFNB em BMDCs infectados. Os sobrenadantes foram coletados 24h após a infecção e os níveis de proteína IFN-B nos sobrenadantes foram determinados por ELISA. **A FIG. 171B** mostra os resultados de ELISA dos níveis de proteína IFN-B nos sobrenadantes de BMDCs infectados.

[0330] As FIGS. 172-174B são uma série de representações gráficas de dados que mostram que a injeção intratumoral de mixomaΔM064R ou mixoma-mcherry leva à ativação de células $CD4^+$ e $CD8^+$ T efetoras em um modelo de melanoma B16-F10. **A FIG. 172** mostra o esquema experimental. Resumidamente, células de melanoma B16-F10 foram implantadas intradermicamente nos flancos esquerdo e direito de camundongos C57B/6J ($5x10^5$ no flanco direito e $2,5x10^5$ no flanco esquerdo). Sete dias após a implantação do tumor, 2 $x10^7$ pfu quer de Mixoma-mCherry, MixomaΔM064R, MVAΔE5R ou PBS, foi injetado por via intratumoral (IT) nos tumores maiores no flanco direito duas vezes por semana. Dois dias após a injeção, os tumores injetados foram isolados e os linfócitos infiltrantes do tumor foram analisados por FACS. **A FIG. 172** mostra que a injeção intra tumoral de mixomaΔ0M64R ou mixoma-mcherry leva à ativação de células $CD4^+$ e $CD8^+$ T efetoras em um modelo de melanoma B16-F10.

[0331] A FIG. 173A mostra os gráficos de pontos representativos de células Granzyme B^+ $CD8^+$ T em tumores injetados após tratamento com Mixoma-mCherry, MixomaΔM064R, MVAΔE5R ou PBS. **A FIG. 173B** mostra o gráfico do número absoluto de células $CD45^+$ nos tumores injetados. Dados são médias±SEM (n=5-8). **A FIG. 173C** mostra o gráfico de porcentagens de células B+ CD8+ T Granzyme fora das células $CD8^+$. Dados são médias ±SEM (n=5-8) (* *P* <0,05; teste t).

[0332] A FIG. 174A mostra os gráficos de pontos representativos de células Granzyme B^+ $CD4^+$ T em tumores injetados após tratamento com Mixoma-mCherry, MixomaΔM064R, MVAΔE5R ou PBS. **A FIG. 174B** mostra o gráfico de porcentagens de células Granzyme B^+ $CD4^+$ T fora das células $CD4^+$ T. Dados são méidas ±SEM (n=5-8) (** *P* <0,01; *** *P* <0,001; **** *P* <0,0001, *teste t*).

DESCRIÇÃO DETALHADA

[0333] Deve ser apreciado que certos aspectos, modos, modalidades, variações e recursos da presente tecnologa são descritos abaixo em vários níveis de detalhes, com o intuito de fornecer uma compreensão substancial da presente tecnologia.

I. Definições

[0334] As definições de certos termos usados neste relatório são fornecidas abaixo. A menos que definido de outra forma, todos os termos técnicos e científicos usados neste documento, em geral, têm o mesmo significado como comumente entendido por alguém versado na técnica à qual esta tecnologia pertence.

[0335] Conforme usado neste relatório descritivo e nas reivindicações, as formas singulares "um", "uma" e "o,a" incluem referentes plurais, a menos que o conteúdo indique claramente o contrário. Por exemplo, a referência a "uma célula" inclui uma combinação de duas ou mais células e similares.

[0336] Conforme usado neste documento, o termo "cerca de" abrange a faixa de erro experimental que pode ocorrer em uma medição e será claro para o versado na técnica.

[0337] Conforme usado neste documento, o termo "adjuvante" se refere a uma substância que aumenta, aumenta ou potencializa a resposta imunológica do hospedeiro aos antígenos, incluindo antígenos tumorais.

[0338] Conforme usado neste documento, a "administração" de um agente ou fármaco a um indivíduo inclui qualquer via de introdução ou administração a um indivíduo de um composto para realizar sua função pretendida. A administração pode ser realizada por qualquer via adequada, incluindo, mas não se limitando a, oral, intranasal, parenteral (intravenosa, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal ou subcutânea), retal, intratecal, intratumoral ou topicamente. A administração inclui a autoadministração e a administração por outrem.

[0339] Conforme usado neste documento, um "antígeno" se refere a uma molécula à qual um anticorpo (ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo) pode se ligar seletivamente. O antígeno alvo pode ser uma proteína, carboidrato, ácido nucleico, lipídeo, hapteno ou outro composto de ocorrência natural ou sintético. Em algumas modalidades, o antígeno está contido em uma célula integral, como em uma vacina de célula integral contendo antígeno tumoral. Em algumas modalidades, o antígeno alvo abrange antígenos relacionados ao câncer ou neoantígenos e inclui proteínas ou outras moléculas expressas por cânceres tumorais ou não tumorais, como moléculas que estão presentes em células de câncer, mas ausentes em células não de não câncer, e moléculas que são regulados positivamente em células de câncer em comparação com células não cancerosas.

[0340] Conforme usado neste documento, "atenuado", conforme usado em conjunto com um vírus, refere-se a um vírus com virulência ou patogenicidade reduzida em comparação com uma contraparte não atenuada, mas ainda é viável ou vivo. Normalmente, a atenuação torna um agente infeccioso, como um vírus, menos prejudicial ou virulento para um indivíduo infectado em comparação com um vírus não atenuado. Isso contrasta com um vírus morto ou completamente inativado.

[0341] Conforme usado neste documento, "administração conjunta" refere-se à administração de uma segunda modalidade terapêutica em combinação com um ou mais poxvírus manipulados da presente tecnologia (*por exemplo*, MVAΔE3L-OX40L, MVAΔC7L-OX40L, MVAΔC7L-hFlt3L-OX40L, MVAΔC7LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, VACVΔC7L-OX40L, VACVΔC7L-hFlt3L-OX40L, VACVΔE5R, VACV-TK^{-}-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L, VACVΔB2R, VACVE3LΔ83NΔB2R, VACVΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83NΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12-ΔB2R, MYXVΔM31R,

MYXV∆M31R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM63R, MYXVΔM64R, MVAΔWR199, e/ou MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔWR199). Por exemplo, um agente de bloqueio de ponto de verificação imunológico, agente imunomodulador e/ou medicamento anticâncer administrado em estreita proximidade temporal com um ou mais poxvírus manipulados da presente tecnologia (*por exemplo*, MVAΔE3L-OX40L, MVAΔC7L-OX40L, MVAΔC7L-hFlt3L-OX40L, MVAΔC7LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, VACVΔC7L-OX40L, VACVΔC7L-hFlt3L-OX40L, VACVΔE5R, VACV-TK^{-}-anti-CTLA-4-∆E5R-hFlt3L-OX40L, VACVΔB2R, VACVE3LΔ83NΔB2R, VACVΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83NΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12-ΔB2R, MYXVΔM31R, MYXV∆M31R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM63R, MYXVΔM64R, MVAΔWR199, e/ou MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔWR199). Por exemplo, um inibidor PD-1/PD-L1 e/ou um inibidor CTLA-4 (em modalidades mais específicas, um anticorpo) pode ser administrado simultaneamente (*ou seja*, simultaneamente) com um ou mais poxvírus manipulados da presente tecnologia (*por exemplo*, MVAΔE3L-OX40L, MVAΔC7L-OX40L, MVAΔC7L-hFlt3L-OX40L, MVAΔC7LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, VACVΔC7L -OX40L, VACVΔC7L-hFlt3L-OX40L, VACVΔE5R, VACV-TK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L, VACVΔB2R, VACVE3LΔ83NΔB2R, VACVΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83NΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L -OX40L-IL-12, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12-ΔB2R, MYXVΔM31R, MYXV∆M31R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM63R64 hFlt3L-OX40L-ΔWR199) (por injeção intravenosa ou intratumoral quando o MVAΔE3L-OX40L, MVAΔC7L-OX40L, MVAΔC7L-hFlt3L-OX40L, MVAΔC7LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L- OX40L-ΔC11R, MVAΔE3L ΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, VACVΔC7L-

OX40L, VACVΔC7L-hFlt3L-OX40L, VACVΔE5R, VACV-TK--anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L, VACVΔB2R, VACVE3LΔ83NΔB2R, VACVΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83NΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83N-ΔTK- anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12-ΔB2R, MYXVΔM31R, MYXV∆M31R-hFlt3L63R, MYXV∆M31R-hFlt3L63R, MYXV∆M31R-hFlt3R, MYXV∆M31R-hFlt3L MYXVΔM64R, MVAΔWR199, e/ou MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔWR199 é administrado intratumoralmente ou sistemicamente como indicado acima) ou antes ou depois da MVAΔE3L-OX40L, MVAΔC7L-OX40L, MVAΔC7L-hFlt3L-OX40L, MVAΔC7LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R- hFlt3L-OX40L, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, VACVΔC7L-OX40L, VACVΔC7L-hFlt3L-OX40L, VACVΔE5R, VACV-TK--anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L, VACVΔB2R, VACVE3LΔ83NΔB2R, VACVΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83NΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L- IL-12-ΔB2R, MYXVΔM31R, MYXV∆M31R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM63R, MYXVΔM64R, MVAΔWR199, e/ou administração de MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔWR199. Em algumas modalidades, se o MVAΔE3L-OX40L, MVAΔC7L-OX40L, MVAΔC7L-hFlt3L-OX40L, MVAΔC7LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L- OX40L-ΔC11R, VACVΔC7L-OX40L, VACVΔC7L-hFlt3L-OX40L, VACVΔE5R, VACV-TK--anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L, VACVΔB2R, VACVE3LΔ83NΔB2R, VACVΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83NΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA- 4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12-ΔB2R, MYXVΔM31R, MYXV∆M31R-hFΔMlt3L-OX40L63, MYXVΔM31R, MYXV∆M31M-hFΔMlt3LR-OX40L63, MYXV∆M31R-hFΔMlt3LR-OXVA6363, MYXV∆M31R63 e/ou administração de MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔWR199 e o agente de bloqueio do ponto de verificação imunológico, agente imunomodulador e/ou medicamento anticâncer são administrados com cerca

de 1 a cerca de 7 dias ou mesmo até três semanas de intervalo, isso ainda estaria dentro "proximidade temporal estreita", conforme declarado neste documento, portanto, tal administração será qualificada como "conjunta".

[0342] O termo "cepa de tipo selvagem correspondente" ou "vírus tipo selvagem correspondente" é usado neste documento para se referir à cepa de MVA de tipo selvagem, vírus vaccinia (VACV) ou vírus mixoma (MYXV) a partir da qual o MVA modificado, vaccinia, ou cepa de mixoma ou vírus foi derivado. Conforme usado neste documento, uma cepa ou vírus MVA, vaccinia ou mixoma de tipo selvagem é uma cepa ou vírus que não foi projetado para interromper ou deletar (nocaute) um determinado gene de interesse e/ou para expressar um ácido nucleico heterólogo. Por exemplo, em algumas modalidades, uma cepa ou vírus MVA, vaccinia ou mixoma de tipo selvagem é uma cepa ou vírus que não foi manipulado para interromper ou deletar (nocaute) o gene C7 e expressar OX40L. Em outras modalidades, uma cepa ou vírus MVA, vaccinia ou mixoma de tipo selvagem é uma cepa ou vírus que não foi projetado para interromper ou deletar (nocaute) o gene E5R (ou M31R). A cepa ou vírus MVA, vaccinia ou mixoma manipulado pode ter sido modificado para interromper ou deletar (nocaute) o gene C7 e expressar OX40L sozinho ou em combinação com modificações adicionais (*por exemplo*, projetado para expressar proteínas imunomoduladoras adicionais e/ou compreender adicionais deleções de genes) como descrito neste documento. Adicionalmente ou alternativamente, a cepa ou vírus MVA, vaccinia ou mixoma manipulado pode ter sido modificado para interromper ou deletar (nocaute) o gene E5R (ou M31R) e sozinho ou em combinação com modificações adicionais (*por exemplo*, projetado para expressar proteínas imunomoduladoras adicionais e/ou compreender adicionais deleções de genes) como descrito neste documento. O termo "cepa MVAΔE3L correspondente" ou "vírus MVAΔE3L correspondente" é usado neste documento para se referir à cepa ou vírus MVA com uma deleção de E3L sozinha (*ou seja*, uma cepa de MVAΔE3L ou vírus que não compreende outras deleções ou adições genéticas). O termo "cepa

MVAΔC7L correspondente" ou "vírus MVAΔC7L correspondente" é usado neste documento para se referir à cepa ou vírus MVA com uma deleção de C7L sozinha (*ou seja*, uma cepa de MVAΔC7L ou vírus que não compreende outras deleções ou adições genéticas). O termo "cepa MVAΔE5R correspondente" ou "vírus MVAΔE5R correspondente" é usado neste documento para se referir à cepa ou vírus MVA com uma deleção de E5R sozinha (*ou seja*, uma cepa de MVAΔE5R ou vírus que não compreende outras deleções ou adições genéticas). O termo "cepa VACVΔC7L correspondente" ou "vírus VACVΔC7L correspondente'' é usado neste documento para se referir à cepa ou vírus vaccinia com uma deleção de C7L sozinha (*ou seja*, uma cepa de VACVΔC7L ou vírus que não compreende outras deleções ou adições genéticas). O termo "cepa VACVΔE5R correspondente" ou "vírus VACVΔE5R correspondente" é usado neste documento para se referir à cepa ou vírus vaccinia com uma deleção de E5R sozinha (*ou seja*, uma cepa de VACVΔE5R ou vírus que não compreende outras deleções ou adições genéticas).

[0343] Conforme usado neste documento, os termos "administração" e "contato" referem-se ao depósito de um ou mais poxvírus manipulados (*por exemplo*, MVAΔE3L-OX40L, MVAΔC7L-OX40L, MVAΔC7L-hFlt3L-OX40L, MVAΔC7LΔR-hFlt3L-OX40L, MVAΔC7LΔR-hFlt3L-OX40L, MVAΔC7LΔR-hFlt3L-OX40L, MVAΔC7LΔR-hFlt3L-OX40L-5Flt3L-OX40L. OX40L, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, VACVΔC7L-OX40L, VACVΔC7L-hFlt3L-OX40L, VACVΔE5R, VACV-TK--anti-CTLA-4-ΔE5R- hFlt3L-OX40L, VACVΔB2R, VACVE3LΔ83NΔB2R, VACVΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83NΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL 12-ΔB2R, MYXVΔM31R, MYXV∆M31R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM63R, MYXVΔM64R, MVAΔWR199 e/ou MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔWR199) da presente divulgação no microambiente de tumor se isto é feito por administração local ao tumor (intratumoral) ou por, por exemplo, via

intravenosa. O termo concentra-se em vírus manipulado *(por exemplo,* MVAΔE3L-OX40L, MVAΔC7L-OX40L, MVAΔC7L-hFlt3L-OX40L, MVAΔC7LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, MVAΔE3LΔE5R -hFlt3L-OX40L-ΔC11R, VACVΔC7L-OX40L, VACVΔC7L-hFlt3L-OX40L, VACVΔE5R, VACV-TK--anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L, VACVΔB2R, VACVE3LΔ83NΔB2R, VACVΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83NΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti -CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12-ΔB2R, MYXVΔM31R, MYXV∆M31R-hFlt3L64, MVAΔWR199 e/ou MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔWR199) que atinge o próprio tumor. Em algumas modalidades, "administração" é sinônimo de administração, mas é usado com um local de administração específico em mente, *por exemplo*, intratumoral.

[0344] Os termos "interrupção" e "mutação" são usados indistintamente neste documento para se referir a uma alteração detectável e hereditária no material genético. As mutações podem incluir inserções, deleções, substituições (*por exemplo*, transições, transversão), transposições, inversões, nocautes e combinações dos mesmos. As mutações podem envolver apenas um único nucleotídeo (*por exemplo*, uma mutação pontual ou um polimorfismo de nucleotídeo único) ou múltiplos nucleotídeos. Em algumas modalidades, as mutações são silenciosas, ou seja, nenhum efeito fenotípico da mutação é detectado. Em outras modalidades, a mutação causa uma alteração fenotípica, por exemplo, o nível de expressão do produto codificado é alterado, ou o próprio produto codificado é alterado. Em algumas modalidades, uma interrupção ou mutação pode resultar em um gene interrompido com níveis diminuídos de expressão de um produto de gene (*por exemplo*, proteína ou RNA) em comparação com a cepa de tipo selvagem. Em outras modalidades, uma interrupção ou mutação pode resultar em uma proteína expressa com atividade que é inferior em comparação com a atividade da proteína expressa da cepa de tipo selvagem.

[0345] Conforme usado neste documento, uma "quantidade eficaz" ou "quantidade terapeuticamente eficaz" refere-se a uma quantidade suficiente de um agente, que, quando administrado em uma ou mais dosagens e por um período de tempo, é suficiente para fornecer um resultado biológico desejado em aliviar, curar ou paliar uma doença. Na presente descrição, uma quantidade eficaz de um ou mais poxvírus manipulados da tecnologia actual *(por exemplo,* MVAΔE3L-OX40L, MVAΔC7L-OX40L, MVAΔC7L-hFlt3L-OX40L, MVAΔC7LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, VACVΔC7L-OX40L, VACVΔC7L-hFlt3L-OX40L, VACVΔE5R, VACV-TK^{-}-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L, VACVΔB2R, VACVE3LΔ83NΔB2R, VACVΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83NΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12-ΔB2R, MYXVΔM31R, MYXVΔM31R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM63R, MYXVΔM64R, MVAΔWR199, e/ou MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔWR199) compreende uma quantidade que (quando administrada por um período de tempo adequado e em uma frequência adequada) reduz o número de células de câncer; ou reduz o tamanho do tumor ou erradica o tumor; ou inibe (*isto é*, retarda ou para) a infiltração de células de câncer em órgãos periféricos; inibe (*isto é*, retarda ou pára) o crescimento metastático; inibe (estabiliza ou interrompe) o crescimento do tumor; permite o tratamento do tumor; e/ou induz e promove uma resposta imunológica contra o tumor. Uma quantidade terapêutica apropriada em qualquer caso individual pode ser determinada por um versado na técnica usando experimentação de rotina à luz da presente divulgação. Tal determinação pode começar com quantidades consideradas eficazes *in vitro* e quantidades consideradas eficazes em animais. A quantidade terapeuticamente eficaz será inicialmente determinada com base na concentração ou concentrações encontradas para conferir um benefício às células em cultura. Quantidades eficazes podem ser extrapoladas a partir de dados dentro da cultura de células e podem ser

ajustadas para cima ou para baixo com base em fatores como detalhados neste documento. Quantidades eficazes dos construtos virais estão geralmente dentro da faixa de cerca de 10^5 a cerca de 10^{10} unidades formadoras de placas (pfu), embora uma dose mais baixa ou mais elevada possa ser administrada. Em algumas modalidades, a dosagem é de cerca de 10^6-10^9 pfu. Em algumas modalidades, uma dosagem unitária é administrada em um volume na faixa de 1 a 10 mL. A equivalência de pfu para partículas de vírus pode diferir de acordo com o método de titulação de pfu específico usado. Geralmente, pfu é igual a cerca de 5 a 100 partículas de vírus. Uma quantidade terapeuticamente eficaz de vírus portadores do transgene hFlt3L pode ser administrada em uma ou mais doses divididas por um período de tempo prescrito e em uma frequência de administração prescrita. Por exemplo, uma quantidade terapeuticamente eficaz de vírus portadores de hFlt3L de acordo com a presente divulgação pode variar de acordo com fatores como o estado da doença, idade, sexo, peso e condição geral do indivíduo e a potência dos construtos virais para desencadear uma resposta imunológica desejada no indivíduo específico para o câncer específico.

[0346] Com referência particular aos agentes imunoestimuladores de base viral divulgados neste documento, uma "quantidade eficaz" ou "quantidade terapeuticamente eficaz" refere-se a uma quantidade de uma composição que compreende um ou mais um ou mais poxvírus projetados da presente tecnologia (*por exemplo*, MVAΔE3L-OX40L, MVAΔC7L-OX40L, MVAΔC7L-hFlt3L-OX40L, MVAΔC7LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, VACVΔC7L-OX40L, VACVΔC7L-hFlt3L-OX40L, VACVΔE5R, VACV-TK$^-$-anti-CTLA-4-∆E5R-hFlt3L-OX40L, VACVΔB2R, VACVE3LΔ83NΔB2R, VACVΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83NΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12-ΔB2R, MYXVΔM31R, MYXV∆M31R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM63R,

MYXVΔM64R, MVAΔWR199, e/ou MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔWR199) suficiente para reduzir, inibir ou anular o crescimento de células de tumor, reduzindo ou erradicando o tumor, ou suficiente para inibir, reduzir ou anular a disseminação metastática e *in vitro*, *ex vivo*, ou em um indivíduo ou para induzir e promover uma resposta imunológica contra o tumor que irá eventualmente resultar em um ou mais dos métodos de redução, inibição e/ou anulação da disseminação metastática conforme o caso. A redução, inibição ou erradicação do crescimento de células de tumor pode ser o resultado de necrose, apoptose ou uma resposta imunológica, ou uma combinação de dois ou mais dos anteriores (no entanto, a precipitação da apoptose, por exemplo, pode não ser devida aos mesmos fatores observados com vírus oncolíticos). A quantidade que é terapeuticamente eficaz pode variar dependendo de fatores como o vírus específico usado na composição, a idade e a condição do indivíduo a ser tratado, a extensão da formação do tumor, a presença ou ausência de outras modalidades terapêuticas e similares. Da mesma maneira, a dosagem da composição a ser administrada e a frequência de sua administração dependerão de uma variedade de fatores, tais como a potência do ingrediente ativo, a duração de sua atividade uma vez administrada, a via de administração, o tamanho, a idade, sexo e condição física do indivíduo, o risco de reações adversas e o julgamento do médico. As composições são administradas em uma variedade de formas de dosagem, tais como soluções injetáveis.

[0347] Com referência particular à terapia de combinação com um inibidor de ponto de verificação imunológico, uma "quantidade eficaz" ou "quantidade terapeuticamente eficaz" para um agente de bloqueio de ponto de verificação imunológico significa uma quantidade de um agente de bloqueio de ponto de verificação imunológico suficiente para reverter ou reduzir a supressão imunológica no microambiente tumoral e para ativar ou aumentar a imunidade do hospedeiro no indivíduo a ser tratado. Os agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico incluem, mas não estão limitados a,

anticorpos inibidores contra o inibidor de CD28, como CTLA-4 (antígeno de linfócito T citotóxico 4) (*por exemplo*, ipilimumabe), anticorpos inibidores anti-PD-1 (morte programada 1) (*por exemplo*., nivolumabe, pembrolizumabe, pidilizumabe, lambrolizumabe) e anticorpos inibitórios anti-PD-L1 (ligante de morte programada 1) (MPDL3280A, BMS-936559, MEDI4736, MSB 00107180), bem como anticorpos inibitórios contra ativação de LAG-3 (linfócitos gene 3), TIM3 (imunoglobulina de células T e mucina-3), B7-H3, TIGIT (imunorreceptor de células T com domínios Ig e ITIM), AMP-224, MDX-1105, arelumabe, tremelimumabe, IMP321, MGA271, BMS -986016, lirilumab, urelumab, PF-05082566, IPH2101, MEDI-6469, CP-870.893, Mogamulizumab, Varlilumab, Galiximab, AMP-514, AUNP 12, Indoximod, NLG-919, INCB024360, DLBCL360, CD80, CD80, BTLA ou PDR001 e suas combinações. As faixas de dosagem das anteriores são conhecidas ou facilmente dentro dos versados na técnica, uma vez que vários ensaios clínicos de dosagem foram concluídos, tornando possível a extrapolação para outros agentes.

[0348] Em algumas modalidades, o tumor expressa o ponto de verificação específico, mas no contexto da presente tecnologia, isso não é estritamente necessário, pois os agentes bloqueadores do ponto de verificação imunológico bloqueiam os mecanismos imunossupressores mais geralmente dentro dos tumores, provocados por células de tumor, células do estroma e células imunológicas infiltrantes de tumor.

[0349] Por exemplo, o inibidor CTLA-4 ipilimumabe, quando administrado como terapia adjuvante após a cirurgia no melanoma, é administrado a 1-2 mg/mL durante 90 minutos para uma quantidade total de infusão de 3 mg/kg a cada três semanas para um total de 4 doses. Esta terapia é frequentemente acompanhada por reações adversas imunomediadas graves, mesmo com risco de vida, que limitam a dose tolerada, bem como a quantidade cumulativa que pode ser administrada. Prevê-se que será possível reduzir a dose e/ou quantidade cumulativa de ipilimumabe quando administrado conjuntamente com um ou mais poxvírus projetados da presente

tecnologia (*por exemplo*, MVAΔE3L-OX40L, MVAΔC7L-OX40L, MVAΔC7L-hFlt3L-OX40L, MVAΔC7LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, VACVΔC7L-OX40L, VACVΔC7L-hFlt3L-OX40L, VACVΔE5R, VACV-TK--anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L, VACVΔB2R, VACVE3LΔ83NΔB2R, VACVΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83NΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83N-ΔTltΔ-anti-CTLA-4-VACVE3A5LΔ83N-ΔTltΔ-anti-CTLA-4-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12-ΔB2R, MYXVΔM31R, MYXVΔM31R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM63R, MYXVΔM64R, MVAΔWR199 e/ou MVAΔE5R-hFR193L). Em particular, à luz dos resultados experimentais apresentados abaixo, prevê-se que será ainda possível reduzir a dose do inibidor de CTLA-4 se for administrado diretamente ao tumor, juntamente com um ou ambos os vírus MVA anteriores. Consequentemente, as quantidades fornecidas acima para ipilimumabe podem ser um ponto de partida para determinar a dosagem particular e a quantidade cumulativa a ser dada a um paciente em administração conjunta.

[0350] Como outro exemplo, o pembrolizumabe é prescrito para administração como terapia adjuvante no melanoma diluído para 25 mg/mL. É administrado na dosagem de 2 mg/kg durante 30 minutos a cada três semanas. Este pode ser um ponto de partida para determinar a dosagem e administração na administração conjunta de um ou mais poxvírus manipulados da presente tecnologia (*por exemplo*, MVAΔE3L-OX40L, MVAΔC7L-OX40L, MVAΔC7L-hFlt3L-OX40L, MVAΔC740LΔE5R-hFltRE5L-OXVA hFlt3L-OX40L, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, VACVΔC7L-OX40L, VACVΔC7L-hFlt3L-OX40L, VACVΔE5R, VACV-TK--anti-CTLA-4-Δ E5R-hFlt3L-OX40L, VACVΔB2R, VACVE3LΔ83NΔB2R, VACVΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83NΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L- IL-12-

ΔB2R, MYXVΔM31R, MYXVΔM31R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM63R, MYXVΔM64R, MVAΔWR199 e/ou MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔWR199).

[0351] Nivolumabe também pode servir como um ponto de partida na determinação da dosagem e regime de administração de inibidores de ponto de verificação administrados em combinação com um ou mais poxvírus projetados da presente tecnologia (*por exemplo*, MVAΔE3L-OX40L, MVAΔC7L-OX40L, MVAΔC7L-hFlt3L-OX40L, MVAΔC7LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, VACVΔC7L-OX40L, VACVΔC7L-hFlt3L-OX40L, VACVΔE5R, VACV-TK$^-$-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L, VACVΔB2R, VACVE3LΔ83NΔB2R, VACVΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83NΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12-ΔB2R, MYXVΔM31R, MYXVΔM31R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM63R, MYXVΔM64R, MVAΔWR199, e/ou MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔWR199). O nivolumabe é prescrito para administração de 3 mg/kg por infusão intravenosa durante 60 minutos a cada duas semanas.

[0352] Agentes imunoestimulantes, como anticorpos agonistas, também foram explorados como imunoterapia para câncer. Por exemplo, o anticorpo anti-ICOS se liga ao domínio extracelular de ICOS levando à ativação da sinalização de ICOS e ativação de células T. O anticorpo anti-OX40 pode se ligar ao OX40 e potencializar a sinalização do receptor de células T, levando à ativação, proliferação e sobrevivência de células T. Outros exemplos incluem anticorpos agonistas contra 4-1BB (CD137), GITR.

[0353] Os anticorpos imunoestimulantes agonistas podem ser usados sistemicamente em combinação com injeção intratumoral de um ou mais poxvírus projetados da presente tecnologia (*por exemplo*, MVAΔE3L-OX40L, MVAΔC7L-OX40L, MVAΔC7L-hFlt3L-OX40L, MVAΔC7LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, VACVΔC7L-

OX40L, VACVΔC7L-hFlt3L-OX40L, VACVΔE5R, VACV-TK$^-$-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L, VACVΔB2R, VACVE3LΔ83NΔB2R, VACVΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83NΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12-ΔB2R, MYXVΔM31R, MYXVΔM31R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM63R, MYXVΔM64R, MVAΔWR199, e/ou MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔWR199). Alternativamente, os anticorpos agonistas imunoestimulantes podem ser usados conjuntamente com um ou mais poxvírus projetados da presente tecnologia (*por exemplo*, MVAΔE3L-OX40L, MVAΔC7L-OX40L, MVAΔC7L-hFlt3L-OX40L, MVAΔC7LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, VACVΔC7L-OX40L, VACVΔC7L-hFlt3L-OX40L, VACVΔE5R, VACV-TK$^-$-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L, VACVΔB2R, VACVE3LΔ83NΔB2R, VACVΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83NΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12-ΔB2R, MYXVΔM31R, MYXVΔM31R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM63R, MYXVΔM64R, MVAΔWR199, e/ou MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔWR199) *por meio de* administração intratumoral simultaneamente (ou seja, simultaneamente) ou sequencialmente.

[0354] O termo "medicamento imunomodulatório" é usado neste documento para se referir a Fingolimode (FTY720).

[0355] Os termos "projetado" ou "geneticamente modificado" são usados neste documento para se referir a um organismo que foi manipulado para ser geneticamente alterado, modificado ou alterado, *por exemplo*, pela interrupção do genoma. Por exemplo, uma "cepa de vírus vaccinia modificada", "vírus vaccinia Ankara modificado" ou "vírus mixoma modificado" refere-se a uma cepa vaccinia, vaccinia Ankara modificada ou cepa de mixoma que foi manipulada para ser geneticamente alterada, modificada ou alterada. No presente contexto, “projetado” ou “geneticamente modificado” inclui vírus

vaccinia recombinantes, vírus vaccinia Ankara modificados recombinantes e vírus mixoma recombinantes.

[0356] O termo "cassete de gene" é usado neste documento para se referir a uma sequência de DNA que codifica e é capaz de expressar um ou mais genes de interesse (*por exemplo*, OX40L, hFlt3L, um marcador selecionável ou uma combinação dos mesmos) que pode ser inserido entre um ou mais locais de restrição selecionados de uma sequência de DNA. Em algumas modalidades, a inserção de um cassete de gene resulta em um gene interrompido. Em algumas modalidades, a interrupção do gene envolve a substituição de pelo menos uma porção do gene por um cassete de gene, que inclui uma sequência de nucleotídeos que codifica um gene de interesse (*por exemplo*, OX40L, hFlt3L, um marcador selecionável ou uma combinação dos mesmos).

[0357] Conforme usado neste documento, "ácido nucleico heterólogo" refere-se a um ácido nucleico, DNA ou RNA, que foi introduzido em um vírus e que não é uma cópia de uma sequência encontrada naturalmente no vírus no qual é introduzido. Esse ácido nucleico heterólogo pode compreender segmentos que são uma cópia de uma sequência que é naturalmente encontrada no vírus no qual foi introduzida.

[0358] Conforme usado neste documento, sempre que um gene é descrito, o gene pode ser humano ou murino, de modo que a designação de humano (h ou hu) ou murino (m ou mu) pode ser usada indistintamente e não se destina a ser limitante. Por exemplo, onde mIL-12 é descrito, hIL-12 pode ser substituído por mIL-12 nos construtos descritos e vice-versa.

[0359] Conforme usado neste documento, “IL-15/IL-15Rα” abrange construtos de transpresentação de hIL-15/IL-15Rα ligados à membrana e proteínas de fusão, conforme descrito em Van den Bergh *et al*. (*Pharmacology & Therapeutics* 170:73-79 (2017); Kowalsky *et al*. (*Molecular Therapy* 26(10):2476-2486 (2018); Stoklasek *et al*. (*J. Immunol*. 177:6072-6080); Duboi *et al*. (*J. Immunol*. 180:2099-2106 (2008); Epardaud *et al*, (*Cancer Res.*

68:2972-2983 (2008); and Dubois *et al*. (*Immunity* 17:537-547 (2002), cada uma das quais é incorporada por referência neste documento.

[0360] Conforme usado neste documento, "inibidor de ponto de verificação imunológico " ou "agente de bloqueio de ponto de verificação imunológico " ou "inibidor de bloqueio de ponto de verificação imunológico " refere-se a moléculas que reduzem completamente ou parcialmente, inibem, interferem ou modulam a atividade de uma ou mais proteínas de ponto de verificação. As proteínas de ponto de verificação regulam a ativação ou função das células T. As proteínas ponto de verificação incluem, mas não estão limitadas a, membros da família de receptores CD28, CTLA-4 e seus ligantes CD80 e CD86; PD-1 e seus ligantes PD-L1 e PD-L2; LAG3, B7-H3, B7-H4, TIM3, ICOS, II DLBCL, BTLA ou qualquer combinação de dois ou mais dos anteriores. Exemplos não limitantes dos agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico contemplados para uso neste documento incluem, mas não estão limitados a, anticorpos inibidores contra o inibidor de CD28, como CTLA-4 (antígeno de linfócito T citotóxico 4) (*por exemplo*, ipilimumabe), anticorpos inibidores anti-PD-1 (morte programada 1) (*por exemplo*., nivolumabe, pembrolizumabe, pidilizumabe, lambrolizumabe) e anticorpos inibitórios anti-PD-L1 (ligante de morte programada 1) (MPDL3280A, BMS-936559, MEDI4736, MSB 00107180), bem como anticorpos inibitórios contra ativação de LAG-3 (linfócitos gene 3), TIM3 (imunoglobulina de células T e mucina-3), B7-H3, TIGIT (imunorreceptor de células T com domínios Ig e ITIM), AMP-224, MDX-1105, arelumabe, tremelimumabe, IMP321, MGA271, BMS - 986016, lirilumab, urelumab, PF-05082566, IPH2101, MEDI-6469, CP-870.893, Mogamulizumab, Varlilumab, Galiximab, AMP-514, AUNP 12, Indoximod, NLG-919, INCB024360, DLBCL360, CD80, CD80, BTLA ou PDR001 e suas combinações.

[0361] Conforme usado neste documento, "resposta imunológica " refere-se à ação de um ou mais dos linfócitos, células apresentadoras de antígeno, células fagocíticas, granulócitos e macromoléculas solúveis

produzidas pelas células acima ou pelo fígado (incluindo anticorpos, citocinas e complemento) que resulta em dano seletivo, destruição ou eliminação do corpo humano de células de câncer, células de tumor metastáticas, *etc.* Uma resposta imunológica pode incluir uma resposta celular, como uma resposta de célula T que é uma alteração (modulação, *por exemplo*, aumento significativo, estimulação, ativação, deficiência ou inibição) da função celular, *ou seja*, função de célula T. Uma resposta de célula T pode incluir geração, proliferação ou expansão ou estimulação de um tipo particular de célula T, ou subconjunto de células T, por exemplo, $CD4^+$ efetora, $CD4^+$ auxiliar, $CD8^+$efetora, $CD8^+$citotóxica, ou células assassinas naturais (NK). Esses subconjuntos de células T podem ser identificados pela detecção de um ou mais receptores de células ou moléculas de superfície celular (*por exemplo*, CD ou grupo de moléculas de diferenciação). Uma resposta de células T também pode incluir expressão alterada (aumento ou diminuição estatisticamente significativa) de um fator celular, como um mediador solúvel (*por exemplo*, uma citocina, linfocina, proteína de ligação de citocina ou interleucina) que influencia a diferenciação ou proliferação de outras células. Por exemplo, o interferon tipo I (IFN-α/β) é um regulador crítico da imunidade inata (Huber *et al.*, *Immunology* 132 (4): 466-474 (2011)). Estudos em animais e humanos mostraram um papel do IFN-α/β em influenciar diretamente o destino das células $CD4^+$ e $CD8^+$ T durante as fases iniciais de reconhecimento do antígeno e resposta imunológica antitumoral. O IFN Tipo I é induzido em resposta à ativação de células dendríticas, por sua vez, uma sentinela do sistema imunológico inato. Uma resposta imunológica também pode incluir resposta humoral (anticorpo).

[0362] O termo "composição imunogênica" é usado neste documento para se referir a uma composição que irá desencadear uma resposta imunológica em um mamífero que foi exposto à composição. Em algumas modalidades, uma composição imunogênica compreende MVAΔE3L-OX40L, MVAΔC7L-OX40L, MVAΔC7L-hFlt3L-OX40L, MVAΔC7LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-

hFlt3L-OX40L-ΔC11R, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, VACVΔC7L-OX40L, VACVΔC7L-hFlt3L-OX40L, VACVΔE5R, VACV-TK^{-}-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L, VACVΔB2R, VACVE3LΔ83NΔB2R, VACVΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83NΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12-ΔB2R, MYXVΔM31R, MYXVΔM31R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM63R, MYXVΔM64R, MVAΔWR199, e/ou MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔWR199,, um antígeno, um adjuvante compreendendo qualquer um ou mais dos vírus manipulados anteriores e/ou um adjuvante compreendendo MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔC7LΔE5R-hFlt3L-OX40L, e/ou Heat-iMVAΔE5R sozinho ou em combinação com inibidores de bloqueio de ponto de verificação imunológico. Conforme usado aqui, uma composição imunogênica abrange vacinas. Em algumas modalidades, a composição imunogênica compreende uma vacina de célula inteira contendo antígeno tumoral (*por exemplo*, uma vacina de célula inteira irradiada).

[0363] Conforme usado neste documento, o termo "MVA inativado" refere-se a MVA inativado por calor (Heat-iMVA) e/ou MVA inativado por UV que são infecciosos, não replicativos e não suprimem a produção de IFN Tipo I em células DC infectadas. Conforme usado neste documento, o termo "vírus vaccinia inativado" inclui vírus vaccinia inativado por calor e/ou vírus vaccinia inativado por UV. MVA ou vírus vaccinia inativado por uma combinação de calor e radiação UV também está dentro do escopo da presente divulgação.

[0364] Conforme usado neste documento, "MVA inativado por calor" (Heat-iMVA) e "Vírus vaccinia inativado por calor" referem-se a MVA e vírus vaccinia, respectivamente, que foram expostos a tratamento térmico sob condições que não destroem sua imunogenicidade ou sua capacidade de entrar nas células alvo (células de tumor), mas remover a capacidade de replicação residual do vírus, bem como fatores que inibem a resposta imunológica do hospedeiro. Um exemplo de tais condições é a exposição a uma temperatura na faixa de cerca de 50 a cerca de 60°C por um período de

tempo de cerca de uma hora. Outros tempos e temperaturas podem ser determinados por um versado na técnica.

[0365] Conforme usado neste documento, "MVA inativado por UV" e "vírus vaccinia inativado por UV" referem-se a MVA e vírus vaccinia, respectivamente, que foram inativados por exposição a UV sob condições que não destroem sua imunogenicidade ou sua capacidade de entrar nas v alvo (células de tumor), mas removem a capacidade de replicação residual do vírus. Um exemplo de tais condições, que podem ser úteis nos presentes métodos, é a exposição a UV usando, por exemplo, uma lâmpada de UV de 365 nm por um período de cerca de 30 min a cerca de 1 hora. Outros limites dessas condições de comprimento de onda de UV e exposição podem ser determinados por um versado na técnica.

[0366] Um "nocaute", "gene nocautee" ou uma "deleção de gene" se refere a um gene incluindo uma mutação nula (*por exemplo*, o produto de tipo selvagem codificado pelo gene não é expresso, expresso em níveis tão baixos quanto não tem efeito ou não é funcional). Em algumas modalidades, o gene nocaute inclui sequências heterólogas (*por exemplo*, um ou mais cassetes de genes compreendendo uma sequência de ácido nucleico heteróloga) ou sequências não funcionais geneticamente modificadas do próprio gene, o que torna o gene não funcional. Em outras modalidades, o gene nocaute não possui uma porção do gene de tipo selvagem. Por exemplo, em algumas modalidades, pelo menos cerca de 10%, pelo menos cerca de 20%, pelo menos cerca de 30%, pelo menos cerca de 40% ou pelo menos cerca de 60% da sequência do gene de tipo selvagem é deletada. Em outras modalidades, falta ao gene nocaute pelo menos cerca de 70%, pelo menos cerca de 75%, pelo menos cerca de 80%, pelo menos cerca de 90%, pelo menos cerca de 95% ou pelo menos cerca de 100% do tipo selvagem sequência do gene. Em outras modalidades, o gene nocaute pode incluir até 100% da sequência do gene de tipo selvagem (*por exemplo*, alguma porção da sequência do gene de

tipo selvagem pode ser deletada), mas também inclui um ou mais heterólogos e/ou não sequências funcionais de ácido nucleico nele inseridas.

[0367] Conforme usado neste documento, "metástase" se refere à disseminação do câncer de seu local primário para tecidos vizinhos ou locais distais no corpo. As células de câncer (incluindo as células-tronco de câncer) podem se desprender de um tumor primário, penetrar nos vasos linfáticos e sanguíneos, circular pela corrente sanguínea e crescer em tecidos normais em outras partes do corpo. A metástase é um processo sequencial, dependente de células de tumor (ou células-tronco de câncer) se separarem do tumor primário, viajando pela corrente sanguínea ou linfáticos e parando em um local distante. Uma vez em outro local, as células de câncer voltam a penetrar por meio de dos vasos sanguíneos ou paredes linfáticas, continuam a se multiplicar e, eventualmente, formam um novo tumor (tumor metastático). Em algumas modalidades, este novo tumor é referido como tumor metastático (ou secundário).

[0368] Conforme usado neste documento, "MVA" significa "vaccinia Ankara modificada" e se refere a uma cepa altamente atenuada de vaccinia derivada da cepa Ankara e desenvolvida para uso como vacina e adjuvante de vacina. O MVA original foi isolado a partir da cepa Ancara de tipo selvagem por passagem sucessiva por meio de de células embrionárias de galinha. Assim tratado, ele perdeu cerca de 15% do genoma da vaccinia de tipo selvagem, incluindo sua capacidade de se replicar eficientemente em células de primatas (incluindo humanos). (Mayr *et al*., *Zentralbl Bakteriol B* 167:375-390 (1978)). O MVA é considerado um candidato apropriado para o desenvolvimento como um vetor recombinante para administração de genes ou vacinação contra doenças infecciosas ou tumores. (Verheust *et al*., *Vaccine* 30(16):2623-2632 (2012)). O MVA tem um genoma de 178 kb de comprimento e uma sequência divulgada pela primeira vez em Antoine et al., *Virol*. 244 (2): 365-396 (1998). As sequências também são divulgadas no GenBank No. de Acesso U94848.1 (SEQ ID NO: 1). O MVA de grau clínico está comercialmente e publicamente

disponível na Bavarian Nordic A/S Kvistgaard, Dinamarca. Além disso, o MVA está disponível na ATCC, Rockville, MD, e no CMCN (*Institut Pasteur Collection Nationale des Microorganismes*) Paris, França.

[0369] O termo "MVAΔC7L" é usado neste documento para se referir a um vírus mutante Ankara vaccina modificada (MVA) ou uma vacina compreendendo o vírus, no qual o gene C7 não é expresso, expresso em níveis tão baixos que não têm efeito, ou a proteína expressa não é funcional (*por exemplo*, é uma mutação nula). Conforme usado neste documento, "MVAΔC7L" inclui um mutante de deleção de MVA que carece de um gene C7L funcional e é infeccioso, mas não replicativo, e é ainda prejudicado em sua capacidade de evadir o sistema imunológico do hospedeiro. Conforme usado neste documento, "MVAΔC7L" abrange um vírus MVA recombinante que não expressa uma proteína C7 funcional. Em algumas modalidades, o mutante ΔC7L inclui uma sequência de ácido nucleico heterólogo no lugar de toda ou a maioria da sequência do gene C7L. Por exemplo, conforme usado neste documento, "MVAΔC7L" abrange uma sequência de ácido nucleico de MVA recombinante, em que a sequência de ácido nucleico correspondente à posição de C7 no genoma de MVA (*por exemplo*, posição 18.407 a 18.859 de SEQ ID NO: 1) é substituído por uma sequência de ácido nucleico heterólogo compreendendo uma estrutura de leitura aberta que codifica um gene específico de interesse (SG), tal como OX40L humano ("MVAΔC7L-OX40L") ou ligante de tirosina quinase 3 tipo Fms humano (hFlt3L) (“MVAΔC7L-hFlt3L”). Em algumas modalidades, a sequência de ácido nucleico heterólogo compreende uma estrutura de leitura aberta que codifica um marcador selecionável. Em algumas modalidades, o marcador selecionável é uma proteína fluorescente (*por exemplo*, gpt, GFP, mCherry). Em algumas modalidades, o vírus MVAΔC7L abrange um vírus MVA recombinante que não expressa uma proteína timidina quinase funcional (TK). Em algumas modalidades, um gene específico de interesse (*por exemplo*, OX40L, hFlt3L) é inserido no locus TK do genoma MVA (*por exemplo*, posição 75.560 a 76.093

de SEQ ID NO: 1), dividindo o gene TK e obliterando-o (“MVAΔC7L-OX40L-TK(-)”; “MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)”). Em algumas modalidades, MVAΔC7L abrange um vírus MVA recombinante em que toda ou a maioria da sequência do gene C7L é substituída por um primeiro gene específico de interesse (*por exemplo*, hFlt3L) e um segundo gene de interesse (*por exemplo*, OX40L) é inserido no Locus TK (“MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-OX40L”). Em algumas modalidades, os vírus MVAΔC7L-OX40L recombinantes da presente tecnologia são ainda modificados para expressar pelo menos um outro gene heterólogo, tal como qualquer um ou mais de hFlt3L, hIL-2, hIL-12, hIL-15, hIL-15/IL-15Rα, hIL-18, hIL-21, anti-huCTLA-4, anti-huPD-1, anti-huPD-L1, GITRL, 4-1BBL, ou CD40L (em que"h" ou "hu" designa o proteína humana) e/ou incluir pelo menos uma outra mutação ou deleção de gene viral, como qualquer uma ou mais dentre as seguintes deleções: E3L (ΔE3L); E3LΔ83N; B2R (ΔB2R), B19R (B18R; ΔWR200); E5R; K7R; C12L (IL18BP); B8R; B14R; N1L; C11R; K1L; M1L; N2L; e/ou WR199. Por exemplo, em algumas modalidades, MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-OX40 é ainda modificado para compreender uma deleção de E5R, em que o gene E5R é substituído por um marcador selecionável (*por exemplo*, mCherry) por meio de recombinação homóloga em loci E4L e E6R. Em algumas modalidades, MVAΔC7L é modificado para expressar um ou mais genes heterólogos a partir de dentro de outros loci, como o locus E5R. Por exemplo, em algumas modalidades, MVAΔC7L abrange um vírus MVA recombinante em que toda ou a maioria da sequência do gene E5R é substituída por um primeiro gene específico de interesse (*por exemplo*, hFtl3L) e um segundo gene específico de interesse (*por exemplo*, OX40L), em que as sequências de codificação do primeiro e do segundo genes específicos de interesse são separadas por um cassete incluindo um sítio de clivagem de furina, seguido por uma sequência de peptídeo 2A (Pep2A), formando assim um vírus recombinante, como “MVAΔC7LΔE5R-hFlt3L-OX40L.” Em outras modalidades, os vírus MVAΔC7L-OX40L recombinante da presente tecnologia

não contêm mais genes heterólogos e/ou mutações de genes virais além daqueles especificamente referidos no nome do vírus.

[0370] O termo "MVAΔE3L" inclui um mutante de deleção de MVA que carece de um gene E3L funcional e é infeccioso, mas não replicativo, e é ainda prejudicado em sua capacidade de evadir o sistema imunológico do hospedeiro. Tem sido usado como um vetor de vacina para transferir antígenos tumorais ou virais. O knockout MVA E3L mutante e sua preparação foram descritos na Patente US 7.049.145, por exemplo. Conforme usado neste documento, "MVAΔE3L" abrange um MVA recombinante modificado para expressar um gene específico de interesse (SG), tal como OX40L ("MVAΔE3L-OX40L"). Em algumas modalidades, o vírus MVAΔE3L abrange um vírus MVA recombinante que não expressa uma proteína timidina quinase funcional (TK). Em algumas modalidades, um gene específico de interesse (*por exemplo*, OX40L, hFlt3L) é inserido no locus TK, dividindo o gene TK e obliterando-o ("MVAΔE3L-OX40L-TK(-)"; "MVAΔE3L-hFlt3L-TK(-)"). Em algumas modalidades, os vírus MVAΔE3L-OX40L recombinantes da presente tecnologia são ainda modificados para expressar pelo menos um outro gene heterólogo, tal como qualquer um ou mais de hFlt3L, hIL-2, hIL-12, hIL-15, hIL-15/IL-15Rα, hIL-18, hIL-21, anti-huCTLA-4, anti-huPD-1, anti-huPD-L1, GITRL, 4-1BBL, ou CD40L e/ou incluir pelo menos uma outra mutação ou deleção de gene viral, como qualquer uma ou mais dentre as seguintes deleções: B2R (ΔB2R), B19R (B18R; ΔWR200); E5R; K7R; C12L (IL18BP); B8R; B14R; N1L; C11R; K1L; M1L; N2L; e/ou WR199. Em outras modalidades, os vírus MVAΔE3L-OX40L recombinantes da presente tecnologia não expressam quaisquer outros genes heterólogos e/ou não incluem quaisquer mutações ou deleções de genes virais adicionais além das especificamente indicadas no nome do vírus.

[0371] O termo "MVAΔE5R" é usado neste documento para se referir a um vírus mutante Ankara vaccina modificada (MVA) ou uma vacina compreendendo o vírus, no qual o gene E5R não é expresso, expresso em níveis tão baixos que não têm efeito, ou a proteína expressa não é funcional

(*por exemplo*, é uma mutação nula). Conforme usado neste documento, "MVAΔE5R" inclui um mutante de deleção de MVA que carece de um gene E5R funcional e é infeccioso, mas não replicativo, e é ainda prejudicado em sua capacidade de evadir o sistema imunológico do hospedeiro. Conforme usado neste documento, "MVAΔE5R" abrange um vírus MVA recombinante que não expressa uma proteína E5 funcional. Em algumas modalidades, o mutante ΔE5R inclui uma sequência de ácido nucleico heterólogo no lugar de toda ou a maioria da sequência do gene E5R. Por exemplo, conforme usado neste documento, "MVAΔE5R" abrange uma sequência de ácido nucleico de MVA recombinante, em que a sequência de ácido nucleico correspondente à posição de E5R no genoma de MVA (*por exemplo*, posição 38.432 a 39.385 de SEQ ID NO: 1) é substituído por uma sequência de ácido nucleico heterólogo compreendendo uma estrutura de leitura aberta que codifica um gene específico de interesse (SG), tal como OX40L humano ("MVAΔE5R-OX40L") ou ligante de tirosina quinase 3 tipo Fms humano (hFlt3L) (“MVAΔE5R-hFlt3L”). Em algumas modalidades, MVAΔE5R engloba um MVA recombinante em que o locus E5R é modificado para expressar um ou mais genes heterólogos. Por exemplo, em algumas modalidades, MVAΔE5R abrange um vírus MVA recombinante em que toda ou a maioria da sequência do gene E5R é substituída por um primeiro gene específico de interesse (*por exemplo*, hFtl3L) e um segundo gene específico de interesse (*por exemplo*, OX40L), em que as sequências de codificação do primeiro e do segundo genes específicos de interesse são separadas por um cassete incluindo um sítio de clivagem de furina, seguido por uma sequência de peptídeo 2A (Pep2A), formando assim um vírus recombinante, como “MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L.” Em algumas modalidades, a sequência de ácido nucleico heterólogo compreende uma estrutura de leitura aberta que codifica um marcador selecionável. Em algumas modalidades, o marcador selecionável é uma proteína fluorescente (*por exemplo*, gpt, GFP, mCherry). Em algumas modalidades, o vírus MVAΔE5R abrange um vírus MVA recombinante que não expressa uma proteína timidina

quinase funcional (TK). Em algumas modalidades, um gene específico de interesse (*por exemplo*, OX40L, hFlt3L) é inserido no locus TK do genoma MVA (*por exemplo*, posição 75.560 a 76.093 de SEQ ID NO: 1), dividindo o gene TK e obliterando-o (“MVAΔE5R-OX40L-TK(-)”; “MVAΔE5R-hFlt3L-TK(-)”). Em algumas modalidades, MVAΔE5R abrange um vírus MVA recombinante em que toda ou a maioria da sequência do gene E5R é substituída por um primeiro gene específico de interesse (*por exemplo*, hFlt3L) e um segundo gene de interesse (*por exemplo*, OX40L) é inserido no Locus TK (“MVAΔE5R-hFlt3L-TK(-)-OX40L”). Em algumas modalidades, os vírus MVAΔE5R modificado da presente tecnologia são ainda modificados para expressar pelo menos um outro gene heterólogo, tal como qualquer um ou mais de hOX40L, hFlt3L, hIL-2, hIL-12, hIL-15, hIL-15/IL-15Rα, hIL-18, hIL-21, anti-huCTLA-4, anti-huPD-1, anti-huPD-L1, GITRL, 4-1BBL, ou CD40L (em que"h" ou "hu" designa o proteína humana) e/ou incluir pelo menos uma outra mutação ou deleção de gene viral, como qualquer uma ou mais dentre as seguintes deleções: E3L (ΔE3L); E3LΔ83N; C7L (ΔC7L); B2R (ΔB2R), B19R (B18R; ΔWR200); E5R; K7R; C12L (IL18BP); B8R; B14R; N1L; C11R; K1L; M1L; N2L; e/ou WR199. Em outras modalidades, os vírus MVAΔE5R da presente tecnologia não contêm mais genes heterólogos e/ou mutações de genes virais além daqueles especificamente referidos no nome do vírus.

[0372] O termo "MVAΔWR199" é usado neste documento para se referir a um vírus mutante Ankara vaccina modificada (MVA) ou uma vacina compreendendo o vírus, no qual o gene WR199 não é expresso, expresso em níveis tão baixos que não têm efeito, ou a proteína expressa não é funcional (*por exemplo*, é uma mutação nula). Conforme usado neste documento, "MVAΔWR199" inclui um mutante de deleção de MVA que carece de um gene WR199 funcional e é infeccioso, mas não replicativo, e é ainda prejudicado em sua capacidade de evadir o sistema imunológico do hospedeiro. Conforme usado neste documento, "MVAΔWR199" abrange um vírus MVA recombinante que não expressa uma proteína E5 funcional. Em algumas modalidades, o

mutante ΔWR199 inclui uma sequência de ácido nucleico heterólogo no lugar de toda ou a maioria da sequência do gene WR199. Por exemplo, conforme usado neste documento, "MVAΔWR199" abrange uma sequência de ácido nucleico de MVA recombinante, em que a sequência de ácido nucleico correspondente à posição de WR199 no genoma de MVA (*por exemplo*, posição 158.399 a 160.143 da sequência estabelecida no número de acesso GenBank AY603355) é substituído por uma sequência de ácido nucleico heterólogo compreendendo uma estrutura de leitura aberta que codifica um gene específico de interesse (SG), tal como OX40L humano ("MVAΔWR199-OX40L") ou ligante de tirosina quinase 3 tipo Fms humano (hFlt3L) ("MVAΔWR199-hFlt3L"). Em algumas modalidades, MVAΔWR199 engloba um MVA recombinante em que o locus WR199 é modificado para expressar um ou mais genes heterólogos. Por exemplo, em algumas modalidades, MVAΔWR199 abrange um vírus MVA recombinante em que toda ou a maioria da sequência do gene WR199 é substituída por um primeiro gene específico de interesse (*por exemplo*, hFtl3L) e um segundo gene específico de interesse (*por exemplo*, OX40L), em que as sequências de codificação do primeiro e do segundo genes específicos de interesse são separadas por um cassete incluindo um sítio de clivagem de furina, seguido por uma sequência de peptídeo 2A (Pep2A), formando assim um vírus recombinante, como "MVAΔWR199-hFlt3L-OX40L." Em algumas modalidades, a sequência de ácido nucleico heterólogo compreende uma estrutura de leitura aberta que codifica um marcador selecionável. Em algumas modalidades, o marcador selecionável é uma proteína fluorescente (*por exemplo*, gpt, GFP, mCherry). Em algumas modalidades, o vírus MVAΔWR199 abrange um vírus MVA recombinante que não expressa uma proteína timidina quinase funcional (TK). Em algumas modalidades, um gene específico de interesse (*por exemplo*, OX40L, hFlt3L) é inserido no locus TK do genoma MVA (*por exemplo*, posição 75.560 a 76.093 de SEQ ID NO: 1), dividindo o gene TK e obliterando-o ("MVAΔWR199-OX40L-TK(-)"; "MVAΔWR199-hFlt3L-TK(-)"). Em algumas

modalidades, MVAΔWR199 abrange um vírus MVA recombinante em que toda ou a maioria da sequência do gene WR199 é substituída por um primeiro gene específico de interesse (*por exemplo*, hFlt3L) e um segundo gene de interesse (*por exemplo*, OX40L) é inserido no Locus TK (“MVAΔWR199-hFlt3L-TK(-)-OX40L”). Em algumas modalidades, os vírus MVAΔWR199 modificado da presente tecnologia são ainda modificados para expressar pelo menos um outro gene heterólogo, tal como qualquer um ou mais de hOX40L, hFlt3L, hIL-2, hIL-12, hIL-15, hIL-15/IL-15Rα, hIL-18, hIL-21, anti-huCTLA-4, anti-huPD-1, anti-huPD-L1, GITRL, 4-1BBL, ou CD40L (em que"h" ou "hu" designa o proteína humana) e/ou incluir pelo menos uma outra mutação ou deleção de gene viral, como qualquer uma ou mais dentre as seguintes deleções: E3L (ΔE3L); E3LΔ83N; C7L (ΔC7L); B2R (ΔB2R), B19R (B18R; ΔWR200); E5R; K7R; C12L (IL18BP); B8R; B14R; N1L; C11R; K1L; M1L; e/ou N2L. Em outras modalidades, os vírus MVAΔWR199 da presente tecnologia não contêm mais genes heterólogos e/ou mutações de genes virais além daqueles especificamente referidos no nome do vírus.

[0373] O termo "VACVΔC7L" é usado neste documento para se referir a um vírus mutante vaccinia ou uma vacina compreendendo o vírus, no qual o gene C7 não é expresso, expresso em níveis tão baixos que não têm efeito, ou a proteína expressa não é funcional (*por exemplo*, é uma mutação nula). Conforme usado neste documento, "VACVΔC7L" abrange um vírus vaccinia (VACV) recombinante que não expressa uma proteína C7 funcional. Em algumas modalidades, o vírus vaccinia é derivado da cepa Western Reserve (WR). Em algumas modalidades, o mutante ΔC7L inclui uma sequência heteróloga no lugar de toda ou a maioria da sequência do gene C7L. Por exemplo, conforme usado neste documento, "VACVΔC7L" abrange uma sequência de ácido nucleico de vírus vaccinia recombinante, em que a sequência de ácido nucleico correspondente à posição de C7 no genoma de VACV (*por exemplo*, posição 15.716 to 16.168 de SEQ ID NO: 2) é substituído por uma sequência de ácido nucleico heterólogo compreendendo uma

estrutura de leitura aberta que codifica um gene específico de interesse (SG), tal como OX40L humano ("VACVΔC7L-OX40L") ou ligante de tirosina quinase 3 tipo Fms humano (hFlt3L) (“VACVΔC7L-hFlt3L”). Em algumas modalidades, a sequência de ácido nucleico heterólogo compreende uma estrutura de leitura aberta que codifica um marcador selecionável. Em algumas modalidades, o marcador selecionável é uma proteína fluorescente (*por exemplo*, gpt, GFP, mCherry). Em algumas modalidades, o vírus VACVΔC7L abrange um vírus vaccinia recombinante que não expressa uma proteína timidina quinase funcional (TK). Em algumas modalidades, um gene específico de interesse (*por exemplo*, OX40L, hFlt3L) é inserido no locus TK (*por exemplo*, posição 80.962 a 81.032 de SEQ ID NO: 2), dividindo o gene TK e obliterando-o (“VACVΔC7L-OX40L-TK(-)”; “VACVΔC7L-hFlt3L-TK(-)”). Em algumas modalidades, VACVΔC7L abrange um vírus vaccinia recombinante em que toda ou a maioria da sequência do gene C7L é substituída por um primeiro gene específico de interesse (*por exemplo*, hFlt3L) e um segundo gene de interesse (*por exemplo*, OX40L) é inserido no Locus TK (“VACVΔC7L-hFlt3L-TK(-)-OX40L”). Em algumas modalidades, os vírus VACVΔC7L-OX40L recombinantes da presente tecnologia são ainda modificados para expressar pelo menos um outro gene heterólogo, tal como qualquer um ou mais de hFlt3L, hIL-2, hIL-12, hIL-15, hIL-15/IL-15Rα, hIL-18, hIL-21, anti-huCTLA-4, anti-huPD-1, anti-huPD-L1, GITRL, 4-1BBL, ou CD40L e/ou incluir pelo menos uma outra mutação ou deleção de gene viral, como qualquer uma ou mais dentre as seguintes deleções virais de vaccinia: E3L (ΔE3L); E3LΔ83N; B2R (ΔB2R), B19R (B18R; ΔWR200); E5R; K7R; C12L (IL18BP); B8R; B14R; N1L; C11R; K1L; M1L; N2L; e/ou WR199. Por exemplo, em algumas modalidades, a divulgação da presente tecnologia fornece um vírus VACVΔ E3L83N-hFlt3L-anti-CTLA-4-ΔC7L-OX40L recombinante. Em outras modalidades, os vírus VACVΔC7L-OX40L recombinantes da presente tecnologia não expressam quaisquer outros genes heterólogos e/ou não incluem quaisquer mutações ou deleções de genes virais adicionais além das especificamente indicadas no nome do vírus.

[0374] O termo "VACVΔE5R" é usado neste documento para se referir a um vírus mutante vaccinia ou uma vacina compreendendo o vírus, no qual o gene E5R não é expresso, expresso em níveis tão baixos que não têm efeito, ou a proteína expressa não é funcional (*por exemplo*, é uma mutação nula). Conforme usado neste documento, "VACVΔE5R" abrange um vírus vaccinia (VACV) recombinante que não expressa uma proteína E5 funcional. Em algumas modalidades, o vírus vaccinia é derivado da cepa Western Reserve (WR). Em algumas modalidades, o mutante ΔE5R inclui uma sequência heteróloga no lugar de toda ou a maioria da sequência do gene E5R. Por exemplo, conforme usado neste documento, "VACVΔE5R" abrange uma sequência de ácido nucleico de vírus vaccinia recombinante, em que a sequência de ácido nucleico correspondente à posição de E5R no genoma de VACV (*por exemplo*, posição 49.236 to 50.261 de SEQ ID NO: 2) é substituído por uma sequência de ácido nucleico heterólogo compreendendo uma estrutura de leitura aberta que codifica um gene específico de interesse (SG), tal como OX40L humano ("VACVΔE5R-OX40L") ou ligante de tirosina quinase 3 tipo Fms humano (hFlt3L) (“VACVΔE5R-hFlt3L”). Em algumas modalidades, a sequência de ácido nucleico heterólogo compreende uma estrutura de leitura aberta que codifica um marcador selecionável. Em algumas modalidades, o marcador selecionável é uma proteína fluorescente (*por exemplo*, gpt, GFP, mCherry). Em algumas modalidades, o vírus VACVΔE5R abrange um vírus vaccinia recombinante que não expressa uma proteína timidina quinase funcional (TK). Em algumas modalidades, um gene específico de interesse (*por exemplo*, OX40L, hFlt3L) é inserido no locus TK (*por exemplo*, posição 80.962 a 81.032 de SEQ ID NO: 2), dividindo o gene TK e obliterando-o (“VACVΔE5R-OX40L-TK(-)”; “VACVΔE5R-hFlt3L-TK(-)”). Em algumas modalidades, VACVΔE5R abrange um vírus vaccinia recombinante em que toda ou a maioria da sequência do gene E5R é substituída por um primeiro gene específico de interesse (*por exemplo*, hFlt3L) e um segundo gene de interesse (*por exemplo*, OX40L) é inserido no Locus TK (“VACVΔE5R-hFlt3L-TK(-)-OX40L”). Em

algumas modalidades, os vírus VACVΔE5R modificados da presente tecnologia são ainda modificados para expressar pelo menos um outro gene heterólogo, tal como qualquer um ou mais de hOX40L, hFlt3L, hIL-2, hIL-12, hIL-15, hIL-15/IL-15Rα, hIL-18, hIL-21, anti-huCTLA-4, anti-huPD-1, anti-huPD-L1, GITRL, 4-1BBL, ou CD40L e/ou incluir pelo menos uma outra mutação ou deleção de gene viral, como qualquer uma ou mais dentre as seguintes deleções virais de vaccinia: E3L (ΔE3L); E3LΔ83N; C7L (ΔC7L); B2R (ΔB2R), B19R (B18R; ΔWR200); E5R; K7R; C12L (IL18BP); B8R; B14R; N1L; C11R; K1L; M1L; N2L; e/ou WR199. Por exemplo, em algumas modalidades, a divulgação da presente tecnologia fornece um vírus VACVΔE3L-hFlt3L-anti-CTLA-4-OX40L-ΔE5R recombinante. Como outro exemplo, em algumas modalidades, o locus TK do genoma da vaccinia é modificado por meio de recombinação homóloga para expressar ambas as cadeias pesada e leve de um anticorpo, tal como anti-CTLA-4, em que as sequências de codificação da cadeia pesada e leve são separadas por um cassete incluindo um sítio de clivagem de furina seguido por uma sequência de peptídeo 2A (Pep2A) para produzir VACV-TK(-)-anti-CTLA-4. Em algumas modalidades, o genoma de VACV-TK(-)-anti-CTLA-4 é ainda modificado para compreender uma deleção de E5R, em que toda ou a maioria da sequência do gene E5R é substituída por um primeiro gene específico de interesse (*por exemplo*, hFlt3L) e um segundo gene específico de interesse (*por exemplo*, OX40L), em que as sequências de codificação do primeiro e do segundo genes específicos de interesse são separadas por um cassete incluindo um sítio de clivagem de furina, seguido por uma sequência de peptídeo 2A (Pep2A), formando assim um vírus recombinante, como VACV-TK$^-$-anti-CTLA-4-E5R$^-$-hFlt3L-OX40L (or VACVΔE5R-TK(-)-anti-CTLA-4-hFlt3L-OX40L). Em outras modalidades, os vírus VACVΔE5R da presente tecnologia não expressam quaisquer outros genes heterólogos e/ou não incluem quaisquer mutações ou deleções de genes virais adicionais além das especificamente indicadas no nome do vírus.

[0375] O termo "VACVΔB2R" é usado neste documento para se referir a um vírus mutante vaccinia ou uma vacina compreendendo o vírus, no qual o gene B2R não é expresso, expresso em níveis tão baixos que não têm efeito, ou a proteína expressa não é funcional (*por exemplo*, é uma mutação nula). Conforme usado neste documento, "VACVΔB2R" abrange um vírus vaccinia (VACV) recombinante que não expressa uma proteína B2 funcional. Em algumas modalidades, o vírus vaccinia é derivado da cepa Western Reserve (WR). Em algumas modalidades, o mutante ΔB2R inclui uma sequência heteróloga no lugar de toda ou a maioria da sequência do gene B2R. Por exemplo, conforme usado neste documento, "VACVΔB2R" abrange uma sequência de ácido nucleico de vírus vaccinia recombinante, em que a sequência de ácido nucleico correspondente à posição de B2R no genoma de VACV (*por exemplo*, posição 164.856 to 165.530 de SEQ ID NO: 2) é substituído por uma sequência de ácido nucleico heterólogo compreendendo uma estrutura de leitura aberta que codifica um gene específico de interesse (SG), tal como OX40L humano ("VACVΔB2R-OX40L") ou ligante de tirosina quinase 3 tipo Fms humano (hFlt3L) (“VACVΔB2R-hFlt3L”). Em algumas modalidades, a sequência de ácido nucleico heterólogo compreende uma estrutura de leitura aberta que codifica um marcador selecionável. Em algumas modalidades, o marcador selecionável é uma proteína fluorescente (*por exemplo*, gpt, GFP, mCherry). Em algumas modalidades, o vírus VACVΔB2R abrange um vírus vaccinia recombinante que não expressa uma proteína timidina quinase funcional (TK). Em algumas modalidades, um gene específico de interesse (*por exemplo*, OX40L, hFlt3L) é inserido no locus TK (*por exemplo*, posição 80.962 a 81.032 de SEQ ID NO: 2), dividindo o gene TK e obliterando-o (“VACVΔB2R-OX40L-TK(-)”; “VACVΔB2R-hFlt3L-TK(-)”). Em algumas modalidades, VACVΔB2R abrange um vírus vaccinia recombinante em que toda ou a maioria da sequência do gene B2R é substituída por um primeiro gene específico de interesse (*por exemplo*, hFlt3L) e um segundo gene de interesse (*por exemplo*, OX40L) é inserido no Locus TK (“VACVΔB2R-

hFlt3L-TK(-)-OX40L"). Em algumas modalidades, os vírus VACVΔB2R modificados da presente tecnologia são ainda modificados para expressar pelo menos um outro gene heterólogo, tal como qualquer um ou mais de hOX40L, hFlt3L, hIL-2, hIL-12, hIL-15, hIL-15/IL-15Rα, hIL-18, hIL-21, anti-huCTLA-4, anti-huPD-1, anti-huPD-L1, GITRL, 4-1BBL, ou CD40L e/ou incluir pelo menos uma outra mutação ou deleção de gene viral, como qualquer uma ou mais dentre as seguintes deleções virais de vaccinia: E3L (ΔE3L); E3LΔ83N; C7L (ΔC7L); B19R (B18R; ΔWR200); E5R; K7R; C12L (IL18BP); B8R; B14R; N1L; C11R; K1L; M1L; N2L; e/ou WR199. Como outro exemplo, em algumas modalidades, o locus TK do genoma da vaccinia é modificado por meio de recombinação homóloga para expressar ambas as cadeias pesada e leve de um anticorpo, tal como anti-CTLA-4, em que as sequências de codificação da cadeia pesada e leve são separadas por um cassete incluindo um sítio de clivagem de furina seguido por uma sequência de peptídeo 2A (Pep2A) para produzir VACV-TK(-)-anti-CTLA-4. Em algumas modalidades, o genoma de VACV-TK(-)-anti-CTLA-4 é ainda modificado para compreender uma deleção de B2R, em que toda ou a maioria da sequência do gene B2R é substituída por um primeiro gene específico de interesse (*por exemplo*, hFlt3L) e um segundo gene específico de interesse (*por exemplo*, OX40L), em que as sequências de codificação do primeiro e do segundo genes específicos de interesse são separadas por um cassete incluindo um sítio de clivagem de furina, seguido por uma sequência de peptídeo 2A (Pep2A). Em outras modalidades, os vírus VACVΔB2R da presente tecnologia não expressam quaisquer outros genes heterólogos e/ou não incluem quaisquer mutações ou deleções de genes virais adicionais além das especificamente indicadas no nome do vírus.

[0376] O termo "MYXVΔM31R" é usado neste documento para se referir a um vírus mutante mixoma ou uma vacina compreendendo o vírus, no qual o gene M31R não é expresso, expresso em níveis tão baixos que não têm efeito, ou a proteína expressa não é funcional (*por exemplo*, é uma mutação nula). O vírus mixoma M31R é o ortólogo do vírus vaccinia E5R. Conforme

usado neste documento, "MYXVΔM31R" abrange um vírus mixoma recombinante que não expressa uma proteína M31R funcional. Em algumas modalidades, o mutante ΔM31R inclui uma sequência heteróloga no lugar de toda ou a maioria da sequência do gene M31R. Por exemplo, conforme usado neste documento, "MYXVΔM31R" abrange uma sequência de ácido nucleico de vírus mixoma recombinante, em que a sequência de ácido nucleico correspondente à posição de M31R no genoma de MYXV (*por exemplo*, posição 30.138 to 31.319 do genoma MYXV) é substituído por uma sequência de ácido nucleico heterólogo compreendendo uma estrutura de leitura aberta que codifica um gene específico de interesse (SG), tal como OX40L humano (“MYXVΔM31R-OX40L”) ou ligante de tirosina quinase 3 tipo Fms humano (hFlt3L) gene (“MYXVΔM31R-hFlt3L”). Em algumas modalidades, MYXVΔM31R engloba um MYXV recombinante em que o locus M31R é modificado para expressar um ou mais genes heterólogos. Por exemplo, em algumas modalidades, MYXVΔM31R abrange um vírus MYXV recombinante em que toda ou a maioria da sequência do gene M31R é substituída por um primeiro gene específico de interesse (*por exemplo*, hFtl3L) e um segundo gene específico de interesse (*por exemplo*, OX40L), em que as sequências de codificação do primeiro e do segundo genes específicos de interesse são separadas por um cassete incluindo um sítio de clivagem de furina, seguido por uma sequência de peptídeo 2A (Pep2A), formando assim um vírus recombinante, como “MYXVΔM31R-hFlt3L-OX40L.” Em algumas modalidades, a sequência de ácido nucleico heterólogo compreende ainda uma estrutura de leitura aberta que codifica um marcador selecionável. Em algumas modalidades, o marcador selecionável é uma proteína fluorescente (*por exemplo*, gpt, GFP, mCherry). Em algumas modalidades, o vírus MYXVΔM31R abrange um vírus mixoma recombinante que não expressa uma proteína timidina quinase funcional (TK). Em algumas modalidades, um gene específico de interesse (*por exemplo*, OX40L, hFlt3L) é inserido no locus TK (*por exemplo*, posição 57.797 a 58.333 do genoma do mixoma), dividindo o gene

TK e obliterando-o (“MYXVΔM31R-OX40L-TK(-)”; “MYXVΔM31R-hFlt3L-TK(-)”. Em algumas modalidades, MYXVΔM31R abrange um vírus mixoma recombinante em que toda ou a maioria da sequência do gene M31R é substituída por um primeiro gene específico de interesse (*por exemplo*, hFlt3L) e um segundo gene de interesse (*por exemplo*, OX40L) é inserido no Locus TK (“MYXVΔM31R-hFlt3L-TK(-)-OX40L”). Em algumas modalidades, os vírus MYXVΔM31R modificados da presente tecnologia são ainda modificados para expressar pelo menos um outro gene heterólogo, tal como qualquer um ou mais de hOX40L, hFlt3L, hIL-2, hIL-12, hIL-15, hIL-15/IL-15Rα, hIL-18, hIL-21, anti-huCTLA-4, anti-huPD-1, anti-huPD-L1, GITRL, 4-1BBL, ou CD40L e/ou incluir pelo menos uma outra mutação ou deleção de gene viral, como qualquer uma ou mais dentre os seguintes ortólogos de mixoma de deleções virais de vaccinia: E3L (ΔE3L); E3LΔ83N; C7L (ΔC7L); B2R (ΔB2R), B19R (B18R; ΔWR200); K7R; C12L (IL18BP); B8R; B14R; N1L; C11R; K1L; M1L; N2L; e/ou WR199. Em outras modalidades, os vírus MYXVΔM31R da presente tecnologia não expressam quaisquer outros genes heterólogos e/ou não incluem quaisquer mutações ou deleções de genes virais adicionais além das especificamente indicadas no nome do vírus.

[0377] O termo "MYXVΔM63R" é usado neste documento para se referir a um vírus mutante mixoma ou uma vacina compreendendo o vírus, no qual o gene M63R não é expresso, expresso em níveis tão baixos que não têm efeito, ou a proteína expressa não é funcional (*por exemplo*, é uma mutação nula). Conforme usado neste documento, "MYXVΔM63R" abrange um vírus mixoma recombinante que não expressa uma proteína M63R funcional. Em algumas modalidades, o mutante ΔM63R inclui uma sequência heteróloga no lugar de toda ou a maioria da sequência do gene M63R. Por exemplo, conforme usado neste documento, "MYXVΔM63R" abrange uma sequência de ácido nucleico de vírus mixoma recombinante, em que a sequência de ácido nucleico correspondente à posição de M63R no genoma de MYXV é substituído por uma sequência de ácido nucleico heterólogo compreendendo

uma estrutura de leitura aberta que codifica um gene específico de interesse (SG), tal como OX40L humano (“MYXVΔM63R-OX40L”) ou ligante de tirosina quinase 3 tipo Fms humano (hFlt3L) gene (“MYXVΔM63R-hFlt3L”). Em algumas modalidades, MYXVΔM63R engloba um MYXV recombinante em que o locus M63R é modificado para expressar um ou mais genes heterólogos. Por exemplo, em algumas modalidades, MYXVΔM63R abrange um vírus MYXV recombinante em que toda ou a maioria da sequência do gene M63R é substituída por um primeiro gene específico de interesse (*por exemplo*, hFtl3L) e um segundo gene específico de interesse (*por exemplo*, OX40L), em que as sequências de codificação do primeiro e do segundo genes específicos de interesse são separadas por um cassete incluindo um sítio de clivagem de furina, seguido por uma sequência de peptídeo 2A (Pep2A), formando assim um vírus recombinante, como “MYXVΔM63R-hFlt3L-OX40L.” Adicionalmente ou alternativamente, em algumas modalidades, a sequência de ácido nucleico heterólogo compreende uma estrutura de leitura aberta que codifica um marcador selecionável. Em algumas modalidades, o marcador selecionável é uma proteína fluorescente (*por exemplo*, gpt, GFP, mCherry). Em algumas modalidades, o vírus MYXVΔM63R abrange um vírus mixoma recombinante que não expressa uma proteína timidina quinase funcional (TK). Em algumas modalidades, um gene específico de interesse (*por exemplo*, OX40L, hFlt3L) é inserido no locus TK (*por exemplo*, posição 57.797 a 58.333 do genoma do mixoma), dividindo o gene TK e obliterando-o (“MYXVΔM63R-OX40L-TK(-)”; “MYXVΔM63R-hFlt3L-TK(-)”). Em algumas modalidades, MYXVΔM63R abrange um vírus mixoma recombinante em que toda ou a maioria da sequência do gene M63R é substituída por um primeiro gene específico de interesse (*por exemplo*, hFlt3L) e um segundo gene de interesse (*por exemplo*, OX40L) é inserido no Locus TK (“MYXVΔM63R-hFlt3L-TK(-)-OX40L”). Em algumas modalidades, os vírus MYXVΔM63R modificados da presente tecnologia são ainda modificados para expressar pelo menos um outro gene heterólogo, tal como qualquer um ou mais de hOX40L, hFlt3L, hIL-2, hIL-12,

hIL-15, hIL-15/IL-15Rα, hIL-18, hIL-21, anti-huCTLA-4, anti-huPD-1, anti-huPD-L1, GITRL, 4-1BBL, ou CD40L e/ou incluir pelo menos uma outra mutação ou deleção de gene viral, como qualquer uma ou mais dentre os seguintes ortólogos de mixoma de deleções virais de vaccinia: E3L (ΔE3L); E3LΔ83N; C7L (ΔC7L); B2R (ΔB2R), B19R (B18R; ΔWR200); K7R; C12L (IL18BP); B8R; B14R; N1L; C11R; K1L; M1L; N2L; e/ou WR199. Em algumas modalidades, MYXVΔM63R é adicionalmente projetado para compreender deleções de genes de mixoma adicionais (*por exemplo*, ΔM31R, ΔM62R e/ou ΔM64R). Em outras modalidades, os vírus MYXVΔM63R da presente tecnologia não expressam quaisquer outros genes heterólogos e/ou não incluem quaisquer mutações ou deleções de genes virais adicionais além das especificamente indicadas no nome do vírus.

[0378] O termo "MYXVΔM64R" é usado neste documento para se referir a um vírus mutante mixoma ou uma vacina compreendendo o vírus, no qual o gene M64R não é expresso, expresso em níveis tão baixos que não têm efeito, ou a proteína expressa não é funcional (*por exemplo*, é uma mutação nula). Conforme usado neste documento, "MYXVΔM64R" abrange um vírus mixoma recombinante que não expressa uma proteína M64R funcional. Em algumas modalidades, o mutante ΔM64R inclui uma sequência heteróloga no lugar de toda ou a maioria da sequência do gene M64R. Por exemplo, conforme usado neste documento, "MYXVΔM64R" abrange uma sequência de ácido nucleico de vírus mixoma recombinante, em que a sequência de ácido nucleico correspondente à posição de M64R no genoma de MYXV é substituído por uma sequência de ácido nucleico heterólogo compreendendo uma estrutura de leitura aberta que codifica um gene específico de interesse (SG), tal como OX40L humano (“MYXVΔM64R-OX40L”) ou ligante de tirosina quinase 3 tipo Fms humano (hFlt3L) gene (“MYXVΔM64R-hFlt3L”). Em algumas modalidades, MYXVΔM64R engloba um MYXV recombinante em que o locus M64R é modificado para expressar um ou mais genes heterólogos. Por exemplo, em algumas modalidades, MYXVΔM64R abrange um vírus MYXV

recombinante em que toda ou a maioria da sequência do gene M64R é substituída por um primeiro gene específico de interesse (*por exemplo*, hFtl3L) e um segundo gene específico de interesse (*por exemplo*, OX40L), em que as sequências de codificação do primeiro e do segundo genes específicos de interesse são separadas por um cassete incluindo um sítio de clivagem de furina, seguido por uma sequência de peptídeo 2A (Pep2A), formando assim um vírus recombinante, como "MYXVΔM64R-hFlt3L-OX40L." Adicionalmente ou alternativamente, em algumas modalidades, a sequência de ácido nucleico heterólogo compreende uma estrutura de leitura aberta que codifica um marcador selecionável. Em algumas modalidades, o marcador selecionável é uma proteína fluorescente (*por exemplo*, gpt, GFP, mCherry). Em algumas modalidades, o vírus MYXVΔM64R abrange um vírus mixoma recombinante que não expressa uma proteína timidina quinase funcional (TK). Em algumas modalidades, um gene específico de interesse (*por exemplo*, OX40L, hFlt3L) é inserido no locus TK (*por exemplo*, posição 57.797 a 58.333 do genoma do mixoma), dividindo o gene TK e obliterando-o ("MYXVΔM64R-OX40L-TK(-)"; "MYXVΔM64R-hFlt3L-TK(-)"). Em algumas modalidades, MYXVΔM64R abrange um vírus mixoma recombinante em que toda ou a maioria da sequência do gene M64R é substituída por um primeiro gene específico de interesse (*por exemplo*, hFlt3L) e um segundo gene de interesse (*por exemplo*, OX40L) é inserido no Locus TK ("MYXVΔM64R-hFlt3L-TK(-)-OX40L"). Em algumas modalidades, os vírus MYXVΔM64R modificados da presente tecnologia são ainda modificados para expressar pelo menos um outro gene heterólogo, tal como qualquer um ou mais de hOX40L, hFlt3L, hIL-2, hIL-12, hIL-15, hIL-15/IL-15Rα, hIL-18, hIL-21, anti-huCTLA-4, anti-huPD-1, anti-huPD-L1, GITRL, 4-1BBL, ou CD40L e/ou incluir pelo menos uma outra mutação ou deleção de gene viral, como qualquer uma ou mais dentre os seguintes ortólogos de mixoma de deleções virais de vaccinia: E3L (ΔE3L); E3LΔ83N; C7L (ΔC7L); B2R (ΔB2R), B19R (B18R; ΔWR200); K7R; C12L (IL18BP); B8R; B14R; N1L; C11R; K1L; M1L; N2L; e/ou WR199. Em algumas modalidades,

MYXVΔM64R é adicionalmente projetado para compreender deleções de genes de mixoma adicionais (*por exemplo*, ΔM31R, ΔM62R e/ou ΔM63R). Em outras modalidades, os vírus MYXVΔM64R da presente tecnologia não expressam quaisquer outros genes heterólogos e/ou não incluem quaisquer mutações ou deleções de genes virais adicionais além das especificamente indicadas no nome do vírus.

[0379] Conforme usado neste documento, "vírus oncolítico" se refere a um vírus que infecta preferencialmente células de câncer, se replica em tais células e induz a lise das células de câncer por meio de seu processo de replicação. Exemplos não limitantes de vírus oncolíticos de ocorrência natural incluem vírus estomatite vesicular, reovírus, bem como vírus projetados para serem oncoseletivos, como adenovírus, vírus da doença de Newcastle e vírus herpes simplex (*ver, por exemplo,* Nemunaitis, *J. Invest. New Drugs* 17(4):375-86 (1999); Kirn, DH *et al.*, *Nat. Rev. Cancer* 9(1):64-71(2009); Kirn *et al.*, *Nat. Med*. 7:781 (2001); Coffey *et al*., *Science* 282:1332 (1998)). O vírus vaccinia infecta vários tipos de células, mas se replica preferencialmente em células de tumor devido ao fato de as células de tumor terem um metabolismo que favorece a replicação, exibem ativação de certas vias que também favorecem a replicação e criam um ambiente que foge do sistema imunológico inato, o que também favorece replicação viral.

[0380] Conforme usado neste documento, "parenteral", quando usado no contexto da administração de uma substância ou composição terapêutica, inclui qualquer via de administração diferente da administração por meio de do trato alimentar. Particularmente relevantes para os métodos divulgados neste documento são a administração intravenosa (incluindo, por exemplo, por meio de da veia porta hepática para distribuição hepática), intratumoral ou intratecal.

[0381] Os termos "excipiente farmaceuticamente aceitável", "diluente farmaceuticamente aceitável", "veículo farmaceuticamente aceitável" ou "adjuvante farmaceuticamente aceitável" referem-se a um excipiente, diluente,

veículo e/ou adjuvante útil na preparação de uma composição farmacêutica que é geralmente segura, não tóxico e nem biologicamente nem de outra forma indesejável, e inclui um excipiente, diluente, veículo e adjuvante que é aceitável para uso farmacêutico. "Um excipiente, diluente, carreador e/ou adjuvante farmaceuticamente aceitável", conforme usado no relatório descritivo e nas reivindicações, inclui um ou mais dentre tais excipientes, diluentes, carreadores e adjuvantes.

[0382] Conforme usado neste documento, "prevenção", "prevenir" ou "prevenção" de um distúrbio ou condição refere-se a um ou mais compostos que, em uma amostra estatística, reduzem a ocorrência do distúrbio ou condição na amostra tratada em relação a um amostra de controle não tratada, ou retarda o início de um ou mais sintomas do distúrbio ou condição em relação à amostra de controle não tratada.

[0383] Conforme usado neste documento, o termo "recombinante" quando usado com referência, *por exemplo*, a um vírus, ou célula, ou ácido nucleico, ou proteína, ou vetor, indica que o vírus, célula, ácido nucleico, proteína ou vetor, foi modificado pela introdução de um ácido nucleico ou proteína heteróloga ou a alteração de um ácido nucleico ou proteína nativa, ou que o material é derivado de um vírus ou célula assim modificada. Assim, por exemplo, os vírus ou células recombinantes expressam genes que não são encontrados na forma nativa (não recombinante) do vírus ou célula que expressam genes nativos que são de outra forma anormalmente expressos, subexpressos ou não expressos.

[0384] Conforme usado neste documento, "tumor sólido" refere-se a todo o crescimento e proliferação de células neoplásicas e todas as células e tecidos pré-cancerosas e cancerosas, exceto para cânceres hematológicos, como linfomas, leucemias e mieloma múltiplo. Exemplos de tumores sólidos incluem, mas não estão limitados a: sarcoma de tecidos moles, como fibrossarcoma, mixossarcoma, lipossarcoma, condrossarcoma, sarcoma osteogênico, cordoma, angiossarcoma, endoteliossarcoma, linfangiossarcoma,

linfangioendoteliossarcoma, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing e outros tumores ósseos (por exemplo, osteossarcoma, histiocitoma fibroso maligno), leiomiossarcoma, rabdomiossarcoma, carcinoma de cólon, câncer de pâncreas, câncer de mama, câncer de ovário, câncer de próstata, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células escamosas carcinoma da glândula, carcinoma da glândula sebácea, carcinoma papilar, adenocarcinoma papilar, cistadenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma broncogênico, carcinoma de células renais, hepatoma, carcinoma do ducto biliar, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrionário, tumor de Wilms, câncer cervical, tumor testicular, carcinoma do pulmão, carcinoma do pulmão de células pequenas, carcinoma da bexiga, carcinoma epitelial, tumores do cérebro/CNS (por exemplo, astrocitoma, glioma, glioblastoma, tumores da infância, como tumor teratóide/rabdóide atípico, tumor de células germinativas, tumor embrionário, ependimoma) meduloblastoma, craniofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, meningioma, melanoma, neuroblastoma e retinoblastoma. Alguns dos tumores sólidos mais comuns para os quais as composições e métodos da presente divulgação seriam úteis incluem: câncer de cabeça e pescoço, adenocarcinoma retal, glioma, meduloblastoma, carcinoma urotelial, adenocarcinoma pancreático, câncer uterino (por exemplo, câncer endometrial, câncer de trompa de Falópio), câncer de ovário, câncer cervical, adenocarcinoma de próstata, câncer de pulmão de células não pequenas (escamoso e adenocarcinoma), câncer de pulmão de células pequenas, melanoma, carcinoma de mama, câncer de bexiga, carcinoma ductal in situ, carcinoma de células renais, e carcinoma hepatocelular, tumores adrenais (por exemplo, carcinoma adrenocortical), esofágico, olho (por exemplo, melanoma, retinoblastoma), vesícula biliar, gastrointestinal, tumor de Wilms, coração, cabeça e pescoço, laríngeo e hipofaríngeo, oral (por exemplo, lábio, boca, glândula salivar), nasofaríngea, neuroblastoma, peritoneal, pituitária, sarcoma de Kaposi, intestino delgado, estômago, testicular, timo,

tireóide, paratireóide, tumor vaginal e as metástases de qualquer um dos anteriores.

[0385] Conforme usado neste documento, os termos "indivíduo", "sujeito" ou "paciente" são usados indistintamente e se referem a um organismo individual, um vertebrado, um mamífero ou um humano. Em algumas modalidades, "indivíduo" significa qualquer paciente animal (mamífero, humano ou outro) que pode ser afetado com câncer e, portanto, precisar de tratamento. Em algumas modalidades, "indivíduo" significa humano.

[0386] Conforme usado neste documento, um "efeito terapêutico sinérgico" em algumas modalidades reflete um efeito terapêutico maior do que aditivo que é produzido por uma combinação de pelo menos dois agentes e que excede o que de outra forma resultaria da administração individual dos agentes. Em algumas modalidades, um "efeito terapêutico sinérgico" reflete um efeito terapêutico aumentado que é produzido por uma combinação de pelo menos dois agentes em relação à administração individual dos agentes. Por exemplo, doses mais baixas de um ou mais agentes podem ser usadas no tratamento de uma doença ou distúrbio, resultando em eficácia terapêutica aumentada e efeitos colaterais diminuídos.

[0387] "Tratar" ou "tratamento", “tratado” conforme usado neste documento, cobre o tratamento de uma doença ou distúrbio descrito neste documento, em um indivíduo, como um ser humano, e inclui: (i) inibir uma doença ou distúrbio, *ou seja*, interromper seu desenvolvimento; (ii) aliviar uma doença ou distúrbio, *ou seja*, causar a regressão do distúrbio; (iii) retardar a progressão da doença; e/ou (iv) inibir, aliviar ou retardar a progressão de um ou mais sintomas da doença ou distúrbio. Em algumas modalidades, o tratamento significa que os sintomas associados à doença são, *por exemplo*, aliviados, reduzidos, curados ou colocados em um estado de remissão. Em algumas modalidades, "inibir" significa reduzir ou retardar o crescimento de um tumor. Em algumas modalidades, a inibição do crescimento do tumor pode ser, por exemplo, em 5% ou mais, 10% ou mais, 20% ou mais, 30% ou mais, 40% ou

mais, 50% ou mais, 60% ou mais, 70% ou mais, 80% ou mais, ou 90% ou mais. Em algumas modalidades, a inibição pode ser completa.

[0388] Também deve ser apreciado que os vários modos de tratamento ou prevenção de doenças e condições médicas, conforme descrito, pretendem significar "substancial", que inclui tratamento ou prevenção total, mas também inferior ao total, e em que algum resultado biologicamente ou clinicamente relevante é alcançado.

[0389] Conforme usado neste documento, "imunidade de tumor" refere-se a um ou mais processos pelos quais os tumores escapam ao reconhecimento e eliminação pelo sistema imunológico. Assim, como um conceito terapêutico, a imunidade de tumor é "tratado" quando tal evasão é atenuada ou eliminada e os tumores são reconhecidos e atacados pelo sistema imunológico (o último sendo denominado neste documento "imunidade antitumor"). Um exemplo de reconhecimento de tumor é a ligação do tumor, e exemplos de ataque do tumor são a redução do tumor (em número, tamanho ou ambos) e eliminação do tumor.

[0390] Conforme usado neste documento, "célula T" refere-se a um linfócito derivado do timo que participa de uma variedade de reações reações imunológicass adaptativas mediadas por células. Conforme usado neste documento, "célula T efetora" inclui células T auxiliares, assassinas e reguladoras.

[0391] Conforme usado neste documento, "célula T auxiliar" refere-se a uma célula $CD4^+$ T; As células T auxiliares reconhecem o antígeno ligado às moléculas MHC de Classe II. Existem pelo menos dois tipos de células T auxiliares, Th1 e Th2, que produzem citocinas diferentes.

[0392] Conforme usado neste documento, "célula T citotóxica" refere-se a uma célula T que geralmente carrega marcadores moleculares CD8 em sua superfície ($CD8^+$) e que funciona na imunidade mediada por células destruindo uma célula T alvo com uma molécula antigênica específica em sua superfície. As células T citotóxicas também liberam Granzyme, uma serina

protease que pode entrar nas células T alvo por meio de do poro formado por perforina e induzir a apoptose (morte celular). Granzyme serve como um marcador de fenótipo citotóxico. Outros nomes para células T citotóxicas incluem CTL, célula T citolítica, linfócito T citolítico, célula T assassina ou linfócito T assassino. Os alvos de células T citotóxicas podem incluir células infectadas por vírus, células infectadas com parasitas bacterianos ou protozoários ou células de câncer. A maioria das células T citotóxicas tem a proteína CD8 presente em suas superfícies celulares. O CD8 é atraído por porções da molécula de MHC de Classe I. Normalmente, uma célula T citotóxica é uma célula $CD8^+$.

[0393] Conforme usado neste documento, "leucócitos infiltrantes de tumor" refere-se a glóbulos brancos de um indivíduo que sofre de câncer (como melanoma), que residem ou deixaram a circulação (sangue ou fluido linfático) e migraram para um tumor.

[0394] Conforme usado neste documento, "vetor" inclui qualquer elemento genético, como um plasmídeo, fago, transposon, cosmídeo, cromossomo, cromossomo artificial, vírus, vírion, *etc.*, que é capaz de replicação quando associado aos elementos de controle adequados e que pode transferir sequências de genes entre células. Assim, o termo inclui veículos de clonagem e expressão, bem como vetores virais. Em algumas modalidades, vetores úteis são contemplados como sendo aqueles vetores nos quais o segmento de ácido nucleico a ser transcrito está posicionado sob o controle transcricional de um promotor. Um "promotor" refere-se a uma sequência de DNA reconhecida pela maquinaria sintética da célula, ou maquinaria sintética introduzida, necessária para iniciar a transcrição específica de um gene. As frases "posicionado operacionalmente", "ligado operacionalmente", "sob controle" ou "sob controle transcricional" significa que o promotor está na localização e orientação corretas em relação ao ácido nucleico para controlar a iniciação da RNA polimerase e a expressão do gene. O termo "vetor ou construto de expressão" significa qualquer tipo de construto

genético contendo um ácido nucleico no qual parte ou toda a sequência de codificação de ácido nucleico é capaz de ser transcrita. Em algumas modalidades, a expressão inclui a transcrição do ácido nucleico, por exemplo, para gerar um produto de polipeptídeo biologicamente ativo ou RNA inibitório (*por exemplo*, shRNA, miRNA) de um gene transcrito. Um exemplo não limitativo de um vetor pCB-OX40L-gpt de acordo com a presente tecnologia é estabelecido na SEQ ID NO: 3. Um exemplo não limitativo de um pUC57-hFlt3L-GFP de acordo com a presente tecnologia é estabelecido na SEQ ID NO: 4. Um exemplo não limitativo de um vetor pUC57-delC7-hOX40L-mCherry é apresentado na SEQ ID NO: 5.

[0395] O termo "virulência", conforme usado neste documento, refere-se à capacidade relativa de um patógeno de causar doença. O termo "virulência atenuada" ou "virulência reduzida" é usado neste documento para se referir a uma capacidade relativa reduzida de um patógeno em causar doença.

II. Sistema imunológico e câncer

[0396] Os tumores malignos, como o terapias convencionais e apresentam desafios terapêuticos significativos. A imunoterapia tem sido uma área de pesquisa em evolução e uma opção adicional para o tratamento de certos tipos de câncer. A abordagem da imunoterapia se baseia na lógica de que o sistema imunológico pode ser estimulado a identificar células de tumor e direcioná-las para destruição.

[0397] Numerosos estudos apóiam a importância da presença diferencial de componentes do sistema imunológico na progressão do câncer (Jochems *et al*., *Exp. Biol. Med*. 236(5):567–579 (2011)). Os dados clínicos sugerem que altas densidades de linfócitos infiltrantes de tumor estão ligadas a resultados clínicos melhorados (Mlecnik *et al*., *Cancer Metastasis Rev.* 30: 5-12, (2011)). A correlação entre uma infiltraçãode linfócitos robusta e a sobrevivência do paciente foi relatada em vários tipos de câncer, incluindo melanoma, ovário, cabeça e pescoço, mama, bexiga, urotelial, colorretal,

pulmão, hepatocelular, vesícula biliar e câncer de esôfago (Angell *et al*., *Current Opinion in Immunology* 25:1-7, (2013)). Infiltrados reações imunológicass de tumor incluem macrófagos, células dendríticas (DC), monócitos, neutrófilos, células assassinas naturais (NK), linfócitos nativos e de memória, células B e células T efetoras (linfócitos T), principalmente responsáveis pelo reconhecimento de antígenos expressos pelas células do tumor e subsequente destruição das células de tumor por células T citotóxicas.

[0398] Apesar da apresentação de antígenos pelas células de câncer e da presença de células imunológicas que poderiam reagir potencialmente contra as células de tumor, em muitos casos, o sistema imunológico não é ativado ou é afirmativamente suprimido. A chave para esse fenômeno é a capacidade dos tumores de se protegerem da resposta imunológica, coagindo as células do sistema imunológico a inibir outras células do sistema imunológico. Os tumores desenvolvem vários mecanismos imunomoduladores para evitar as respostas imunológicas antitumorais. Por exemplo, as células de tumor secretam citocinas inibidoras do sistema imunológico (como TGF-β) ou induzem células imunológicas, como células $CD4^+$ T reguladoras e macrófagos, em lesões de tumor para secretar essas citocinas. Os tumores também têm a capacidade de influenciar as células $CD4^+$ T para expressar o fenótipo regulatório. O resultado geral são respostas de células T prejudicadas e indução prejudicada de apoptose ou capacidade reações imunológicas anti tumoral reduzida de células T citotóxicas $CD8^{+.}$ Além disso, a expressão alterada associada ao tumor de MHC classe I na superfície das células de tumor as torna "invisíveis" para a resposta imunológica (Garrido *et al*. *Cancer Immunol. Immunother*. 59(10):1601–1606 (2010)). A inibição das funções de apresentação de antígenos e células dendríticas (DC) contribui adicionalmente para a evasão da imunidade anti tumoral (Gerlini *et al. Am. J. Pathol*. 165(6):1853–1863 (2004)).

[0399] Além disso, a natureza imunossupressora local do microambiente do tumor, junto com a edição reações imunológicas, pode levar

ao escape de subpopulações de células de câncer que não expressam os antígenos alvo. Assim, encontrar uma abordagem que promova a preservação e/ou restauração das atividades anti tumorais do sistema imunológico seria de considerável benefício terapêutico.

[0400] Os pontos de verificação imunológico s foram implicados na regulação negativa da imunidade anti tumoral mediada por tumor e usados como alvos terapêuticos. Foi demonstrado que a disfunção das células T ocorre simultaneamente com uma expressão induzida dos receptores inibitórios, CTLA-4 e polipeptídeo de morte programada 1 (PD-1), membros da família de receptores CD28. PD-1 é um membro inibitório da família de receptores CD28 que, além de PD-1, inclui CD28, CTLA-4, ICOS e BTLA. No entanto, embora a promessa em relação ao uso de imunoterapia no tratamento do melanoma tenha sido enfatizada pelo uso clínico e até mesmo pela aprovação regulatória de medicamentos anti-CTLA-4 (ipilimumabe) e anti-PD-1 (*por exemplo*, pembrolizumabe e nivolumabe), a resposta dos pacientes a essas imunoterapias tem sido limitada. Ensaios clínicos, com foco no bloqueio desses sinais inibitórios em células T (*por exemplo*, CTLA-4, PD-1 e o ligante de PD-1, PD-L1), mostraram que a reversão da supressão de células T é crítica para o sucesso da imunoterapia (Sharma *et al*., *Science* 348(6230):56-61 (2015); Topalian *et al*., *Curr. Opin. Immunol*. 24(2):202-217 (2012)). Essas observações destacam a necessidade de desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas para controlar o sistema imunológico contra o câncer.

III. <u>Poxvírus: Vírus Vaccinia (VACV), Vírus Vaccinia Ankara Modificado (MVA) e Vírus Mixoma (MYXV)</u>

[0401] Poxvírus, tais como vírus vaccinia projetados, estão na vanguarda como terapia oncolítica para cânceres metastáticos (Kirn *et al*., *Nature Review Cancer* 9: 64-71 (2009)). Os vírus vaccinia (VACV), um membro da família do Poxvírus, é um grande vírus DNA, que tem um ciclo de vida rápido e disseminação hematogênica eficiente para tecidos distantes. Os poxvírus são bem adequados como vetores para expressar múltiplos

transgenes em células de câncer e, assim, aumentar a eficácia terapêutica (Breitbach *et al*., *Current Pharmaceutical biotechnology* 13: 1768-1772 (2012)). Estudos pré-clínicos e ensaios clínicos demonstraram a eficácia do uso de vírus vaccinia oncolíticos e outros poxvírus para o tratamento de cânceres avançados refratários à terapia convencional (Park *et al*., *Lacent Oncol.* 9:533-542 (2008); Kirn *et al*., *PLoS Med* 4:e353 (2007); Thorne *et al*., *J. Clin. Invest.* 117:3350-3358 (2007)). A terapia oncolítica com base em poxvírus tem a vantagem de matar células de câncer por meio de uma combinação de lise celular, apoptose e necrose. Também desencadeia a via de detecção reações imunológicas inata que facilita o recrutamento de células imunológicas para os tumores e o desenvolvimento de respostas imunológicas adaptativas anti tumorais. As cepas de vaccinia oncolíticas atuais em ensaios clínicos (JX-594, por exemplo) são cepas replicativas. Eles usam vaccinia de tipo selvagem com deleção de timidina quinase para aumentar a seletividade do tumor e com expressão de transgenes, como fator estimulador de colônia de granulócitos macrófagos (GM-CSF) para estimular respostas imunológicas (Breitbach *et al*., *Curr. Pharm. Biotechnol.* 13:1768-1772 (2012)). Muitos estudos mostraram, no entanto, que a vaccinia de tipo selvagem tem efeitos imunossupressores em células apresentadoras de antígeno (APCs) (Engelmayer *et al.*, *J. Immunol.* 163:6762-6768 (1999); Jenne *et al*., *Gene Therapy* 7:1575-1583 (2000); P. Li *et al.*, *J. Immunol.* 175:6481-6488 (2005); Deng *et al*., *J. Virol.* 80: 9977-9987 (2006)) e, portanto, aumenta os efeitos imunossupressores e imunoevasivos dos próprios tumores.

[0402] A sequência do genoma do vírus vaccinia (cepa Western Reserve; WR) é estabelecida na SEQ ID NO: 2, e é fornecido pelo GenBank No. de Acesso AY243312.1.

[0403] O vírus Vaccinia Ankara Modificado (MVA) também é membro da família de Poxvírus. O MVA foi gerado por aproximadamente 570 passagens em série em fibroblastos de embrião de galinha (CEF) da cepa Ankara do vírus vaccinia (CVA) (Mayr *et al*., *Infection* 3: 6-14 (1975)). Como

consequência dessas passagens de longo prazo, o vírus MVA resultante contém extensas deleções do genoma e é altamente restrito a células hospedeiras a células aviárias (Meyer *et al*., *J. Gen. Virol*. 72:1031-1038 (1991)). Foi demonstrado em uma variedade de modelos animais que o MVA resultante é significativamente avirulento (Mayr *et al*., *Dev. Biol. Stand.* 41:225-34 (1978)).

[0404] A segurança e a imunogenicidade do MVA foram amplamente testadas e documentadas em ensaios clínicos, particularmente contra a varíola humana. Esses estudos incluíram mais de 120.000 indivíduos e demonstraram excelente eficácia e segurança em humanos. Além disso, em comparação com outras vacinas com base no vaccinia, o MVA enfraqueceu a virulência (infecciosidade) enquanto desencadeia uma boa resposta imunológica específica. Assim, o MVA se estabeleceu como um vetor de vacina seguro, com a capacidade de induzir uma resposta imunológica específica.

[0405] Devido às características mencionadas acima, o MVA se tornou um candidato atraente para o desenvolvimento de vetores MVA modificados, usados para expressão de genes recombinantes e vacinas. Como um vetor de vacina, o MVA foi investigado contra várias condições patológicas, incluindo HIV, tuberculose e malária, bem como câncer (Sutter *et al*., *Curr. Drug Targets Infect. Disord.* 3:263–271(2003); Gomez *et al*., *Curr. Gene Ther.* 8:97–120 (2008)).

[0406] Foi demonstrado que a infecção por MVA de células dendríticas (DC) derivadas de monócitos humanos causa ativação de DC, caracterizada pela regulação positiva de moléculas co-estimuladoras e secreção de citocinas pró-inflamatórias (Drillien *et al*., *J. Gen. Virol.* 85:2167–2175 (2004)). A este respeito, o MVA difere a partir do vírus vaccinia de tipo selvagem padrão (WT-VAC), que não consegue ativar as DCs. As células dendríticas podem ser classificadas em dois subtipos principais: células dendríticas convencionais (cDCs) e células dendríticas plasmocitóides (pDCs). O primeiro, especialmente o $CD103^+/CD8\alpha^+$ subtipo, são particularmente

adaptados a antígenos de apresentação cruzada para células T; os últimos são grandes produtores de IFN Tipo I.

[0407] A infecção viral de células humanas resulta na ativação de uma resposta imunológica inata (a primeira linha de defesa) mediada por interferóns tipo I, notavelmente interferón-alfa (α). Isso normalmente leva à ativação de uma "cascata" reações imunológicas, com recrutamento e proliferação de células T ativadas (tanto CTL quanto auxiliares) e, eventualmente, com produção de anticorpos. No entanto, os vírus expressam fatores que amortecem as respostas imunológicas do hospedeiro. O MVA é um imunógeno melhor do que o WT-VAC e se replica mal em células de mamíferos. (*Ver, e.g*., Brandler *et al*., *J. Virol.* 84:5314–5328 (2010)).

[0408] No entanto, o MVA não é totalmente não replicativo e contém alguma atividade imunossupressora residual. No entanto, o MVA demonstrou prolongar a sobrevivência dos indivíduos tratados.

[0409] A sequência do genoma MVA é apresentada na SEQ ID NO: 1 e é fornecido pelo GenBank No. de Acesso U94848.1.

[0410] O vírus mixoma (MYXV) é o membro prototípico do gênero Leporipoxvírus dentro da família *Poxviridae.* O genoma da cepa MYXV Lausanne (fornecido, por *exemplo*, pelo GenBank No. de Acesso AF170726.2) tem 161,8 kpb de tamanho, codificando cerca de 171 genes. A região central do genoma codifica menos de 100 genes que são altamente conservados em todos os poxvírus, enquanto as regiões genômicas terminais são enriquecidas por genes mais exclusivos que codificam fatores imunomoduladores e interativos do hospedeiro que estão envolvidos na subversão do sistema imunológico do hospedeiro e outras respostas anti-virais. O vírus mixoma exibe uma faixa de hospedeiros muito restrita e é patogênico apenas para coelhos europeus. Apesar de sua estreita faixa de hospedeiros na natureza, o MYXV demonstrou infectar de forma produtiva várias classes de células de câncer humanas. Características atraentes do MYXV como um agente oncolítico incluem sua capacidade de infectar de forma produtiva várias células de câncer

humanas e sua segurança consistente em todos os hospedeiros não coelhos testados, incluindo camundongos e humanos. Em algumas modalidades, o vírus mixoma é derivado da cepa Lausanne.

V. Proteína C7 do vírus vaccinia e MVA ou Vírus Vaccinia compreendendo a deleção de C7 (MVA∆C7L, VACV∆C7L), ou Vírus mixoma compreendendo a deleção de ortólogos C7 de mixoma

[0411] A proteína C7 do vírus vaccinia é um importante fator de alcance do hospedeiro para o ciclo de vida do vírus vaccinia em células de mamíferos. Homólogos C7L estão presentes em quase todos os poxvírus que infectam hospedeiros mamíferos. A deleção de ambos os genes da faixa do hospedeiro C7L e K1L torna o vírus incapaz de replicação em células humanas (Perkus *et al*., *Virology*, 1990). O vírus mutante deficiente de K1L e C7L ganha sua capacidade de se replicar em células HeLa humanas quando SAMD9 é nocauteado (Sivan *et al*., *MBio*, 2015). Descobriu-se que ambos K1 e C7 interagem com SAMD9 (Sivan *et al*., *MBio*, 2015). A super expressão de IRF1 leva à restrição do hospedeiro do vírus vaccinia com deleção dupla C7L e K1L (Meng *et al*., *Journal of Virology*, 2012). Ambos C7 e K1 interagem com SAMD9 *in vitro* (Sivan *et al*., *MBio.* 2015). Não se sabe se C7 modula diretamente a produção de IFN ou a sinalização. O IFN tipo I desempenha um papel importante na defesa do hospedeiro contra a infecção viral e, ainda assim, o papel do C7 na modulação imunológica da via do IFN não está claro.

[0412] Sem se pretender ficar limitado pela teoria, pensa-se que vaccinia C7 é um inibidor do tipo indução eu IFN e de sinalização de IFN. TANK Binding Kinase 1 (TBK1) é uma serina/treonina quinase que desempenha um papel crítico na indução de respostas imunológicas inatas a vários padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), incluindo ácidos nucleicos. Por um lado, receptores similares a RIG-I, como RIG-I e MDA5, que detectam 5 'trifosfato de RNA e dsRNA, respectivamente, interagem com uma proteína mitocondrial IPS-1 ou MAVS, levando à ativação e fosforilação de TBK1. O dsRNA endossômico se liga ao receptor Toll-tipo 3 (TLR3), o que

resulta no recrutamento de TRIF e TRAF3 e ativação de TBK1. Por outro lado, o DNA citosólico pode ser detectado pelo sensor citosólico de DNA GMP-AMP sintase (cGAS), que leva à produção de GMP-AMP cíclico (cGAMP). O cGAMP, por sua vez, liga-se ao adaptador STING localizado no retículo endoplasmático (ER), levando ao recrutamento e ativação de TBK1. TBK1 fosforila o fator de transcrição IRF3, que se transloca para o núcleo para ativar a expressão do gene IFNB. Sem desejar ser limitado pela teoria, acredita-se que C7 inibe a indução de IFNB por vários estímulos, incluindo vírus de RNA, vírus de DNA, poli (I: C), DNA imunoestimulador (ISD). C7 pode exercer seu efeito inibitório ao nível do complexo TBK1/IRF3. Uma vez secretado, o IFN tipo I se liga ao IFNAR, o que leva à ativação da via de sinalização JAK/STAT. STAT1 e STAT2 fosforilados translocam-se para o núcleo, onde, juntamente com IRF9, ativam a expressão de genes estimulados por IFN (ISGs). Sem querer ser limitado pela teoria, acredita-se que, além de sua capacidade de inibir a indução de IFNB, o C7 também pode bloquear a sinalização de IFNAR por meio de sua interação de STAT2, evitando assim o IFN-β-fosforilação de STAT2 induzida. Sem desejar ser limitado pela teoria, acredita-se que o vaccinia C7 tem papel inibidor duplo da produção e sinalização de IFN tipo I. Estudos anteriores mostraram que a deleção de C7L a partir de WT vaccinia (VACVΔC7L) resulta na atenuação do vírus e a deleção de C7L de MVA (MVAΔC7L) leva a funções imunoestimulatórias aumentadas em comparação com MVA.

[0413] Foi demonstrado que a expressão ectópica de C7 bloqueia a ativação do promotor de IFNB e ISRE (elemento de resposta estimulada por interferon) induzida por STING, TBK1 ou IRF3. Foi demonstrado que linhas de células de macrófagos murinos ou humanos que superexpressam C7 têm respostas imunológicas inatas embotadas a estímulos de DNA ou RNA, ou à infecção de vírus de DNA ou RNA. Também foi demonstrado que a superexpressão de C7 atenua a expressão do gene ISG induzida pelo

tratamento com IFN-β. A infecção por MVA com deleção de C7L (MVA∆C7L) de cDCs mostrou induzir níveis mais elevados de IFN tipo I do que MVA. Foi demonstrado que o C7 bloqueia a via de sinalização/transdutor de Janus quinase/sinal induzido por IFN-β e ativador da transcrição (JAK/STAT) por meio da prevenção da fosforilação de Stat2. C7 demonstrou interagir diretamente com Stat2, conforme demonstrado por estudos de co-imunoprecipitação.

[0414] Uma proteína de faixa de hospedeiro C7 de vírus vaccinia de comprimento total ilustrativa, dada pelo GenBank No. de Acesso AAB96405.1 (SEQ ID NO: 6) é fornecida abaixo.

1 mgiqhefdii ingdialrnl qlhkgdnygc klkiisndyk klkfrfiirp dwseidevkg

61 ltvfannyav kvnkvddtfy yviyeavihl ynkkteiliy sddenelfkh yypyislnmi

121 skkykvkeen ysspyiehpl ipyrdyesmd

[0415] O vírus mixoma tem três ortólogos C7, M62, M63, M64. Mixoma M64 compartilha características de estrutura similares com vaccinia C7, apesar de ter apenas 23% de identidade de sequência. O Mixoma M62 pode resgatar defeitos de replicação de VACV∆K1L∆C7L em células humanas. A deleção de Mixoma M63 resulta em um vírus recombinante que não é replicativo em células de coelho. Em algumas modalidades, a tecnologia da presente divulgação fornece um vírus de mixoma projetado, como MYXV∆M64R ou MYXV∆M64R-hFlt3L-mOX40L.

VI. <u>Ligante OX40 (OX40L)</u>

[0416] O ligante OX40 (OX40L) e seu parceiro de ligação, receptor do fator de necrose tumoral OX40, são membros da superfamília TNFR/TNF e são expressos em células CD4 e CD8 T ativadas, bem como em várias outras células linfóides e não linfóides. A interação OX40L-OX40 fornece sinais de sobrevivência e ativação para células T que expressam OX40. Além disso, OX40 suprime a diferenciação e a atividade de Treg, ampliando ainda mais esse processo. OX40 e OX40L também regulam a produção de citocinas a partir de células T, células apresentadoras de antígeno, células NK e células

NKT e modulam a sinalização do receptor de citocinas. O OX40L do vírus MVAΔE3L-OX40L, MVAΔC7L-OX40L, MVAΔC7L-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R, VACVΔC7L-OX40L, VACVΔC7L-hFlt3L-OX40L, VACVΔE5R, e MYXVΔM31R recombinante da presente tecnologia pode ser tanto huOX40L ou muOX40L.

[0417] Ácido nucleico ilustrativo de OX40L humano (huOX40L) (SEQ ID NO: 7) e sequências de polipetídeos (SEQ ID NO: 8) são fornecidos abaixo.

huOX40L-ORF (SEQ ID NO:7):

```
ATGGAAAGGG  TCCAACCCCT  GGAAGAGAAT  GTGGGAAATG  CAGCCAGGCC  AAGATTCGAG
AGGAACAAGC  TATTGCTGGT  GGCCTCTGTA  ATTCAGGGAC  TGGGGCTGCT  CCTGTGCTTC
ACCTACATCT  GCCTGCACTT  CTCTGCTCTT  CAGGTATCAC  ATCGGTATCC  TCGAATTCAA
AGTATCAAAG  TACAATTTAC  CGAATATAAG  AAGGAGAAAG  GTTTCATCCT  CACTTCCCAA
AAGGAGGATG  AAATCATGAA  GGTGCAGAAC  AACTCAGTCA  TCATCAACTG  TGATGGGTTT
TATCTCATCT  CCCTGAAGGG  CTACTTCTCC  CAGGAAGTCA  ACATTAGCCT  TCATTACCAG
AAGGATGAGG  AGCCCCTCTT  CCAACTGAAG  AAGGTCAGGT  CTGTCAACTC  CTTGATGGTG
GCCTCTCTGA  CTTACAAAGA  CAAAGTCTAC  TTGAATGTGA  CCACTGACAA  TACCTCCCTG
GATGACTTCC  ATGTGAATGG  CGGAGAACTG  ATTCTTATCC  ATCAAAATCC  TGGTGAATTC
TGTGTCCTTT GA
```

Polipeptídeo huOX40L-ORF (SEQ ID NO:7): 8)

ME R V Q P L E E N V G N A A R P R F E R N K L L L V A S V
I Q G L G L L L C F T Y I C L H F S A L Q V S H R Y P R I Q
S I K V Q F T E Y K K E K G F I L T S Q K E D E I **M**K V Q N
N S V I I N C D G F Y L I S L K G Y F S Q E V N I S L H Y Q
K D E E P L F Q L K K V R S V N S L **M**V A S L T Y K D K V Y
L N V T T D N T S L D D F H V N G G E L I L I H Q N P G E F
C V L **Stop**

[0418] Ácido nucleico ilustrativo de OX40L murino (muOX40L) (SEQ ID NO: 9) e sequências de polipetídeos (SEQ ID NO: 10) são fornecidos abaixo.

muOX40L-ORF (códon otimizado) (SEQ ID NO: 9):

```
ATGGAGGGCGAGGGGGTCCAGCCTCTGGACGAGAACCTCGAAAACGGGTCTCGCCCTCG
CTTTAAATGGAAGAAGACTCTTAGGCTCGTTGTAAGCGGCATCAAGGGGGCCGGTATGT
TGCTGTGCTTCATATATGTGTGTTTGCAACTTAGCTCTTCACCTGCAAAAGACCCCCCC
ATACAACGCCTTCGGGGGGCTGTGACCCGCTGTGAAGATGGTCAATTGTTTATTTCTTC
TTACAAGAACGAGTATCAGACGATGGAAGTCCAGAATAACTCCGTAGTGATTAAGTGTG
ACGGACTGTACATCATCTACTTGAAAGGATCTTTTTTCCAGGAGGTCAAAATTGACCTC
CACTTCAGGGAGGATCACAACCCTATCTCAATCCCTATGTTGAACGACGGCAGAAGAAT
CGTCTTTACTGTAGTCGCTTCACTGGCCTTCAAGGATAAGGTGTACTTGACCGTAAACG
CTCCTGATACCTTGTGCGAGCATTTGCAAATCAACGATGGAGAACTTATCGTTGTCCAA
```

CTCACACCAGGTTACTGTGCTCCTGAGGGCAGTTATCACAGTACAGTGAACCAAGTCCC
ACTGTGA

Polipeptídeo muOX40L-ORF (SEQ ID NO:7): 10):

ME G E G V Q P L D E N L E N G S R P R F K W K K T L R L V
V S G I K G A G **M**L L C F I Y V C L Q L S S S P A K D P P I
Q R L R G A V T R C E D G Q L F I S S Y K N E Y Q T **M**E V Q
N N S V V I K C D G L Y I I Y L K G S F F Q E V K I D L H F
R E D H N P I S I P **M**L N D G R R I V F T V V A S L A F K D
K V Y L T V N A P D T L C E H L Q I N D G E L I V V Q L T P
G Y C A P E G S Y H S T V N Q V P L **Stop**

VII. Ligante de tirosina quinase 3 tipo Fms humano (hFlt3L)

[0419] O ligante de tirosina quinase 3 tipo Fms humano (hFlt3L), uma proteína transmembrana do tipo I que estimula a proliferação de células da medula óssea, foi clonado em 1994 (Lyman *et al*., 1994). O uso de hFlt3L foi explorado em vários ambientes pré-clínicos e clínicos, incluindo a mobilização de células-tronco na preparação para o transplante de medula óssea, imunoterapia do câncer, como expansão de células dendríticas, bem como um adjuvante de vacina. O Flt3L humano recombinante (rhuFlt3L) foi testado em mais de 500 indivíduos humanos e é bioativo, seguro e bem tolerado. Muito progresso tem sido feito na compreensão do papel crítico do fator de crescimento Flt3L no desenvolvimento de subconjuntos DC, incluindo $CD8\alpha^+/CD103^+$ DCs e pDCs.

[0420] $CD103^+/CD8\alpha^+$ DCs são necessários para a iniciação cruzada espontânea de células $CD8^+$ T específicas do antígeno tumoral foi relatado que $CD103^+$ DCs estão esparsamente presentes nos tumores e competem por antígenos tumorais com macrófagos associados a tumores abundantes. $CD103^+$ DCs são exclusivamente capazes de estimular células $CD8^+$ T nativa, bem como ativadas, e são críticas para o sucesso da terapia adotiva com células T (Broz, *et al*. *Cancer Cell*, 26(5):638-52 (2014)). Spranger *et al*. relataram que a ativação da via de sinalização oncogênica WNT/β-catenina leva à redução de $CD103^+$DCs e células T antitumorais dentro dos tumores

(Spranger et al., 2015). A administração intratumoral de células dendríticas derivadas da medula óssea cultivadas com Flt3L (BMDCs) leva à capacidade de resposta à combinação de imunoterapia anti-CTLA-4 e anti-PD-L1 (Spranger *et al*., 2015). A administração sistêmica de Flt3L, um fator de crescimento para $CD103^+$ DCs, e injeção intratumoral de poli I: C (agonista de TLR3) expandiu e ativou as populações de $CD103^+$ DCs dentro dos tumores e superou a resistência ou melhorou a responsividade à imunoterapia em um melanoma murino e MC38 modelos de câncer de cólon.

[0421] A recente descoberta de neoantígenos tumorais em vários tumores sólidos indica que os tumores sólidos abrigam neoantígenos únicos que geralmente diferem de pessoa para pessoa (Castle *et al*., *Cancer Res* 72: 1081-1091 (2012); Schumacher *et al*., *Science* 348: 69-74 (2015)). Os vírus geneticamente modificados ou recombinantes divulgados neste documento não exercem sua atividade expressando antígenos tumorais. A administração intratumoral dos presentes vírus MVA geneticamente modificados ou recombinantes permite a apresentação cruzada eficiente de neoantígenos tumorais e geração de imunidade adaptativa antitumoral dentro dos tumores (e também se estendendo sistemicamente) e, portanto, leva à "vacinação contra o câncer *in situ" utilizando diferenciação tumoral* antígenos e neoantígenos expressos pelas células de tumor na montagem de uma resposta imunológica contra o tumor.

[0422] Apesar da presença de neoantígenos gerados por mutações somáticas dentro dos tumores, as funções das células T específicas do antígeno tumoral são frequentemente controladas por múltiplos mecanismos inibitórios (Mellman *et al*., *Nature* 480, 480-489 (2011)). Por exemplo, a regulação positiva do antígeno 4 de linfócito T citotóxico (CTLA-4) em células T ativadas pode competir com o co-estimulador de células T CD28 para interagir com CD80 (B71)/CD86 (B7.2) em células dendríticas (DCs) e, assim, inibir a ativação e proliferação de células T. CTLA-4 também é expresso em células T reguladoras (Treg) e desempenha um papel importante na mediação da função

inibitória de Tregs (Wing *et al*., *Science* 322: 271-275 (2008); Peggs, *et al*., *J. Exp. Med.* 206:1717-1725 (2009)). Além disso, a expressão de PD-L/PD-L2 em células de tumor pode levar à ativação do receptor inibitório da família CD28, PD-1, levando à exaustão de células T. A imunoterapia utilizando anticorpos contra receptores inibitórios, como CTLA-4 e polipeptídeo de morte programada 1 (PD-1), mostrou atividades pré-clínicas notáveis em estudos com animais e respostas clínicas em pacientes com cânceres metastáticos, e foram aprovadas pelo FDA para o tratamento de melanoma metastático, câncer de pulmão de células não pequenas, bem como carcinoma de células renais (Leach *et al*., *Science* 271: 1734-1746 (1996); Hodi *et al*., *NEJM* 363: 711-723 (2010); Robert *et al*., *NEJM* 364: 2517-2526 (2011); Topalian *et al*., *Cancer Cell* 27: 450-461 (2012); Sharma *et al*., *Science* 348 (6230): 56-61 (2015)).

VIII. ΔE3L e E3LΔ83N

[0423] Poxvírus são extraordinariamente hábeis em evitar e antagonizar várias vias de sinalização reações imunológicas inata, codificando proteínas que interditam os componentes extracelulares e intracelulares dessas vias (Seet *et al. Annu. Rev. Immunol*. 21:377-423 (2003)). O principal entre os antagonistas de poxvírus da sinalização reações imunológicas inata intracelular é o duelo do vírus vaccinia Z-DNA e a proteína E3 de ligação ao dsRNA, que pode inibir o PKR e o NF-κ Vias B (Cheng *et al., Proc. Natl. Acad.* Sci. USA 89:4825-4829 (1992); Deng *et al., J. Virol*. 80: 9977-9987 (2006)) que de outra forma seria ativado pela infecção do vírus vaccinia. Um vírus vaccinia mutante carente do gene E3L (ΔE3L) tem uma faixa de hospedeiros restrita, é altamente sensível ao IFN e reduziu muito a virulência em modelos animais de infecção por poxvírus letal (Beattie *et al., Virus Genes* 1289-94 (1996); Brandt *et al., Virology* 333263-270 (2004)). Estudos recentes demonstraram que a infecção de linhas celulares em cultura com o vírus ΔE3L induz respostas pró-inflamatórias que são mascaradas durante a infecção com o vírus vaccinia de tipo selvagem (Deng *et al., J. Virol*. 80:9977-9987 (2006); Langland *et al. J.*

Virol. 80:10083-10095). A infecção de uma linha de células dendríticas epidérmicas de camundongo com o vírus da vacínia de tipo selvagem atenuou as respostas pró-inflamatórias aos agonistas de TLR, lipopolissacarídeo (LPS) e poli (I: C), um efeito que foi diminuído pela deleção de E3L. Além disso, a infecção das células dendríticas com o vírus ΔE3L desencadeou ativação de NF-κB na ausência de agonistas exógenos (Deng *et al., J. Virol*. 80:9977-9987 (2006)). Enquanto a infecção do vírus vaccinia de tipo selvagem de queratinócitos murinos não induz a produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, a infecção com o vírus ΔE3L induz a produção de IFN-β, IL-6, CCL4 e CCL5 de queratinócitos murinos, que é dependente da via de detecção de dsRNA citosólica mediada pela proteína de sinalização antiviral mitocondrial (MAVS; um adaptador para os sensores de RNA citosólico RIG-I e MDA5) e o fator de transcrição IRF3 (Deng *et al., J. Virol*. 82(21):10735-10746 (2008)).

[0424] Vírus E3LΔ83N com deleção do domínio de ligação ao Z-DNA é 1000 vezes mais atenuado do que o vírus vaccinia de tipo selvagem num modelo de infecção intranasal (Brandt *et al.,* 2001). E3LΔ83N também reduziu a neurovirulência em comparação com vaccinia de tipo selvagem em um modelo de inoculação intracraniana (Brandt *et al*., 2005). Uma mutação no domínio de ligação do Z-DNA de E3 (Y48A), resultando na diminuição da ligação do Z-DNA, leva à diminuição da neurovirulência (Kim *et al*., 2003). Embora o domínio de ligação do Z-DNA ao N-terminal de E3 seja importante na patogênese viral, como ele afeta a detecção reações imunológicas inata do hospedeiro do vírus vaccinia não é bem compreendido. O vírus mixoma, mas não a infecção vaccinia de tipo selvagem de células dendríticas plasmocitoides murinas, induz a produção de IFN tipo I por meio de da via dependente de TLR9/MyD88/IRF5/IRF7 (Dai *et al*., 2011). O ortólogo M029 do vírus mixoma E3 retém o domínio de ligação de dsRNA de E3, mas não possui o domínio de ligação de Z-DNA de E3. Verificou-se que o domínio de ligação Z-DNA de E3 (mas provavelmente não a atividade de ligação Z-DNA *per se*) desempenha um

papel importante na inibição da detecção de poxvírus em pDCs murinos e humanos (Dai *et al*., 2011; Cao *et al.*., 2012).

[0425] **A** deleção de E3L sensibiliza a replicação do vírus vaccinia à inibição de IFN em células RK13 permissivas e resulta em um fenótipo de faixa de hospedeiro, em que ΔE3L não pode se replicar em células HeLa ou BSC40 (Chang *et al*., 1995). O domínio de ligação de dsRNA C-terminal de E3 é responsável pelos efeitos de faixa de hospedeiros, enquanto o vírus E3LΔ83N com deleção do domínio de ligação de Z-DNA N-terminal é competente para replicação em células HeLa e BSC40 (Brandt *et al*., 2001).

[0426] O vírus vaccinia (cepa Western Reserve; WR) com deleção de timidina quinase é altamente atenuado em células que não se dividem, mas é replicativo em células transformadas (Buller *et al*., 1988). O vírus vaccinia com deleção de TK se replica seletivamente em células de tumor *in vivo* (Puhlmann *et al*., 2000). Thorne *et al*. mostraram que, em comparação com outras cepas de vaccinia, a cepa WR tem a maior taxa de explosão em linhas de células de tumor em relação às células normais (Thorne *et al*., 2007).

IX. <u>O vírus vaccinia E5 é um inibidor dominante do sensor de DNA citosólico cGAS</u>

[0427] O sensor de DNA citosólico cGAS desempenha um papel importante na detecção de ácido nucleico viral, o que leva à produção de IFN tipo I. Foi demonstrado que a infecção de células dendríticas convencionais com vírus vaccinia modificado Ankara (MVA), uma cepa vaccinia altamente atenuada, induz a produção de IFN por meio de um mecanismo dependente de cGAS/STING. No entanto, a infecção por MVA desencadeia a degradação de cGAS. O vírus vaccinia (VACV) é um vírus de DNA citoplasmático, que codifica mais de 200 genes. Conforme descrito na seção de exemplos experimentais, setenta genes iniciais virais de vaccinia foram rastreados quanto à inibição da via cGAS/STING em células T HEK293 usando um sistema de luciferase duplo. Verificou-se que o vaccinia E5R é um inibidor dominante do cGAS e é a proteína chave que medeia a degradação do cGAS. MVAΔE5R induz níveis

muito mais elevados de IFN tipo I do que MVA em vários tipos de células, incluindo células dendríticas derivadas da medula óssea (BMDC), macrófagos derivados da medula óssea (BMDM) e fibroblastos primários da pele (**FIGS. 57C e 57D; 76A e 76B**). A produção de IFN tipo I mediada por MVA∆E5R é dependente de cGAS (**FIGS. 58A-58C**). Além disso, o MVA∆E5R ganha capacidade de replicação em cGAS$^{-/-}$fibroblastos de pele (**FIGS. 77C e 77D**). Como um vetor de vacina, a escarificação da pele ou vacinação intradérmica com MVA∆E5R-OVA leva a respostas de células CD8^{+} T *específicas de OVA muito mais altas do que MVA-OVA in vivo* (**FIG. 75B e 75C**). A injeção intratumoral de MVA∆E5R leva a respostas imunológicas antitumorais mais fortes e melhor sobrevida em comparação com MVA (**FIGS. 91A-91C**). Finalmente, em um modelo de infecção intranasal, VACV∆E5R é pelo menos 1000 vezes atenuado em comparação com WT VACV (**FIG. 55B**). Tomados em conjunto, esses resultados fornecem fortes evidências de que o E5 é um fator de virulência viral chave direcionado ao sensor de DNA citosólico cGAS e, portanto, inibe a produção de IFN tipo I. Os inventores da presente tecnologia são os primeiros a descrever o papel do E5R na evasão imunológica.

[0428] Uma proteína de faixa de hospedeiro E5R de vírus vaccinia de comprimento total ilustrativa, dada pelo GenBank No. de Acesso AAB59825.1 (SEQ ID NO: 20) é fornecida abaixo.

MLILTKVNIYMLIIVLWLYGYNFIISESQCPMINDDSFTLKRKYQIDSAESTIKMDKKR
TKFQNRAKMVKEINQTIRAAQTHYETLKLGYIKFKRMIRTTTLEDIAPSIPNNQKTYKL
FSDISAIGKASRNPSKMVYALLLYMFPNLFGDDHRFIRYRMHPMSKIKHKIFSPFKLNL
IRILVEERFYNNECRSNKWRIIGTQVDKMLIAESDKYTIDARYNLKPMYRIKGKSEEDT
LFIKQMVEQCVTSQELVEKVLKILFRDLFKSGEYKAYRYDDDVENGFIGLDTLKLNIVH
DIVEPCMPVRRPVAKILCKEMVNKYFENPLHIIGKNLQECIDFVSE

[0429] O ortólogo do mixoma do vírus vaccinia E5R é M31R. Uma proteína M31R do vírus mixoma de comprimento total ilustrativa, fornecida pelo GenBank No. de Acesso AAF14919.1 (SEQ ID NO: 21), é fornecida abaixo.

MEGDYLIRPG EKQASYACRL LGILTKHSTY PPEEYFPLVR SIMSMYNTLI

KDDVIWFREI APYLYEYTMY KQNARNPSFY ISTNVVNLTT CRVSKSSAKS
AKYRAKSKQM KMRRVADGVP FEEKLKRDEA IRQKNKKDYF EIKKLYMRLK
KFVRGKKSAD DNMLCNKVRM IYGHINEIER VAVNEYSMAK SLLHYVFPNL
FNDDKHHLFY RCTKMDGLGV LPSKKLNLIR VILENKFKIS KRKWTMLKKY
IDTVCATGKL RVRLGTYPYY KLKSLNALVA SYQGDSVDEL KTLVLSSFSL
VDLTEKLIKT TFPEVVKSGE GHNYRCYPDG THQGLDPERV IDMCYKARVA
TDSESVVDVH NAIVETVNRF LIRSEKKVGD NIDECIVMAK TIN

X. <u>Cepas de Poxvírus Modificadas da Presente Tecnologia</u>

<u>MVAΔC7L</u>

[0430] A divulgação da presente tecnologia se refere a um vírus C7L vaccinia Ankara modificado mutante (MVA) (*isto é*, MVAΔC7L; vírus MVA compreendendo uma deleção C7L; MVA geneticamente modificado para compreender um gene C7L mutante), ou composições imunogênicas compreendendo o vírus, em em que o vírus é projetado para expressar um ou mais genes específicos de interesse (SG), como OX40L (MVAΔC7L-OX40L), e seu uso como imunoterapêutico contra o câncer. Em algumas modalidades, o gene C7 do vírus MVA, por meio de técnicas de recombinação homóloga, é projetado para conter uma interrupção que compreende uma sequência de ácido nucleico heteróloga compreendendo um ou mais cassetes de expressão, que resultam em um nocaute C7 de modo que o gene C7 não seja expresso, expressa em níveis tão baixos que não têm efeito, ou a proteína expressa não é funcional (*por exemplo*, é uma mutação nula). Em algumas modalidades, o mutante ΔC7L inclui uma sequência de ácido nucleico heterólogo no lugar de toda ou a maioria da sequência do gene C7L. Por exemplo, em algumas modalidades a sequência de ácido nucleico correspondente à posição de C7 no genoma de MVA (*por exemplo*, posição 18.407 to 18.859 de SEQ ID NO: 1) é substituído por uma sequência de ácido nucleico heterólogo compreendendo uma estrutura de leitura aberta que codifica um gene específico de interesse (SG), como OX40L humano, resultando em MVAΔC7L-OX40L. Em algumas modalidades, o cassete de expressão compreende uma única estrutura de leitura aberta que codifica hFlt3L, resultando em MVAΔC7L-hFlt3L. (*Consultar, por exemplo*, **FIG. 5A**).

[0431] Adicionalmente ou alternativamente, em algumas modalidades, MVAΔC7L é manipulado para expressar OX40L e hFlt3L. Em algumas modalidades, o gene da timidina quinase (TK) do MVA (*por exemplo*, posição 75.560 a 76.093 da SEQ ID NO: 1), por meio de recombinação homóloga, é projetada para conter uma interrupção compreendendo uma sequência de ácido nucleico heterólogo compreendendo uma ou mais cassetes de expressão, o que resulta em um nocaute do gene TK de modo que o gene TK não seja expresso, expresso em níveis tão baixos a ponto de ter nenhum efeito, ou a proteína expressa não é funcional (*por exemplo*, é uma mutação nula). O vírus MVAΔC7L-TK(-) resultante é ainda modificado para compreender uma ou mais cassetes de expressão que são flanqueados por uma sequência parcial do gene TK (TK-L e TK-R) em ambos os lados (*consulte, por exemplo*, **FIG. 5B**). Em algumas modalidades, o cassete de expressão compreende uma única estrutura de leitura aberta que codifica um gene específico de interesse (SG), como OX40L ou hFlt3L usando o promotor precoce e tardio sintético viral de vaccinia (PsE/L), resultando em MVAΔC7L-TK(-)-OX40L. Em algumas modalidades, o vírus recombinante é ainda modificado no locus C7, por meio de técnicas de recombinação homóloga, para conter uma interrupção que compreende uma sequência de ácido nucleico heterólogo compreendendo um ou mais cassetes de expressão, que resultam em um nocaute de C7 de modo que o gene C7 não seja expresso, expresso em níveis tão baixos que não têm efeito, ou a proteína expressa não é funcional (*por exemplo*, é uma mutação nula). Em algumas modalidades, o cassete de expressão compreende uma única estrutura de leitura aberta que codifica um gene específico de interesse (SG), como hFlt3L, resultando em MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-OX40L. Em algumas modalidades, o cassete de expressão que codifica OX40L é inserido no locus C7, enquanto o cassete de expressão que codifica hFlt3L é inserido no locus TK.

[0432] Adicionalmente ou alternativamente, em algumas modalidades, a sequência de ácido nucleico heterólogo compreende um

cassete de expressão compreendendo duas ou mais estruturas de leitura aberta que codificam dois ou mais genes específicos de interesse, separados por uma sequência de nucleotídeos que codifica, na direção 5’ para 3', um sítio de clivagem de protease (*por exemplo*, um sítio de clivagem de furina) e uma sequência de peptídeo 2A (Pep2A). Por exemplo, em algumas modalidades, MVAΔC7L abrange um vírus MVA recombinante em que toda ou a maioria da sequência do gene E5R é substituída por um primeiro gene específico de interesse (*por exemplo*, hFtl3L) e um segundo gene específico de interesse (*por exemplo*, OX40L), em que as sequências de codificação do primeiro e do segundo genes específicos de interesse são separadas por um cassete incluindo um sítio de clivagem de furina, seguido por uma sequência de peptídeo 2A (Pep2A), formando assim um vírus recombinante, como MVAΔC7LΔE5R-hFlt3L-OX40L (*Consulte, por exemplo*, **FIG. 93A**). Como outro exemplo, em algumas modalidades, a presente tecnologia fornece um vírus MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-OX40LΔE5R recombinante que é formado fazendo três modificações separadas. A primeira modificação envolve a substituição do gene C7L, por meio de recombinação homóloga nos loci C8L e C6R, por uma sequência de ácido nucleico heteróloga que compreende um cassete de expressão que compreende uma estrutura de leitura aberta que codifica hFlt3L, formando assim MVAΔC7L-hFlt3L. Para a segunda modificação, por meio de recombinação homóloga no locus TK, o gene TK é substituído por uma sequência de ácido nucleico heteróloga compreendendo um cassete de expressão que compreende uma estrutura de leitura aberta que codifica OX40L, formando assim MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-OX40L. Para a terceira modificação, por meio de recombinação homóloga nos loci E4L e E6R, o gene E5R é substituído por uma sequência de ácido nucleico heteróloga que compreende um cassete de expressão que compreende uma estrutura de leitura aberta que codifica um marcador selecionável, como mCherry, formando assim MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-OX40LΔE5R (*consulte, por exemplo*, **FIG. 92A**).

[0433] Em algumas modalidades, os vírus MVAΔC7L-OX40L recombinantes descritos acima são modificados para expressar pelo menos um gene heterólogo adicional, tal como qualquer um ou mais de hFlt3L, hIL-2, hIL-12, hIL-15, hIL-15/IL -15Rα, hIL-18, hIL-21, anti-huCTLA-4, anti-huPD-1, anti-huPD-L1, GITRL, 4-1BBL ou CD40L e/ou inclui qualquer uma ou mais das seguintes deleções : E3L (ΔE3L); E3LΔ83N; B2R (ΔB2R), B19R (B18R; ΔWR200); E5R; K7R; C12L (IL18BP); B8R; B14R; N1L; C11R; K1L; M1L; N2L, e/ou WR199.

[0434] Embora em certas modalidades descritas acima, o transgene possa ser inserido no locus TK, dividindo o gene TK e obliterando-o, outros loci de integração adequados podem ser selecionados. Por exemplo, MVA codifica vários genes imunomoduladores, incluindo, mas não se limitando a C11, K3, F1, F2, F4, F6, F8, F9, F11, F14.5, J2, A46, E3L, B18R (WR200), E5R, K7R, C12L, B8R, B14R, N1L, C11R, K1L, C16, M1L, N2L e WR199. Consequentemente, em algumas modalidades, esses genes podem ser deletados para aumentar as propriedades de ativação reações imunológicas do vírus e permitir a inserção de transgenes. Por exemplo, em algumas modalidades, a presente tecnologia fornece um vírus MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-OX40L que expressa transgenes IL-2, IL-12, IL-18, IL-15 e/ou IL-21 de dentro do Locus do gene E5R. Em outras modalidades, nenhum outro gene heterólogo é adicionado além daqueles fornecidos no nome do vírus aqui (por exemplo, OX40L ou OX40L e hFlt3L), e/ou nenhum outro gene viral diferente de C7L ou C7L e TK são interrompidos ou deletados.

[0435] Em algumas modalidades, a sequência de nucleotídeos heterólogos compreende ainda um cassete de expressão adicional que compreende uma estrutura de leitura aberta que codifica um marcador selecionável operacionalmente ligado a um promotor que é capaz de dirigir a expressão do marcador selecionável (**FIGS. 5A-5B**). Em algumas modalidades, o marcador selecionável é um gene da xantina-guanina fosforibosil transferase (gpt). Em algumas modalidades, o marcador selecionável é um gene de

proteína fluorescente verde (GFP). Em algumas modalidades, o marcador selecionável é um gene mCherry que codifica uma proteína fluorescente vermelha.

[0436] Exemplos não limitativos de estruturas de leitura aberta de construto de expressão OX40L de acordo com a presente tecnologia são mostrados em SEQ ID NOs: 3 e 5 (**Tabela 1**). Um exemplo não limitativo de um construto de expressão de hFlt3L de acordo com a presente tecnologia é mostrado na SEQ ID NO: 4 (**Tabela 1**).

TABELA 1
Sequências de nucleotídeos exemplares para as estruturas de leitura aberta dos construtos de MVA recombinantes da presente tecnologia.
Sequência de ácido nucleico do vetor pCB-mOX40L-gpt (SEQ ID NO: 3) CGCGCGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGAGCTCTTTTTATCTGCG CGGTTAACCGCCTTTTTATCCATCAGGTGATCTGTTTTTATTGTGGAGTCTA GATTATCACAGTGGGACTTGGTTCACTGTACTGTGATAACTGCCCTCAGGA GCACAGTAACCTGGTGTGAGTTGGACAACGATAAGTTCTCCATCGTTGATT TGCAAATGCTCGCACAAGGTATCAGGAGCGTTTACGGTCAAGTACACCTTA TCCTTGAAGGCCAGTGAAGCGACTACAGTAAAGACGATTCTTCTGCCGTC GTTCAACATAGGGATTGAGATAGGGTTGTGATCCTCCCTGAAGTGGAGGT CAATTTTGACCTCCTGGAAAAAAGATCCTTTCAAGTAGATGATGTACAGTC CGTCACACTTAATCACTACGGAGTTATTCTGGACTTCCATCGTCTGATACT CGTTCTTGTAAGAAGAAATAAACAATTGACCATCTTCACAGCGGGTCACAG CCCCCCGAAGGCGTTGTATGGGGGGGTCTTTTGCAGGTGAAGAGCTAAGT TGCAAACACACATATATGAAGCACAGCAACATACCGGCCCCCTTGATGCC GCTTACAACGAGCCTAAGAGTCTTCTTCCATTTAAAGCGAGGGCGAGACC CGTTTTCGAGGTTCTCGTCCAGAGGCTGGACCCCCTCGCCCTCCATGGTG GTGGCCTAGAATTCGATATCAAGCTCAGGCCTAGATCTGTCGACTTCGAG CTTATTTATATTCCAAAAAAAAAAAATAAAATTTCAATTTTTAAGCTTTCACTA ATTCCAAACCCACCCGCTTTTTATAGTAAGTTTTTCACCCATAAATAATAAAT

ACAATAATTAATTTCTCGTAAAAGTAGAAAATATATTCTAATTTATTGCACGG
TAAGGAAGTAGATCATAACTCGAGGAATTGGGGATCTCTATAATCTCGCGC
AACCTATTTTCCCCTCGAACACTTTTTAAGCCGTAGATAAACAGGCTGGGA
CACTTCACATGAGCGAAAAATACATCGTCACCTGGGACATGTTGCAGATCC
ATGCACGTAAACTCGCAAGCCGACTGATGCCTTCTGAACAATGGAAAGGC
ATTATTGCCGTAAGCCGTGGCGGTCTGGTACCGGGTGCGTTACTGGCGCG
TGAACTGGGTATTCGTCATGTCGATACCGTTTGTATTTCCAGCTACGATCA
CGACAACCAGCGCGAGCTTAAAGTGCTGAAACGCGCAGAAGGCGATGGC
GAAGGCTTCATCGTTATTGATGACCTGGTGGATACCGGTGGTACTGCGGT
TGCGATTCGTGAAATGTATCCAAAAGCGCACTTTGTCACCATCTTCGCAAA
ACCGGCTGGTCGTCCGCTGGTTGATGACTATGTTGTTGATATCCCGCAAG
ATACCTGGATTGAACAGCCGTGGGATATGGGCGTCGTATTCGTCCCGCCA
ATCTCCGGTCGCTAATCTTTTCAACGCCTGGCACTGCCGGGCGTTGTTCTT
TTTAACTTCAGGCGGGTTACAATAGTTTCCAGTAAGTATTCTGGAGGCTGC
ATCCATGACACAGGCAAACCTGCGGATCCCAGCTTTTGTTCCCTTTAGTGA
GGGTTAATTGCGCGCAGTTATAGTAGCCGCACTCGATGGGACATTTCAAC
GTAAACCGTTTAATAATATTTTGAATCTTATTCCATTATCTGAAATGGTGGTA
AAACTAACTGCTGTGTGTATGAAATGCTTTAAGGAGGCTTCCTTTTCTAAAC
GATTGGGTGAGGAAACCGAGATAGAAATAATAGGAGGTAATGATATGTATC
AATCGGTGTGTAGAAAGTGTTACATCGACTCATAATATTATATTTTTTATCTA
AAAAACTAAAAATAAACATTGATTAAATTTTAATATAATACTTAAAAATGGAT
GTTGTGTCGTTAGATAAACCGTTTATGTATTTTGAGGAAATTGATAATGAGT
TAGATTACGAACCAGAAAGTGCAAATGAGGTCGCAAAAAAACTGCCGTATC
AAGGACAGTTAAAACTATTACTAGGAGAATTATTTTTTCTTAGTAAGTTACA
GCGACACGGTATATTAGATGGTGCCACCGTAGTGTATATAGGATCTGCTCC
CGGTACACATATACGTTATTTGAGAGATCATTTCTATAATTTAGGAGTGATC
ATCAAATGGATGCTAATTGACGGCCGCCATCATGATCCTATTTTAAATGGA
TTGCGTGATGTGACTCTAGTGACTCGGTTCGTTGATGAGGAATATCTACGA
TCCATCAAAAAACAACTGCATCCTTCTAAGATTATTTTAATTTCTGATGTGA

GATCCAAACGAGGAGGAAATGAACCTAGTACGGCGGATTTACTAAGTAATT
ACGCTCTACAAAATGTCATGATTAGTATTTTAAACCCCGTGGCGTCTAGTCT
TAAATGGAGATGCCCGTTTCCAGATCAATGGATCAAGGACTTTTATATCCC
ACACGGTAATAAAATGTTACAACCTTTTGCTCCTTCATATTCAGCTGAAATG
AGATTATTAAGTATTTATACCGGTGAGAACATGAGACTGACTCGGGCCGCG
TTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCCTGACGAGCATCACAAAAAT
CGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCA
GGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGC
CGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTT
TCTCAATGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTCGCTCC
AAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTCAGCCCGACCGCTGCGCCT
TATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGC
CACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGC
GGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAG
GACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAG
AGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTT
TTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAAGGATCTCAAGAAG
ATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACTCAC
GTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCT
TTTAAATTAAAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTT
GGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCT
GTCTATTTCGTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTA
CGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGA
GACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGG
AAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGT
CTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTT
TGCGCAACGTTGTTGCCATTGCTGCAGGCATCGTGGTGTCACGCTCGTCG
TTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACA
TGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCCTCCGATC

GTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGCAGTGTTATCACTCATGGTTATGGCAGCA
CTGCATAATTCTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTG
GTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTT
GCTCTTGCCCGGCGTCAACACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACT
TTAAAAGTGCTCATCATTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACTCTCAAGG
ATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAAC
TGATCTTCAGCATCTTTTACTTTCACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACA
GGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTG
AATACTCATACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATT
GTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGG
GGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTCTAAGAAACCA
TTATTATCATGACATTAACCTATAAAAATAGGCGTATCACGAGGCCCTTTCG
TCTTCGAATAAATACCTGTGACGGAAGATCACTTCGCAGAATAAATAAATC
CTGGTGTCCCTGTTGATACCGGGAAGCCCTGGGCCAACTTTTGGCGAAAA
TGAGACGTTGATCGGCACGTAAGAGGTTCCAACTTTCACCATAATGAAATA
AGATCACTACCGGGCGTATTTTTTGAGTTATCGAGATTTTCAGGAGCTAAG
GAAGCTAAAATGGAGAAAAAAATCACTGGATATACCACCGTTGATATATCC
CAATGGCATCGTAAAGAACATTTTGAGGCATTTCAGTCAGTTGCTCAATGT
ACCTATAACCAGACCGTTCAGAGCTTTTGGGATCAATAAATGGATCACAAC
CAGTATCTCTTAACGATGTTCTTCGCAGATGATGATTCATTTTTTAAGTATTT
GGCTAGTCAAGATGATGAATCTTCATTATCTGATATATTGCAAATCACTCAA
TATGTAGCTAGACTTTCTGTTATTATTATTGATCCAATCAAAAAATAAATTAG
AAGCCGTGGGTCATTGTTATGAATCTCTTTCAGAGGAATACAGACAATTGA
CAAAATTCACAGACTTTCAAGATTTTAAAAAACTGTTTAACAAGGTCCCTAT
TGACAGATGGAAGGGTCAAACTTAATAAAGGATATTTGTTCGACTTTGTGA
TTAGTTTGATGCGATTCAAAAAAGAATCCTCTCTAGCTACCACCGCAATAG
ATCCTGTTAGATACATAGATCCTCGTCGCAATATCGCATTTTCTAACGTGAT
GGATATATTAAAGTCGAATAAAGTGAACAATAATTAATTCTTTATTGTCATCA
TGAACGGCGGACATATTCAGTTGATAATCGGCCCCATGTTTTCAGGTAAAA

GTACAGAATTAATTAGACGAGTTAGACGTTATCAAATAGCTCAATATAAATG CGTGACTATAAAATATTCTAACGATAATAGATACGGAACGGGACTATGGAC GCATGATAAGAATAATTTTGAAGCATTGGAAGCAACTAAACTATGTGATCTC TTGGAATCAATTACAGATTTCTCCGTGATAGG

Sequência de ácido nucleico do vetor pUC57-delC7-hOX40L-mCherry (SEQ ID NO: 5)

1 TCGCGCGTTT CGGTGATGAC GGTGAAAACC TCTGACACAT GCAGCTCCCG GAGACGGTCA

61 CAGCTTGTCT GTAAGCGGAT GCCGGGAGCA GACAAGCCCG TCAGGGCGCG TCAGCGGGTG

121 TTGGCGGGTG TCGGGGCTGG CTTAACTATG CGGCATCAGA GCAGATTGTA CTGAGAGTGC

181 ACCATATGCG GTGTGAAATA CCGCACAGAT GCGTAAGGAG AAAATACCGC ATCAGGCGCC

241 ATTCGCCATT CAGGCTGCGC AACTGTTGGG AAGGGCGATC GGTGCGGGCC TCTTCGCTAT

301 TACGCCAGCT GGCGAAAGGG GGATGTGCTG CAAGGCGATT AAGTTGGGTA ACGCCAGGGT

361 TTTCCCAGTC ACGACGTTGT AAAACGACGG CCAGTGAATT CGAGCTCGGT ACCTCGCGAA

421 TGCATCTAGA TTCGCAGATG ATGATTCATT TTTTAAGTAT TTGGCTAGTC AAGATGATGA

481 ATCTTCATTA TCTGATATAT TGCAAATCAC TCAATATCTA GACTTTCTGT TATTATTATT

541 GATCCAATCA AAAAATAAAT TAGAAGCCGT GGGTCATTGT TATGAATCTC TTTCAGAGGA

601 ATACAGACAA TTGACAAAAT TCACAGACTT TCAAGATTTT AAAAAACTGT TTAACAAGGT

661 CCCTATTGTT ACAGATGGAA GGGTCAAACT TAATAAAGGA TATTTGTTCG ACTTTGTGAT

721 TAGTTTGATG CGATTCAAAA AAGAATCCTC TCTAGCTACC ACCGCAATAG ATCCTATTAG

781 ATACATAGAT CCTCGTCGCG ATATCGCATT TTCTAACGTG ATGGATATAT TAAAGTCGAA

841 TAAAGTGAAC AATAATTAAT TCTTTATTGT CATCAGGCCT AGAAAAAGCT AGTTCACTAA

901 TTCCAAACCC ACCCGCTTTT TATAGTAAGT TTTTCACCCA TAAATAATAA ATACAATAAT

961 TAATTTCTCG TAAAAGTAGA AAATATATTC TAATTTATTG CACGGTAAGG AAGTAGATCA

1021 TAACTCGACA TGGTGAGCAA GGGCGAGGAG GATAACATGG CCATCATCAA GGAGTTCATG

1081 CGCTTCAAGG TGCACATGGA GGGCTCCGTG AACGGCCACG AGTTCGAGAT CGAGGGCGAG

1141 GGCGAGGGCC GCCCCTACGA GGGCACCCAG ACCGCCAAGC TGAAGGTGAC CAAGGGTGGC

1201 CCCCTGCCCT TCGCCTGGGA CATCCTGTCC CCTCAGTTCA TGTACGGCTC CAAGGCCTAC

1261 GTGAAGCACC CCGCCGACAT CCCCGACTAC TTGAAGCTGT CCTTCCCCGA GGGCTTCAAG

1321 TGGGAGCGCG TGATGAACTT CGAGGACGGC GGCGTGGTGA CCGTGACCCA GGACTCCTCC

1381 CTGCAGGACG GCGAGTTCAT CTACAAGGTG AAGCTGCGCG GCACCAACTT CCCCTCCGAC

1441 GGCCCCGTAA TGCAGAAGAA GACCATGGGC TGGGAGGCCT CCTCCGAGCG GATGTACCCC

1501 GAGGACGGCG CCCTGAAGGG CGAGATCAAG CAGAGGCTGA

AGCTGAAGGA CGGCGGCCAC

1561 TACGACGCTG AGGTCAAGAC CACCTACAAG GCCAAGAAGC CCGTGCAGCT GCCCGGCGCC

1621 TACAACGTCA ACATCAAGTT GGACATCACC TCCCACAACG AGGACTACAC CATCGTGGAA

1681 CAGTACGAAC GCGCCGAGGG CCGCCACTCC ACCGGCGGCA TGGACGAGCT GATCACGAAT

1741 TCTAGCTCAA AGGACACAGA ATTCACCAGG ATTTTGATGG ATAAGAATCA GTTCTCCGCC

1801 ATTCACATGG AAGTCATCCA GGGAGGTATT GTCAGTGGTC ACATTCAAGT AGACTTTGTC

1861 TTTGTAAGTC AGAGAGGCCA CCATCAAGGA GTTGACAGAC CTGACCTTCT TCAGTTGGAA

1921 GAGGGGCTCC TCATCCTTCT GGTAATGAAG GCTAATGTTG ACTTCCTGGG AGAAGTAGCC

1981 CTTCAGGGAG ATGAGATAAA ACCCATCACA GTTGATGATG ACTGAGTTGT TCTGCACCTT

2041 CATGATTTCA TCCTCCTTTT GGGAAGTGAG GATGAAACCT TTCTCCTTCT TATATTCGGT

2101 AAATTGTACT TTGATACTTT GAATTCGAGG ATACCGATGT GATACCTGAA GAGCAGAGAA

2161 GTGCAGGCAG ATGTAGGTGA AGCACAGGAG CAGCCCCAGT CCCTGAATTA CAGAGGCCAC

2221 CAGCAATAGC TTGTTCCTCT CGAATCTTGG CCTGGCTGCA TTTCCCACAT TCTCTTCCAG

2281 GGGTTGGACC CTTTCCATGA ATTCGTCGAC TTCGAGCTTA TTTATATTCC AAAAAAAAAA

2341 AATAAAATTT CAATTTTTAA GCTTTATTAT ATTTTTTATC TAAAAAACTA AAAATAAACA

2401 TTGATTAAAT TTTAATATAA TACTTAAAAA TGGATGTTGT GTCGTTAGAT AAACCGTTTA

2461 TGTATTTTGA GGAAATTGAT AATGAGTTAG ATTACGAACC AGAAAGTGCA AATGAGGTCG

2521 CAAAAAAACT GCCGTATCAA GGACAGTTAA AACTATTACT AGGAGAATTA TTTTTTCTTA

2581 GTAAGTTACA GCGACACGGT ATATTAGATG GTGCCACCGT AGTGTATATA GGATCTGCTC

2641 CCGGTACACA TATACGTTAT TTGAGAGATC ATTTCTATAA TTTAGGAGTG ATCATCAAAT

2701 GGATGCTAAT TGACGGCCGC CATCATGATC CTATTTTAAA TGGATTGCGT GATGTGACTC

2761 TAGTGACTCG GTTCGTTGAT GAGGAATATC TACGATCCAT CAAAAAACAT CGGATCCCGG

2821 GCCCGTCGAC TGCAGAGGCC TGCATGCAAG CTTGGCGTAA TCATGGTCAT AGCTGTTTCC

2881 TGTGTGAAAT TGTTATCCGC TCACAATTCC ACACAACATA CGAGCCGGAA GCATAAAGTG

2941 TAAAGCCTGG GGTGCCTAAT GAGTGAGCTA ACTCACATTA ATTGCGTTGC GCTCACTGCC

3001 CGCTTTCCAG TCGGGAAACC TGTCGTGCCA GCTGCATTAA TGAATCGGCC AACGCGCGGG

3061 GAGAGGCGGT TTGCGTATTG GGCGCTCTTC CGCTTCCTCG CTCACTGACT CGCTGCGCTC

3121 GGTCGTTCGG CTGCGGCGAG CGGTATCAGC TCACTCAAAG GCGGTAATAC GGTTATCCAC

3181 AGAATCAGGG GATAACGCAG GAAAGAACAT GTGAGCAAAA GGCCAGCAAA AGGCCAGGAA

3241 CCGTAAAAAG GCCGCGTTGC TGGCGTTTTT CCATAGGCTC

CGCCCCCCTG ACGAGCATCA

3301 CAAAAATCGA CGCTCAAGTC AGAGGTGGCG AAACCCGACA GGACTATAAA GATACCAGGC

3361 GTTTCCCCCT GGAAGCTCCC TCGTGCGCTC TCCTGTTCCG ACCCTGCCGC TTACCGGATA

3421 CCTGTCCGCC TTTCTCCCTT CGGGAAGCGT GGCGCTTTCT CATAGCTCAC GCTGTAGGTA

3481 TCTCAGTTCG GTGTAGGTCG TTCGCTCCAA GCTGGGCTGT GTGCACGAAC CCCCCGTTCA

3541 GCCCGACCGC TGCGCCTTAT CCGGTAACTA TCGTCTTGAG TCCAACCCGG TAAGACACGA

3601 CTTATCGCCA CTGGCAGCAG CCACTGGTAA CAGGATTAGC AGAGCGAGGT ATGTAGGCGG

3661 TGCTACAGAG TTCTTGAAGT GGTGGCCTAA CTACGGCTAC ACTAGAAGAA CAGTATTTGG

3721 TATCTGCGCT CTGCTGAAGC CAGTTACCTT CGGAAAAAGA GTTGGTAGCT CTTGATCCGG

3781 CAAACAAACC ACCGCTGGTA GCGGTGGTTT TTTTGTTTGC AAGCAGCAGA TTACGCGCAG

3841 AAAAAAAGGA TCTCAAGAAG ATCCTTTGAT CTTTTCTACG GGGTCTGACG CTCAGTGGAA

3901 CGAAAACTCA CGTTAAGGGA TTTTGGTCAT GAGATTATCA AAAAGGATCT TCACCTAGAT

3961 CCTTTTAAAT TAAAAATGAA GTTTTAAATC AATCTAAAGT ATATATGAGT AAACTTGGTC

4021 TGACAGTTAC CAATGCTTAA TCAGTGAGGC ACCTATCTCA GCGATCTGTC TATTTCGTTC

4081 ATCCATAGTT GCCTGACTCC CCGTCGTGTA GATAACTACG ATACGGGAGG GCTTACCATC

4141 TGGCCCCAGT GCTGCAATGA TACCGCGAGA CCCACGCTCA CCGGCTCCAG ATTTATCAGC

4201 AATAAACCAG CCAGCCGGAA GGGCCGAGCG CAGAAGTGGT CCTGCAACTT TATCCGCCTC

4261 CATCCAGTCT ATTAATTGTT GCCGGGAAGC TAGAGTAAGT AGTTCGCCAG TTAATAGTTT

4321 GCGCAACGTT GTTGCCATTG CTACAGGCAT CGTGGTGTCA CGCTCGTCGT TTGGTATGGC

4381 TTCATTCAGC TCCGGTTCCC AACGATCAAG GCGAGTTACA TGATCCCCCA TGTTGTGCAA

4441 AAAAGCGGTT AGCTCCTTCG GTCCTCCGAT CGTTGTCAGA AGTAAGTTGG CCGCAGTGTT

4501 ATCACTCATG GTTATGGCAG CACTGCATAA TTCTCTTACT GTCATGCCAT CCGTAAGATG

4561 CTTTTCTGTG ACTGGTGAGT ACTCAACCAA GTCATTCTGA GAATAGTGTA TGCGGCGACC

4621 GAGTTGCTCT TGCCCGGCGT CAATACGGGA TAATACCGCG CCACATAGCA GAACTTTAAA

4681 AGTGCTCATC ATTGGAAAAC GTTCTTCGGG GCGAAAACTC TCAAGGATCT TACCGCTGTT

4741 GAGATCCAGT TCGATGTAAC CCACTCGTGC ACCCAACTGA TCTTCAGCAT CTTTTACTTT

4801 CACCAGCGTT TCTGGGTGAG CAAAAACAGG AAGGCAAAAT GCCGCAAAAA AGGGAATAAG

4861 GGCGACACGG AAATGTTGAA TACTCATACT CTTCCTTTTT CAATATTATT GAAGCATTTA

4921 TCAGGGTTAT TGTCTCATGA GCGGATACAT ATTTGAATGT ATTTAGAAAA ATAAACAAAT

4981 AGGGGTTCCG CGCACATTTC CCCGAAAAGT GCCACCTGAC

GTCTAAGAAA CCATTATTAT 5041 CATGACATTA ACCTATAAAA ATAGGCGTAT CACGAGGCCC TTTCGTC
Sequência de ácido nucleico de pUC57-hFlt3L-GFP (também referida como pUC57-P501-GFP) (SEQ ID NO: 4) 1 TCGCGCGTTT CGGTGATGAC GGTGAAAACC TCTGACACAT GCAGCTCCCG 51 GAGACGGTCA CAGCTTGTCT GTAAGCGGAT GCCGGGAGCA GACAAGCCCG 101 TCAGGGCGCG TCAGCGGGTG TTGGCGGGTG TCGGGGCTGG CTTAACTATG 151 CGGCATCAGA GCAGATTGTA CTGAGAGTGC ACCATATGCG GTGTGAAATA 201 CCGCACAGAT GCGTAAGGAG AAAATACCGC ATCAGGCGCC ATTCGCCATT 251 CAGGCTGCGC AACTGTTGGG AAGGGCGATC GGTGCGGGCC TCTTCGCTAT 301 TACGCCAGCT GGCGAAAGGG GGATGTGCTG CAAGGCGATT AAGTTGGGTA 351 ACGCCAGGGT TTTCCCAGTC ACGACGTTGT AAAACGACGG CCAGTGAATT 401 CATATTACGA TGGTAACATA TACGATTTAG CTAAAGATAT AAATGCGATG 451 TCATTCGACA GTTTTATAAG ATCTCTACAA AATATCTCTT CAAAGAAAGA 501 TAAACTCACT GTTTATGGAA CCATGGGACT GCTGTCTATT GTCGTAGATA 551 TTAACAAAGG TTGTGATATA TCCAATATCA AGTTCGCTGC CGGAATAATC

601 ATTTTAATGG AGTATATTTT TGATGACACG GATATGTCTC ATCTTAAAGT

651 AGCACTCTAT CGTAGAATAC AGAGACGTGA TGATGTAGAT AGATATTTTT

701 TTTTCCTAAA CTGATTTCTC TGTTTAAATT CGTAGCGATA TATAAAACAA

751 CATGTAATTA ATTAATAAAC TTTAAGACAT GTGTGTTATA CTAAGATGGT

801 TGGCTTATTC CATAGTAGCT TGTGGAATTT ATAAACTTAT GATAGTAAAA

851 CTAGTACCCA ATATGTAAAG ATGAAAAAGT AAATTACTAT TAACGCCGTC

901 GGTATTCGTT CATCCATTCA GTAAGCTTAA AAATTGAAAT TTTATTTTTT

951 TTTTTTGGAA TATAAATAAG CTCGAAGTCG ACGAATTCAT GACAGTGCTG

1001 GCGCCAGCCT GGAGCCCAAC AACCTATCTC CTCCTGCTGC TGCTGCTGAG

1051 CTCGGGACTC AGTGGGACCC AGGACTGCTC CTTCCAACAC AGCCCCATCT

1101 CCTCCGACTT CGCTGTCAAA ATCCGTGAGC TGTCTGACTA CCTGCTTCAA

1151 GATTACCCAG TCACCGTGGC CTCCAACCTG CAGGACGAGG AGCTCTGCGG

1201 GGGCCTCTGG CGGCTGGTCC TGGCACAGCG CTGGATGGAG CGGCTCAAGA

1251 CTGTCGCTGG GTCCAAGATG CAAGGCTTGC TGGAGCGCGT GAACACGGAG

1301 ATACACTTTG TCACCAAATG TGCCTTTCAG CCCCCCCCCA

GCTGTCTTCG
1351 CTTCGTCCAG ACCAACATCT CCCGCCTCCT GCAGGAGACC TCCGAGCAGC
1401 TGGTGGCGCT GAAGCCCTGG ATCACTCGCC AGAACTTCTC CCGGTGCCTG
1451 GAGCTGCAGT GTCAGCCCGA CTCCTCAACC CTGCCACCCC CATGGAGTCC
1501 CCGGCCCCTG GAGGCCACAG CCCCGACAGC CCCGCAGCCC CCTCTGCTCC
1551 TCCTACTGCT GCTGCCCGTG GGCCTCCTGC TGCTGGCCGC TGCCTGGTGC
1601 CTGCACTGGC AGAGGACGCG GCGGAGGACA CCCCGCCCTG GGGAGCAGGT
1651 GCCCCCCGTC CCCAGTCCCC AGGACCTGCT GCTTGTGGAG CACTGACTCG
1701 AGTTTACTTG TACAGCTCGT CCATGCCGAG AGTGATCCCG GCGGCGGTCA
1751 CGAACTCCAG CAGGACCATG TGATCGCGCT TCTCGTTGGG GTCTTTGCTC
1801 AGGGCGGACT GGGTGCTCAG GTAGTGGTTG TCGGGCAGCA GCACGGGGCC
1851 GTCGCCGATG GGGGTGTTCT GCTGGTAGTG GTCGGCGAGC TGCACGCTGC
1901 CGTCCTCGAT GTTGTGGCGG ATCTTGAAGT TCACCTTGAT GCCGTTCTTC
1951 TGCTTGTCGG CCATGATATA GACGTTGTGG CTGTTGTAGT TGTACTCCAG
2001 CTTGTGCCCC AGGATGTTGC CGTCCTCCTT GAAGTCGATG CCCTTCAGCT

2051 CGATGCGGTT CACCAGGGTG TCGCCCTCGA ACTTCACCTC GGCGCGGGTC
2101 TTGTAGTTGC CGTCGTCCTT GAAGAAGATG GTGCGCTCCT GGACGTAGCC
2151 TTCGGGCATG GCGGACTTGA AGAAGTCGTG CTGCTTCATG TGGTCGGGGT
2201 AGCGGCTGAA GCACTGCACG CCGTAGGTCA GGGTGGTCAC GAGGGTGGGC
2251 CAGGGCACGG GCAGCTTGCC GGTGGTGCAG ATGAACTTCA GGGTCAGCTT
2301 GCCGTAGGTG GCATCGCCCT CGCCCTCGCC GGACACGCTG AACTTGTGGC
2351 CGTTTACGTC GCCGTCCAGC TCGACCAGGA TGGGCACCAC CCCGGTGAAC
2401 AGCTCCTCGC CCTTGCTCAC CATGGTACCA GGCCTAGATC TGTCGACTTC
2451 GAGCTTATTT ATATTCCAAA AAAAAAAAAT AAAATTTCAA TTTTTCTCGA
2501 GTATGAGTAT AGTGTTAAAT GACACTTACT AAATAGCCAA GGTGATTATT
2551 CGTATTTTTT TAAGGAGTAA CCATGTCCGC AATTAGATTT ATTGCATGTC
2601 TATATCTCAT TTCCATCTTC GGAAATTGTC ATGAGGATCC ATATTATCAA
2651 CCATTTGATA AATTAAACAT TACTCTAGAT ATATACACTT ATGAGGATCT
2701 AGTACCATAC ACCGTAGACA ATGACACAAC TTCTTTCGTT AAGATATACT
2751 TTAAAAATTT TTGGATTACG GTTATGACTA AATGGTGTGC

TCCGTTTATT
2801 GATACCGTTA GCGTATACAC ATCTCATGAT AATCTGAATA TACAATTTTA
2851 TAGTAGGGAC GAATATGATA CACAAAGCGA GGATAAAATT TGTACCATTG
2901 ATGTTAAAGC ACGATGCAAA CATCTAACAA AACGAGAAGT TACAGTACAA
2951 CAAGAAGCCT ACAGATAATC TAGATGCATT CGCGAGGTAC CGAATCGGAT
3001 CCCGGGCCCG TCGACTGCAG AGGCCTGCAT GCAAGCTTGG CGTAATCATG
3051 GTCATAGCTG TTTCCTGTGT GAAATTGTTA TCCGCTCACA ATTCCACACA
3101 ACATACGAGC CGGAAGCATA AAGTGTAAAG CCTGGGGTGC CTAATGAGTG
3151 AGCTAACTCA CATTAATTGC GTTGCGCTCA CTGCCCGCTT TCCAGTCGGG
3201 AAACCTGTCG TGCCAGCTGC ATTAATGAAT CGGCCAACGC GCGGGGAGAG
3251 GCGGTTTGCG TATTGGGCGC TCTTCCGCTT CCTCGCTCAC TGACTCGCTG
3301 CGCTCGGTCG TTCGGCTGCG GCGAGCGGTA TCAGCTCACT CAAAGGCGGT
3351 AATACGGTTA TCCACAGAAT CAGGGGATAA CGCAGGAAAG AACATGTGAG
3401 CAAAAGGCCA GCAAAAGGCC AGGAACCGTA AAAAGGCCGC GTTGCTGGCG
3451 TTTTTCCATA GGCTCCGCCC CCCTGACGAG CATCACAAAA ATCGACGCTC

3501 AAGTCAGAGG TGGCGAAACC CGACAGGACT ATAAAGATAC CAGGCGTTTC

3551 CCCCTGGAAG CTCCCTCGTG CGCTCTCCTG TTCCGACCCT GCCGCTTACC

3601 GGATACCTGT CCGCCTTTCT CCCTTCGGGA AGCGTGGCGC TTTCTCATAG

3651 CTCACGCTGT AGGTATCTCA GTTCGGTGTA GGTCGTTCGC TCCAAGCTGG

3701 GCTGTGTGCA CGAACCCCCC GTTCAGCCCG ACCGCTGCGC CTTATCCGGT

3751 AACTATCGTC TTGAGTCCAA CCCGGTAAGA CACGACTTAT CGCCACTGGC

3801 AGCAGCCACT GGTAACAGGA TTAGCAGAGC GAGGTATGTA GGCGGTGCTA

3851 CAGAGTTCTT GAAGTGGTGG CCTAACTACG GCTACACTAG AAGAACAGTA

3901 TTTGGTATCT GCGCTCTGCT GAAGCCAGTT ACCTTCGGAA AAAGAGTTGG

3951 TAGCTCTTGA TCCGGCAAAC AAACCACCGC TGGTAGCGGT GGTTTTTTTG

4001 TTTGCAAGCA GCAGATTACG CGCAGAAAAA AAGGATCTCA AGAAGATCCT

4051 TTGATCTTTT CTACGGGGTC TGACGCTCAG TGGAACGAAA ACTCACGTTA

4101 AGGGATTTTG GTCATGAGAT TATCAAAAAG GATCTTCACC TAGATCCTTT

4151 TAAATTAAAA ATGAAGTTTT AAATCAATCT AAAGTATATA TGAGTAAACT

4201 TGGTCTGACA GTTACCAATG CTTAATCAGT GAGGCACCTA

TCTCAGCGAT
4251 CTGTCTATTT CGTTCATCCA TAGTTGCCTG ACTCCCCGTC GTGTAGATAA
4301 CTACGATACG GGAGGGCTTA CCATCTGGCC CCAGTGCTGC AATGATACCG
4351 CGAGACCCAC GCTCACCGGC TCCAGATTTA TCAGCAATAA ACCAGCCAGC
4401 CGGAAGGGCC GAGCGCAGAA GTGGTCCTGC AACTTTATCC GCCTCCATCC
4451 AGTCTATTAA TTGTTGCCGG GAAGCTAGAG TAAGTAGTTC GCCAGTTAAT
4501 AGTTTGCGCA ACGTTGTTGC CATTGCTACA GGCATCGTGG TGTCACGCTC
4551 GTCGTTTGGT ATGGCTTCAT TCAGCTCCGG TTCCCAACGA TCAAGGCGAG
4601 TTACATGATC CCCCATGTTG TGCAAAAAAG CGGTTAGCTC CTTCGGTCCT
4651 CCGATCGTTG TCAGAAGTAA GTTGGCCGCA GTGTTATCAC TCATGGTTAT
4701 GGCAGCACTG CATAATTCTC TTACTGTCAT GCCATCCGTA AGATGCTTTT
4751 CTGTGACTGG TGAGTACTCA ACCAAGTCAT TCTGAGAATA GTGTATGCGG
4801 CGACCGAGTT GCTCTTGCCC GGCGTCAATA CGGGATAATA CCGCGCCACA
4851 TAGCAGAACT TTAAAAGTGC TCATCATTGG AAAACGTTCT TCGGGGCGAA
4901 AACTCTCAAG GATCTTACCG CTGTTGAGAT CCAGTTCGAT GTAACCCACT

4951 CGTGCACCCA ACTGATCTTC AGCATCTTTT ACTTTCACCA GCGTTTCTGG
5001 GTGAGCAAAA ACAGGAAGGC AAAATGCCGC AAAAAAGGGA ATAAGGGCGA
5051 CACGGAAATG TTGAATACTC ATACTCTTCC TTTTTCAATA TTATTGAAGC
5101 ATTTATCAGG GTTATTGTCT CATGAGCGGA TACATATTTG AATGTATTTA
5151 GAAAAATAAA CAAATAGGGG TTCCGCGCAC ATTTCCCCGA AAAGTGCCAC
5201 CTGACGTCTA AGAAACCATT ATTATCATGA CATTAACCTA TAAAAATAGG
5251 CGTATCACGA GGCCCTTTCG TC

[0437] A sequência do genoma do vírus MVA (SEQ ID NO: 1) fornecido pelo GenBank No. de Acesso U94848.1 é fornecido na **FIG. 22**. Em algumas modalidades, o vírus MVAΔC7L manipulado expressando OX40L é gerado pela inserção de um construto de expressão, como aqueles ilustrados por SEQ ID NOs: 3 e 5 na região genômica de MVA que corresponde à posição do locus TK (*por exemplo*, posição 75.560 a 76.093 de SEQ ID NO: 1). Adicionalmente ou alternativamente, em algumas modalidades MVAΔC7L-OX40L manipulado é ainda modificado para expressar hFlt3L inserindo um construto de expressão tal como aquele que é ilustrado por SEQ ID NO: 4 na região genômica MVA que corresponde ao locus C7 (*por exemplo*, posição 18.407 a 18.859 de SEQ ID NO: 1).

MVAΔE3L

[0438] A divulgação da presente tecnologia se refere a um vírus E3L vaccinia Ankara modificado mutante (MVA) (*isto é*, MVAΔE3L; vírus MVA compreendendo uma deleção E3L; MVA geneticamente modificado para compreender um gene E3L mutante), ou composições imunogênicas compreendendo o vírus, em em que o vírus é projetado para expressar um ou

mais genes específicos de interesse (SG), como OX40L (MVAΔE3L-OX40L), e seu uso como imunoterapêutico contra o câncer. Em algumas modalidades, a timidina quinase (TK) do vírus MVA, por meio de técnicas de recombinação homóloga, é projetado para conter uma interrupção que compreende uma sequência de ácido nucleico heteróloga compreendendo um ou mais cassetes de expressão, que resultam em um nocaute TK de modo que o gene TK não seja expresso, expressa em níveis tão baixos que não têm efeito, ou a proteína expressa não é funcional (*por exemplo*, é uma mutação nula). O vírus MVAΔE3L-TK(-) resultante é ainda modificado para compreender uma ou mais cassetes de expressão que são flanqueados por uma sequência parcial do gene TK (TK-L e TK-R) em ambos os lados. Por exemplo, em algumas modalidades a sequência de ácido nucleico correspondente à posição de TK no genoma de MVAΔE3L (*por exemplo*, posição 75.798 to 75.868 de SEQ ID NO: 1) é substituído por uma sequência de ácido nucleico heterólogo compreendendo uma estrutura de leitura aberta que codifica um gene específico de interesse (SG), como OX40L humano, resultando em MVAΔE3L-TK(-)-OX40L. Em algumas modalidades, o cassete de expressão compreende uma única estrutura de leitura aberta que codifica um gene específico de interesse (SG), como OX40L usando o promotor precoce e tardio sintético viral de vaccinia (PsE/L).

[0439] Embora em certas modalidades descritas acima, o transgene (*por exemplo*, OX40L) possa ser inserido no locus TK, dividindo o gene TK e obliterando-o, outros loci de integração adequados podem ser selecionados. Por exemplo, MVA codifica vários genes imunomoduladores, incluindo, mas não se limitando a C11, K3, F1, F2, F4, F6, F8, F9, F11, F14.5, J2, A46, E3L, B18R (WR200), E5R, K7R, C12L, B8R, B14R, N1L, C11R, K1L, C16, M1L, N2L e WR199. Consequentemente, em algumas modalidades, esses genes podem ser deletados para aumentar as propriedades de ativação reações imunológicas do vírus e permitir a inserção de transgenes.

[0440] Em algumas modalidades, os vírus MVAΔE3L-OX40L recombinantes descrito acima são modificados para expressar pelo menos um outro gene heterólogo, tal como qualquer um ou mais de hFlt3L, hIL-2, hIL-12, hIL-15, hIL-15/IL-15Rα, hIL-18, hIL-21, anti-huCTLA-4, anti-huPD-1, anti-huPD-L1, GITRL, 4-1BBL, ou CD40L e/ou incluir pelo menos uma outra mutação ou deleção de gene viral, como qualquer uma ou mais dentre as seguintes deleções: C7; E3LΔ83N; B2R (ΔB2R), B19R (B18R; ΔWR200); E5R; K7R; C12L (IL18BP); B8R; B14R; N1L; C11R; K1L; M1L; N2L; e/ou WR199. Em outras modalidades, nenhum outro gene heterólogo é adicionado além daqueles fornecidos no nome do vírus aqui (*por exemplo*, OX40L), e/ou nenhum outro gene viral diferente de E3L ou E3L e TK são interrompidos ou deletados.

[0441] Em algumas modalidades, MVAΔE3L é manipulado para expressar OX40L e hFlt3L. Em algumas modalidades, o vírus recombinante é ainda modificado no locus E3, por meio de técnicas de recombinação homóloga, para conter uma interrupção que compreende uma sequência de ácido nucleico heterólogo compreendendo um ou mais cassetes de expressão, que resultam em um nocaute de E3 de modo que o gene E3 não seja expresso, expresso em níveis tão baixos que não têm efeito, ou a proteína expressa não é funcional (*por exemplo*, é uma mutação nula). Em algumas modalidades, o cassete de expressão compreende uma única estrutura de leitura aberta que codifica um gene específico de interesse (SG), como hFlt3L, resultando em MVAΔE3L-hFlt3L-TK(-)-OX40L. Em algumas modalidades, o cassete de expressão que codifica OX40L é inserido no locus E3, enquanto o cassete de expressão que codifica hFlt3L é inserido no locus TK.

[0442] Adicionalmente ou alternativamente, em algumas modalidades, a sequência de ácido nucleico heterólogo compreende um cassete de expressão compreendendo duas ou mais estruturas de leitura aberta que codificam dois ou mais genes específicos de interesse, separados por uma sequência de nucleotídeos que codifica, na direção 5’ para 3', um sítio

de clivagem de protease (*por exemplo*, um sítio de clivagem de furina) e uma sequência de peptídeo 2A (Pep2A).

[0443] Em algumas modalidades, a sequência de nucleotídeos heterólogos compreende ainda um cassete de expressão adicional que compreende uma estrutura de leitura aberta que codifica um marcador selecionável operacionalmente ligado a um promotor que é capaz de dirigir a expressão do marcador selecionável (*consulte, por exemplo,* ***FIG.*** **1**). Em algumas modalidades, o marcador selecionável é um gene da xantina-guanina fosforibosil transferase (gpt). Em algumas modalidades, o marcador selecionável é um gene de proteína fluorescente verde (GFP). Em algumas modalidades, o marcador selecionável é um gene mCherry que codifica uma proteína fluorescente vermelha.

[0444] Exemplos não limitativos de estruturas de leitura aberta de construto de expressão OX40L de acordo com a presente tecnologia são mostrados acima na **Tabela 1**.

MVAΔE5R

[0445] A divulgação da presente tecnologia se refere a um vírus E5R vaccinia Ankara modificado mutante (MVA) (*isto é*, MVAΔE5R; vírus MVA compreendendo uma deleção E5R; MVA geneticamente modificado para compreender um gene E5R mutante), ou composições imunogênicas compreendendo o vírus, e seu uso como imunoterapêutico contra o câncer. Em algumas modalidades, o gene E5R do vírus MVA, por meio de técnicas de recombinação homóloga, é projetado para conter uma interrupção que compreende uma sequência de ácido nucleico heteróloga compreendendo um ou mais cassetes de expressão, que resultam em um nocaute E5R de modo que o gene E5R não seja expresso, expressa em níveis tão baixos que não têm efeito, ou a proteína expressa não é funcional (*por exemplo*, é uma mutação nula). Em algumas modalidades, o mutante ΔE5R inclui uma sequência de ácido nucleico heterólogo no lugar de toda ou a maioria da sequência do gene E5R. Por exemplo, em algumas modalidades a sequência

de ácido nucleico correspondente à posição de E5R no genoma de MVA (*por exemplo*, posição 38.432 to 39.385 de SEQ ID NO: 1) é substituído por uma sequência de ácido nucleico heterólogo compreendendo uma estrutura de leitura aberta que codifica um gene específico de interesse (SG), como OX40L humano, resultando em MVAΔE5R-OX40L. Em algumas modalidades, o cassete de expressão compreende uma única estrutura de leitura aberta que codifica hFlt3L, resultando em MVAΔE5R-hFlt3L.

[0446] Em algumas modalidades, o vírus MVAΔE5R é modificado para expressar um ou mais genes específicos de interesse (SG), como um gene heterólogo selecionado dentre qualquer um ou mais de hOX40L, hFlt3L, hIL-2, hIL-12, hIL-15, hIL-15/IL-15Rα, hIL-18, hIL-21, anti-huCTLA-4, anti-huPD-1, anti-huPD-L1, GITRL, 4-1BBL, ou CD40L, e/ou inclui pelo menos uma outra mutação ou deleção de gene viral, como qualquer uma ou mais dentre as seguintes deleções ou mutações: C7 (ΔC7); E3L (ΔE3L); E3LΔ83N; B2R (ΔB2R), B19R (B18R; ΔWR200); E5R (ΔE5R); K7R; C12L (IL18BP); B8R; B14R; N1L; C11R; K1L; M1L; N2L; e/ou WR199. Em algumas modalidades, o vírus MVAΔE5R é selecionado a partir de MVAΔE3LΔE5R, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40LΔWR199-hIL-12ΔC11R, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40LΔWR199-hIL-12ΔC11R-hIL-15/IL-15Rα, ou MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔWR199.

[0447] Em algumas modalidades, a timidina quinase (TK) do vírus MVA, por meio de técnicas de recombinação homóloga, é projetado para conter uma interrupção que compreende uma sequência de ácido nucleico heteróloga compreendendo um ou mais cassetes de expressão, que resultam em um nocaute TK de modo que o gene TK não seja expresso, expressa em níveis tão baixos que não têm efeito, ou a proteína expressa não é funcional (*por exemplo*, é uma mutação nula). O vírus MVAΔE5R-TK(-) resultante é ainda modificado para compreender uma ou mais cassetes de expressão que são flanqueados por uma sequência parcial do gene TK (TK-L e TK-R) em

ambos os lados. Por exemplo, em algumas modalidades a sequência de ácido nucleico correspondente à posição de TK no genoma de MVAΔE5R (*por exemplo*, posição 75.798 to 75.868 de SEQ ID NO: 1) é substituído por uma sequência de ácido nucleico heterólogo compreendendo uma estrutura de leitura aberta que codifica um gene específico de interesse (SG), como OX40L humano, resultando em MVAΔE5R-TK(-)-OX40L. Em algumas modalidades, o cassete de expressão compreende uma única estrutura de leitura aberta que codifica um gene específico de interesse (SG), como OX40L usando o promotor precoce e tardio sintético viral de vaccinia (PsE/L).

[0448] Embora em certas modalidades descritas acima, o transgene (*por exemplo*, OX40L) possa ser inserido no locus TK, dividindo o gene TK e obliterando-o, outros loci de integração adequados podem ser selecionados. Por exemplo, MVA codifica vários genes imunomoduladores, incluindo, mas não se limitando a C11, K3, F1, F2, F4, F6, F8, F9, F11, F14.5, J2, A46, E3L, B18R (WR200), E5R, K7R, C12L, B8R, B14R, N1L, C11R, K1L, C16, M1L, N2L e WR199. Consequentemente, em algumas modalidades, esses genes podem ser deletados para aumentar as propriedades de ativação reações imunológicas do vírus e permitir a inserção de transgenes.

[0449] Em outras modalidades, nenhum outro gene heterólogo é adicionado além daqueles fornecidos no nome do vírus aqui (*por exemplo*, OX40L, hFlt3L), e/ou nenhum outro gene viral diferente de E5R ou E5R e TK são interrompidos ou deletados.

[0450] Em algumas modalidades, MVAΔE5R é manipulado para expressar OX40L e hFlt3L. Em algumas modalidades, o vírus recombinante é ainda modificado no locus E5R, por meio de técnicas de recombinação homóloga, para conter uma interrupção que compreende uma sequência de ácido nucleico heterólogo compreendendo um ou mais cassetes de expressão, que resultam em um nocaute de E5R de modo que o gene E5R não seja expresso, expresso em níveis tão baixos que não têm efeito, ou a proteína expressa não é funcional (*por exemplo*, é uma mutação nula). Em algumas

modalidades, o cassete de expressão compreende uma única estrutura de leitura aberta que codifica um gene específico de interesse (SG), como hFlt3L, resultando em MVAΔE5R-hFlt3L-TK(-)-OX40L. Em algumas modalidades, o cassete de expressão que codifica OX40L é inserido no locus E5R, enquanto o cassete de expressão que codifica hFlt3L é inserido no locus TK.

[0451] Adicionalmente ou alternativamente, em algumas modalidades, a sequência de ácido nucleico heterólogo compreende um cassete de expressão compreendendo duas ou mais estruturas de leitura aberta que codificam dois ou mais genes específicos de interesse, separados por uma sequência de nucleotídeos que codifica, na direção 5’ para 3', um sítio de clivagem de protease (*por exemplo*, um sítio de clivagem de furina) e uma sequência de peptídeo 2A (Pep2A). Por exemplo, em algumas modalidades, MVAΔE5R abrange um vírus MVA recombinante em que toda ou a maioria da sequência do gene E5R é substituída por um primeiro gene específico de interesse (*por exemplo*, hFtl3L) e um segundo gene específico de interesse (*por exemplo*, OX40L), em que as sequências de codificação do primeiro e do segundo genes específicos de interesse são separadas por um cassete incluindo um sítio de clivagem de furina, seguido por uma sequência de peptídeo 2A (Pep2A), formando assim um vírus recombinante, como MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L (*Consulte, por exemplo*, **FIG. 81**).

[0452] Em algumas modalidades, a sequência de nucleotídeos heterólogos compreende ainda um cassete de expressão adicional que compreende uma estrutura de leitura aberta que codifica um marcador selecionável operacionalmente ligado a um promotor que é capaz de dirigir a expressão do marcador selecionável. Em algumas modalidades, o marcador selecionável é um gene da xantina-guanina fosforibosil transferase (gpt). Em algumas modalidades, o marcador selecionável é um gene de proteína fluorescente verde (GFP). Em algumas modalidades, o marcador selecionável é um gene mCherry que codifica uma proteína fluorescente vermelha.

[0453] Exemplos não limitativos de estruturas de leitura aberta de construto de expressão e deleção de acordo com a presente tecnologia são mostrados na (**Tabela 2**).

TABELA 2
Sequências de nucleotídeos exemplares para as estruturas de leitura aberta dos construtos de MVAΔE5R recombinantes da presente tecnologia.
Sequência de ácido nucleico do vetor pUC57-MVA-ΔE5R-mCherry (SEQ ID NO: 22) 1 TCGCGCGTTT CGGTGATGAC GGTGAAAACC TCTGACACAT GCAGCTCCCG GAGACGGTCA 61 CAGCTTGTCT GTAAGCGGAT GCCGGGAGCA GACAAGCCCG TCAGGGCGCG TCAGCGGGTG 121 TTGGCGGGTG TCGGGGCTGG CTTAACTATG CGGCATCAGA GCAGATTGTA CTGAGAGTGC 181 ACCATATGCG GTGTGAAATA CCGCACAGAT GCGTAAGGAG AAAATACCGC ATCAGGCGCC 241 ATTCGCCATT CAGGCTGCGC AACTGTTGGG AAGGGCGATC GGTGCGGGCC TCTTCGCTAT 301 TACGCCAGCT GGCGAAAGGG GGATGTGCTG CAAGGCGATT AAGTTGGGTA ACGCCAGGGT 361 TTTCCCAGTC ACGACGTTGT AAAACGACGG CCAGTGAATT CGAGCTCGGT ACCgagatag 421 cgaaggaatt ctttttcggt gccgctagta cccttaatca tatcacatag tgttttatat 481 tccaaatttg tggcaataga cggtttattt ctatacgata gtttgtttct ggaatccttt 541 gagtattcta taccaatatt attctttgat tcgaatttag tttcttcgat attagatttt 601 gtattaccta tattcttgat gtagtacttt gatgattttt ccatggccca ttctattaag 661 tcttccaagt tggcatcatc cacatattgt gatagtaatt ctcggatatc agtagcggct 721 accgccattg atgtttgttc attggatgag taactactaa tgtatacatt ttccatttat 781 aacacttatg tattaacttt gttcatttat atttttttcat tattatgttg atattaacaa

841 aagtgaatat ataagcttga tcaggccttc actaattcca aacccacccg ctttttatag
901 taagtttttc acccataaat aataaataca ataattaatt tctcgtaaaa gtagaaaata
961 tattctaatt tattgcacgg taaggaagta gatcataact cgacatggtg agcaagggcg
1021 aggaggataa catggccatc atcaaggagt tcatgcgctt caaggtgcac atggagggct
1081 ccgtgaacgg ccacgagttc gagatcgagg gcgagggcga gggccgcccc tacgagggca
1141 cccagaccgc caagctgaag gtgaccaagg gtggcccccc gcccttcgcc tgggacatcc
1201 tgtcccctca gttcatgtac ggctccaagg cctacgtgaa gcaccccgcc gacatccccg
1261 actacttgaa gctgtccttc cccgagggct tcaagtggga gcgcgtgatg aacttcgagg
1321 acggcggcgt ggtgaccgtg acccaggact cctccctgca ggacggcgag ttcatctaca
1381 aggtgaagct gcgcggcacc aacttccccc ccgacggccc cgtaatgcag aagaagacca
1441 tgggctggga ggcctcctcc gagcggatgt accccgagga cggcgccctg aagggcgaga
1501 tcaagcagag gctgaagctg aaggacggcg gccactacga cgctgaggtc aagaccacct
1561 acaaggccaa gaagcccgtg cagctgcccg gcgcctacaa cgtcaacatc aagttggaca
1621 tcacctccca caacgaggac tacaccatcg tggaacagta cgaacgcgcc gagggccgcc
1681 actccaccgg cggcatggac gagctGATCA CGAATTgtta acctgcattt catctttctc
1741 caatactaat tcaaattgtt aaattaataa tggatagtat aaatagttat tagtgataaa
1801 atagtaaaaa taattattag aataagagtg tagtatcata gataactctc ttctataaaa
1861 atggatttta ttcgtagaaa gtatcttata tacacagtag aaaataatat agatttttta
1921 aaggatgata cattaagtaa agtaaacaat tttaccctca atcatgtact agctctcaag
1981 tatctagtta gcaattttcc tcaacacgtt attactaagg atgtattagc taataccaat
2041 ttttttgttt tcatacatat ggtacgatgt tgtaaagtgt acgaagcggt tttacgacac
2101 gcatttgatg cacccacgtt gtacgttaaa gcattgacta agaattattG GATCCCGGGC
2161 CCGTCGACTG CAGAGGCCTG CATGCAAGCT TGGCGTAATC ATGGTCATAG CTGTTTCCTG
2221 TGTGAAATTG TTATCCGCTC ACAATTCCAC ACAACATACG AGCCGGAAGC ATAAAGTGTA
2281 AAGCCTGGGG TGCCTAATGA GTGAGCTAAC TCACATTAAT TGCGTTGCGC TCACTGCCCG
2341 CTTTCCAGTC GGGAAACCTG TCGTGCCAGC TGCATTAATG

AATCGGCCAA CGCGCGGGGA

2401 GAGGCGGTTT GCGTATTGGG CGCTCTTCCG CTTCCTCGCT CACTGACTCG CTGCGCTCGG

2461 TCGTTCGGCT GCGGCGAGCG GTATCAGCTC ACTCAAAGGC GGTAATACGG TTATCCACAG

2521 AATCAGGGGA TAACGCAGGA AAGAACATGT GAGCAAAAGG CCAGCAAAAG GCCAGGAACC

2581 GTAAAAAGGC CGCGTTGCTG GCGTTTTTCC ATAGGCTCCG CCCCCCTGAC GAGCATCACA

2641 AAAATCGACG CTCAAGTCAG AGGTGGCGAA ACCCGACAGG ACTATAAAGA TACCAGGCGT

2701 TTCCCCCTGG AAGCTCCCTC GTGCGCTCTC CTGTTCCGAC CCTGCCGCTT ACCGGATACC

2761 TGTCCGCCTT TCTCCCTTCG GGAAGCGTGG CGCTTTCTCA TAGCTCACGC TGTAGGTATC

2821 TCAGTTCGGT GTAGGTCGTT CGCTCCAAGC TGGGCTGTGT GCACGAACCC CCCGTTCAGC

2881 CCGACCGCTG CGCCTTATCC GGTAACTATC GTCTTGAGTC CAACCCGGTA AGACACGACT

2941 TATCGCCACT GGCAGCAGCC ACTGGTAACA GGATTAGCAG AGCGAGGTAT GTAGGCGGTG

3001 CTACAGAGTT CTTGAAGTGG TGGCCTAACT ACGGCTACAC TAGAAGAACA GTATTTGGTA

3061 TCTGCGCTCT GCTGAAGCCA GTTACCTTCG GAAAAAGAGT TGGTAGCTCT TGATCCGGCA

3121 AACAAACCAC CGCTGGTAGC GGTGGTTTTT TTGTTTGCAA GCAGCAGATT ACGCGCAGAA

3181 AAAAAGGATC TCAAGAAGAT CCTTTGATCT TTTCTACGGG GTCTGACGCT CAGTGGAACG

3241 AAAACTCACG TTAAGGGATT TTGGTCATGA GATTATCAAA AAGGATCTTC ACCTAGATCC

3301 TTTTAAATTA AAAATGAAGT TTTAAATCAA TCTAAAGTAT ATATGAGTAA ACTTGGTCTG

3361 ACAGTTACCA ATGCTTAATC AGTGAGGCAC CTATCTCAGC GATCTGTCTA TTTCGTTCAT

3421 CCATAGTTGC CTGACTCCCC GTCGTGTAGA TAACTACGAT ACGGGAGGGC TTACCATCTG

3481 GCCCCAGTGC TGCAATGATA CCGCGAGACC CACGCTCACC GGCTCCAGAT TTATCAGCAA

3541 TAAACCAGCC AGCCGGAAGG GCCGAGCGCA GAAGTGGTCC TGCAACTTTA TCCGCCTCCA

3601 TCCAGTCTAT TAATTGTTGC CGGGAAGCTA GAGTAAGTAG TTCGCCAGTT AATAGTTTGC

3661 GCAACGTTGT TGCCATTGCT ACAGGCATCG TGGTGTCACG CTCGTCGTTT GGTATGGCTT

3721 CATTCAGCTC CGGTTCCCAA CGATCAAGGC GAGTTACATG ATCCCCCATG TTGTGCAAAA

3781 AAGCGGTTAG CTCCTTCGGT CCTCCGATCG TTGTCAGAAG TAAGTTGGCC GCAGTGTTAT

3841 CACTCATGGT TATGGCAGCA CTGCATAATT CTCTTACTGT CATGCCATCC GTAAGATGCT

3901 TTTCTGTGAC TGGTGAGTAC TCAACCAAGT CATTCTGAGA ATAGTGTATG CGGCGACCGA

3961 GTTGCTCTTG CCCGGCGTCA ATACGGGATA ATACCGCGCC ACATAGCAGA ACTTTAAAAG

4021 TGCTCATCAT TGGAAAACGT TCTTCGGGGC GAAAACTCTC AAGGATCTTA CCGCTGTTGA

4081 GATCCAGTTC GATGTAACCC ACTCGTGCAC CCAACTGATC

TTCAGCATCT TTTACTTTCA

4141 CCAGCGTTTC TGGGTGAGCA AAAACAGGAA GGCAAAATGC CGCAAAAAAG GGAATAAGGG

4201 CGACACGGAA ATGTTGAATA CTCATACTCT TCCTTTTTCA ATATTATTGA AGCATTTATC

4261 AGGGTTATTG TCTCATGAGC GGATACATAT TTGAATGTAT TTAGAAAAAT AAACAAATAG

4321 GGGTTCCGCG CACATTTCCC CGAAAAGTGC CACCTGACGT CTAAGAAACC ATTATTATCA

4381 TGACATTAAC CTATAAAAAT AGGCGTATCA CGAGGCCCTT TCGTC

Sequência de ácido nucleico do vetor MA-MVA-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L (SEQ ID NO: 23)

1 CTAAATTGTA AGCGTTAATA TTTTGTTAAA ATTCGCGTTA AATTTTTGTT AAATCAGCTC

61 ATTTTTTAAC CAATAGGCCG AAATCGGCAA AATCCCTTAT AAATCAAAAG AATAGACCGA

121 GATAGGGTTG AGTGGCCGCT ACAGGGCGCT CCCATTCGCC ATTCAGGCTG CGCAACTGTT

181 GGGAAGGGCG TTTCGGTGCG GGCCTCTTCG CTATTACGCC AGCTGGCGAA AGGGGGATGT

241 GCTGCAAGGC GATTAAGTTG GGTAACGCCA GGGTTTTCCC AGTCACGACG TTGTAAAACG

301 ACGGCCAGTG AGCGCGACGT AATACGACTC ACTATAGGGC GAATTGGCGG AAGGCCGTCA

361 AGGCCGCATT GGAGGTTCGT CAGCGGCTCT AGTTTGAATC ATCATCGGCG TAGTATTCCT

421 ACTTTTACAG TTAGGACACG GTGTATTGTA TTTCTCGTCG AGAACGTTAA AATAATCGTT

481 GTAACTCACA TCCTTTATTT TATCTATATT GTATTCTACT

CCTTTCTTAA TGCATTTTAT

541 ACCGAATAAG AGATAGCGAA GGAATTCTTT TTCGGTGCCG CTAGTACCCT TAATCATATC

601 ACATAGTGTT TTATATTCCA AATTTGTGGC AATAGACGGT TTATTTCTAT ACGATAGTTT

661 GTTTCTGGAA TCCTTTGAGT ATTCTATACC AATATTATTC TTTGATTCGA ATTTAGTTTC

721 TTCGATATTA GATTTTGTAT TACCTATATT CTTGATGTAG TACTTTGATG ATTTTTCCAT

781 GGCCCATTCT ATTAAGTCTT CCAAGTTGGC ATCATCCACA TATTGTGATA GTAATTCTCG

841 GATATCAGTA GCGGCTACCG CCATTGATGT TTGTTCATTG GATGAGTAAC TACTAATGTA

901 TACATTTTCC ATTTATAACA CTTATGTATT AACTTTGTTC ATTTATATTT TTTCATTATT

961 ATGTTGATAT TAACAAAAGT GAATATATGG ATCCAAAAAT TGAAATTTTA TTTTTTTTTT

1021 TTGGAATATA AATAAGCTCG AAGTCGACGA ATTCATGACA GTACTAGCTC CAGCTTGGTC

1081 CCCGACAACA TACCTTCTAC TACTACTATT GCTATCCTCC GGACTATCTG GAACCCAGGA

1141 TTGCTCTTTT CAGCACTCTC CGATCTCGTC TGATTTCGCG GTTAAGATCA GAGAGCTATC

1201 CGACTACTTG CTACAGGATT ACCCAGTAAC CGTCGCGTCC AACCTACAAG ATGAAGAACT

1261 ATGTGGTGGA CTTTGGAGAC TAGTCCTAGC GCAAAGATGG ATGGAAAGAC TTAAGACCGT

1321 AGCGGGATCT AAGATGCAGG GACTACTAGA AAGAGTCAAC ACCGAGATCC ACTTCGTCAC

1381 AAAGTGTGCG TTTCAACCAC CACCGTCCTG TCTAAGATTC GTCCAGACAA ACATCTCCAG

1441 ACTACTACAA GAAACCTCCG AGCAGCTAGT AGCGCTAAAA CCGTGGATCA CAAGACAGAA

1501 CTTCTCGAGA TGTCTAGAGC TACAGTGTCA GCCGGATTCT TCTACATTAC CACCACCATG

1561 GTCACCAAGA CCACTAGAAG CTACAGCTCC AACTGCTCCA CAACCACCAT TGCTACTTTT

1621 GCTATTGCTA CCCGTCGGAT TGCTACTATT AGCTGCTGCT TGGTGTCTAC ACTGGCAGAG

1681 AACTAGAAGA AGAACTCCAA GACCGGGAGA ACAAGTACCA CCAGTACCAT CTCCACAGGA

1741 CCTACTACTA GTCGAGCACA GAAGAAGAAG AAGATCGGGA GCGACCAACT TCTCGCTATT

1801 GAAACAAGCG GGAGATGTCG AAGAAAATCC GGGACCAATG GAAAGAGTAC AGCCGCTAGA

1861 AGAAAACGTA GGAAATGCGG CTAGACCGAG ATTCGAGAGA AACAAGCTAC TATTGGTCGC

1921 GTCCGTCATC CAAGGACTAG GATTGCTATT GTGCTTCACC TACATCTGCC TACACTTCTC

1981 CGCGCTACAA GTCTCTCATA GATACCCGAG AATCCAGTCC ATCAAGGTCC AGTTCACCGA

2041 GTACAAGAAA GAGAAGGGAT TCATCCTAAC CTCGCAGAAA GAGGACGAGA TCATGAAGGT

2101 CCAGAACAAC TCCGTCATCA TCAACTGCGA CGGATTCTAC CTAATCTCCC TAAAGGGATA

2161 CTTCTCCCAA GAAGTCAACA TCTCCTTGCA CTACCAGAAG GATGAGGAAC CGCTATTCCA

2221 GCTAAAGAAA GTCAGATCCG TCAACTCCCT AATGGTCGCC

TCTCTAACGT ACAAGGACAA

2281 GGTCTACCTA AACGTCACCA CCGACAACAC ATCCCTAGAT GATTTCCACG TAAACGGTGG

2341 AGAGCTAATC CTAATCCATC AGAACCCGGG AGAGTTCTGT GTATTATAAG TTAACAGGCC

2401 TGCATTTCAT CTTTCTCCAA TACTAATTCA AATTGTTAAA TTAATAATGG ATAGTATAAA

2461 TAGTTATTAG TGATAAAATA GTAAAAATAA TTATTAGAAT AAGAGTGTAG TATCATAGAT

2521 AACTCTCTTC TATAAAAATG GATTTTATTC GTAGAAAGTA TCTTATATAC ACAGTAGAAA

2581 ATAATATAGA TTTTTTAAAG GATGATACAT TAAGTAAAGT AAACAATTTT ACCCTCAATC

2641 ATGTACTAGC TCTCAAGTAT CTAGTTAGCA ATTTTCCTCA ACACGTTATT ACTAAGGATG

2701 TATTAGCTAA TACCAATTTT TTTGTTTTCA TACATATGGT ACGATGTTGT AAAGTGTACG

2761 AAGCGGTTTT ACGACACGCA TTTGATGCAC CCACGTTGTA CGTTAAAGCA TTGACTAAGA

2821 ATTATTTATC GTTTAGTAAC GCAATACAAT CGTACAAGGA AACCGTGCAT AAACTAACAC

2881 AAGATGAAAA ATTTTTAGAG GTTGCCGAAT ACATGGACGA ATTAGGAGAA CTTATAGGCG

2941 TAAATTATGA CTTAGTTCTT AATCCATTAT TTCACGGAGG GGAACCCATC AAAGATATGG

3001 AAATCACTGG GCCTCATGGG CCTTCCGCTC ACTGCCCGCT TTCCAGTCGG GAAACCTGTC

3061 GTGCCAGCTG CATTAACATG GTCATAGCTG TTTCCTTGCG TATTGGGCGC TCTCCGCTTC

3121 CTCGCTCACT GACTCGCTGC GCTCGGTCGT TCGGGTAAAG CCTGGGGTGC CTAATGAGCA

3181 AAAGGCCAGC AAAAGGCCAG GAACCGTAAA AAGGCCGCGT TGCTGGCGTT TTTCCATAGG

3241 CTCCGCCCCC CTGACGAGCA TCACAAAAAT CGACGCTCAA GTCAGAGGTG GCGAAACCCG

3301 ACAGGACTAT AAAGATACCA GGCGTTTCCC CCTGGAAGCT CCCTCGTGCG CTCTCCTGTT

3361 CCGACCCTGC CGCTTACCGG ATACCTGTCC GCCTTTCTCC CTTCGGGAAG CGTGGCGCTT

3421 TCTCATAGCT CACGCTGTAG GTATCTCAGT TCGGTGTAGG TCGTTCGCTC CAAGCTGGGC

3481 TGTGTGCACG AACCCCCCGT TCAGCCCGAC CGCTGCGCCT TATCCGGTAA CTATCGTCTT

3541 GAGTCCAACC CGGTAAGACA CGACTTATCG CCACTGGCAG CAGCCACTGG TAACAGGATT

3601 AGCAGAGCGA GGTATGTAGG CGGTGCTACA GAGTTCTTGA AGTGGTGGCC TAACTACGGC

3661 TACACTAGAA GAACAGTATT TGGTATCTGC GCTCTGCTGA AGCCAGTTAC CTTCGGAAAA

3721 AGAGTTGGTA GCTCTTGATC CGGCAAACAA ACCACCGCTG GTAGCGGTGG TTTTTTTGTT

3781 TGCAAGCAGC AGATTACGCG CAGAAAAAAA GGATCTCAAG AAGATCCTTT GATCTTTTCT

3841 ACGGGGTCTG ACGCTCAGTG GAACGAAAAC TCACGTTAAG GGATTTTGGT CATGAGATTA

3901 TCAAAAAGGA TCTTCACCTA GATCCTTTTA AATTAAAAAT GAAGTTTTAA ATCAATCTAA

3961 AGTATATATG AGTAAACTTG GTCTGACAGT TACCAATGCT

TAATCAGTGA GGCACCTATC

4021 TCAGCGATCT GTCTATTTCG TTCATCCATA GTTGCCTGAC TCCCCGTCGT GTAGATAACT

4081 ACGATACGGG AGGGCTTACC ATCTGGCCCC AGTGCTGCAA TGATACCGCG AGAACCACGC

4141 TCACCGGCTC CAGATTTATC AGCAATAAAC CAGCCAGCCG GAAGGGCCGA GCGCAGAAGT

4201 GGTCCTGCAA CTTTATCCGC CTCCATCCAG TCTATTAATT GTTGCCGGGA AGCTAGAGTA

4261 AGTAGTTCGC CAGTTAATAG TTTGCGCAAC GTTGTTGCCA TTGCTACAGG CATCGTGGTG

4321 TCACGCTCGT CGTTTGGTAT GGCTTCATTC AGCTCCGGTT CCCAACGATC AAGGCGAGTT

4381 ACATGATCCC CCATGTTGTG CAAAAAAGCG GTTAGCTCCT TCGGTCCTCC GATCGTTGTC

4441 AGAAGTAAGT TGGCCGCAGT GTTATCACTC ATGGTTATGG CAGCACTGCA TAATTCTCTT

4501 ACTGTCATGC CATCCGTAAG ATGCTTTTCT GTGACTGGTG AGTACTCAAC CAAGTCATTC

4561 TGAGAATAGT GTATGCGGCG ACCGAGTTGC TCTTGCCCGG CGTCAATACG GGATAATACC

4621 GCGCCACATA GCAGAACTTT AAAAGTGCTC ATCATTGGAA AACGTTCTTC GGGGCGAAAA

4681 CTCTCAAGGA TCTTACCGCT GTTGAGATCC AGTTCGATGT AACCCACTCG TGCACCCAAC

4741 TGATCTTCAG CATCTTTTAC TTTCACCAGC GTTTCTGGGT GAGCAAAAAC AGGAAGGCAA

4801 AATGCCGCAA AAAAGGGAAT AAGGGCGACA CGGAAATGTT GAATACTCAT ACTCTTCCTT

4861 TTTCAATATT ATTGAAGCAT TTATCAGGGT TATTGTCTCA TGAGCGGATA CATATTTGAA
4921 TGTATTTAGA AAAATAAACA AATAGGGGTT CCGCGCACAT TTCCCCGAAA AGTGCCAC
sequência de ácido nucleico do vetor pMA-MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L (SEQ ID NO: 24)
1 CTAAATTGTA AGCGTTAATA TTTTGTTAAA ATTCGCGTTA AATTTTTGTT AAATCAGCTC
61 ATTTTTTAAC CAATAGGCCG AAATCGGCAA AATCCCTTAT AAATCAAAAG AATAGACCGA
121 GATAGGGTTG AGTGGCCGCT ACAGGGCGCT CCCATTCGCC ATTCAGGCTG CGCAACTGTT
181 GGGAAGGGCG TTTCGGTGCG GGCCTCTTCG CTATTACGCC AGCTGGCGAA AGGGGGATGT
241 GCTGCAAGGC GATTAAGTTG GGTAACGCCA GGGTTTTCCC AGTCACGACG TTGTAAAACG
301 ACGGCCAGTG AGCGCGACGT AATACGACTC ACTATAGGGC GAATTGGCGG AAGGCCGTCA
361 AGGCCGCATT GGAGGTTCGT CAGCGGCTCT AGTTTGAATC ATCATCGGCG TAGTATTCCT
421 ACTTTTACAG TTAGGACACG GTGTATTGTA TTTCTCGTCG AGAACGTTAA AATAATCGTT
481 GTAACTCACA TCCTTTATTT TATCTATATT GTATTCTACT CCTTTCTTAA TGCATTTTAT
541 ACCGAATAAG AGATAGCGAA GGAATTCTTT TTCGGTGCCG CTAGTACCCT TAATCATATC
601 ACATAGTGTT TTATATTCCA AATTTGTGGC AATAGACGGT TTATTTCTAT ACGATAGTTT
661 GTTTCTGGAA TCCTTTGAGT ATTCTATACC AATATTATTC

TTTGATTCGA ATTTAGTTTC

721 TTCGATATTA GATTTTGTAT TACCTATATT CTTGATGTAG TACTTTGATG ATTTTTCCAT

781 GGCCCATTCT ATTAAGTCTT CCAAGTTGGC ATCATCCACA TATTGTGATA GTAATTCTCG

841 GATATCAGTA GCGGCTACCG CCATTGATGT TTGTTCATTG GATGAGTAAC TACTAATGTA

901 TACATTTTCC ATTTATAACA CTTATGTATT AACTTTGTTC ATTTATATTT TTTCATTATT

961 ATGTTGATAT TAACAAAAGT GAATATATGG ATCCAAAAAT TGAAATTTTA TTTTTTTTTT

1021 TTGGAATATA AATAAGCTCG AAGTCGACGA ATTCATGACA GTACTAGCTC CAGCTTGGTC

1081 CCCGACAACA TACCTTCTAC TACTACTATT GCTATCCTCC GGACTATCTG GAACCCAGGA

1141 TTGCTCTTTT CAGCACTCTC CGATCTCGTC TGATTTCGCG GTTAAGATCA GAGAGCTATC

1201 CGACTACTTG CTACAGGATT ACCCAGTAAC CGTCGCGTCC AACCTACAAG ATGAAGAACT

1261 ATGTGGTGGA CTTTGGAGAC TAGTCCTAGC GCAAAGATGG ATGGAAAGAC TTAAGACCGT

1321 AGCGGGATCT AAGATGCAGG GACTACTAGA AAGAGTCAAC ACCGAGATCC ACTTCGTCAC

1381 AAAGTGTGCG TTTCAACCAC CACCGTCCTG TCTAAGATTC GTCCAGACAA ACATCTCCAG

1441 ACTACTACAA GAAACCTCCG AGCAGCTAGT AGCGCTAAAA CCGTGGATCA CAAGACAGAA

1501 CTTCTCGAGA TGTCTAGAGC TACAGTGTCA GCCGGATTCT TCTACATTAC CACCACCATG

1561 GTCACCAAGA CCACTAGAAG CTACAGCTCC AACTGCTCCA CAACCACCAT TGCTACTTTT

1621 GCTATTGCTA CCCGTCGGAT TGCTACTATT AGCTGCTGCT TGGTGTCTAC ACTGGCAGAG

1681 AACTAGAAGA AGAACTCCAA GACCGGGAGA ACAAGTACCA CCAGTACCAT CTCCACAGGA

1741 CCTACTACTA GTCGAGCACA GAAGAAGAAG AAGATCGGGA GCGACCAACT TCTCGCTATT

1801 GAAACAAGCG GGAGATGTCG AAGAAAATCC GGGACCAATG GAGGGCGAGG GGGTCCAGCC

1861 TCTGGACGAG AACCTCGAAA ACGGGTCTCG CCCTCGCTTT AAATGGAAGA AGACTCTTAG

1921 GCTCGTTGTA AGCGGCATCA AGGGGGCCGG TATGTTGCTG TGCTTCATAT ATGTGTGTTT

1981 GCAACTTAGC TCTTCACCTG CAAAAGACCC CCCCATACAA CGCCTTCGGG GGGCTGTGAC

2041 CCGCTGTGAA GATGGTCAAT TGTTTATTTC TTCTTACAAG AACGAGTATC AGACGATGGA

2101 AGTCCAGAAT AACTCCGTAG TGATTAAGTG TGACGGACTG TACATCATCT ACTTGAAAGG

2161 ATCTTTTTTC CAGGAGGTCA AAATTGACCT CCACTTCAGG GAGGATCACA ACCCTATCTC

2221 AATCCCTATG TTGAACGACG GCAGAAGAAT CGTCTTTACT GTAGTCGCTT CACTGGCCTT

2281 CAAGGATAAG GTGTACTTGA CCGTAAACGC TCCTGATACC TTGTGCGAGC ATTTGCAAAT

2341 CAACGATGGA GAACTTATCG TTGTCCAACT CACACCAGGT TACTGTGCTC CTGAGGGCAG

2401 TTATCACAGT ACAGTGAACC AAGTCCCACT GTGAGTTAAC

AGGCCTGCAT TTCATCTTTC

2461 TCCAATACTA ATTCAAATTG TTAAATTAAT AATGGATAGT ATAAATAGTT ATTAGTGATA

2521 AAATAGTAAA AATAATTATT AGAATAAGAG TGTAGTATCA TAGATAACTC TCTTCTATAA

2581 AAATGGATTT TATTCGTAGA AAGTATCTTA TATACACAGT AGAAAATAAT ATAGATTTTT

2641 TAAAGGATGA TACATTAAGT AAAGTAAACA ATTTTACCCT CAATCATGTA CTAGCTCTCA

2701 AGTATCTAGT TAGCAATTTT CCTCAACACG TTATTACTAA GGATGTATTA GCTAATACCA

2761 ATTTTTTTGT TTTCATACAT ATGGTACGAT GTTGTAAAGT GTACGAAGCG GTTTTACGAC

2821 ACGCATTTGA TGCACCCACG TTGTACGTTA AAGCATTGAC TAAGAATTAT TTATCGTTTA

2881 GTAACGCAAT ACAATCGTAC AAGGAAACCG TGCATAAACT AACACAAGAT GAAAAATTTT

2941 TAGAGGTTGC CGAATACATG GACGAATTAG GAGAACTTAT AGGCGTAAAT TATGACTTAG

3001 TTCTTAATCC ATTATTTCAC GGAGGGGAAC CCATCAAAGA TATGGAAATC ACTGGGCCTC

3061 ATGGGCCTTC CGCTCACTGC CCGCTTTCCA GTCGGGAAAC CTGTCGTGCC AGCTGCATTA

3121 ACATGGTCAT AGCTGTTTCC TTGCGTATTG GGCGCTCTCC GCTTCCTCGC TCACTGACTC

3181 GCTGCGCTCG GTCGTTCGGG TAAAGCCTGG GGTGCCTAAT GAGCAAAAGG CCAGCAAAAG

3241 GCCAGGAACC GTAAAAAGGC CGCGTTGCTG GCGTTTTTCC ATAGGCTCCG CCCCCCTGAC

3301 GAGCATCACA AAAATCGACG CTCAAGTCAG AGGTGGCGAA ACCCGACAGG ACTATAAAGA

3361 TACCAGGCGT TTCCCCCTGG AAGCTCCCTC GTGCGCTCTC CTGTTCCGAC CCTGCCGCTT

3421 ACCGGATACC TGTCCGCCTT TCTCCCTTCG GGAAGCGTGG CGCTTTCTCA TAGCTCACGC

3481 TGTAGGTATC TCAGTTCGGT GTAGGTCGTT CGCTCCAAGC TGGGCTGTGT GCACGAACCC

3541 CCCGTTCAGC CCGACCGCTG CGCCTTATCC GGTAACTATC GTCTTGAGTC CAACCCGGTA

3601 AGACACGACT TATCGCCACT GGCAGCAGCC ACTGGTAACA GGATTAGCAG AGCGAGGTAT

3661 GTAGGCGGTG CTACAGAGTT CTTGAAGTGG TGGCCTAACT ACGGCTACAC TAGAAGAACA

3721 GTATTTGGTA TCTGCGCTCT GCTGAAGCCA GTTACCTTCG GAAAAAGAGT TGGTAGCTCT

3781 TGATCCGGCA AACAAACCAC CGCTGGTAGC GGTGGTTTTT TTGTTTGCAA GCAGCAGATT

3841 ACGCGCAGAA AAAAAGGATC TCAAGAAGAT CCTTTGATCT TTTCTACGGG GTCTGACGCT

3901 CAGTGGAACG AAAACTCACG TTAAGGGATT TTGGTCATGA GATTATCAAA AAGGATCTTC

3961 ACCTAGATCC TTTTAAATTA AAAATGAAGT TTTAAATCAA TCTAAAGTAT ATATGAGTAA

4021 ACTTGGTCTG ACAGTTACCA ATGCTTAATC AGTGAGGCAC CTATCTCAGC GATCTGTCTA

4081 TTTCGTTCAT CCATAGTTGC CTGACTCCCC GTCGTGTAGA TAACTACGAT ACGGGAGGGC

4141 TTACCATCTG GCCCCAGTGC TGCAATGATA CCGCGAGAAC

CACGCTCACC GGCTCCAGAT
4201 TTATCAGCAA TAAACCAGCC AGCCGGAAGG GCCGAGCGCA GAAGTGGTCC TGCAACTTTA
4261 TCCGCCTCCA TCCAGTCTAT TAATTGTTGC CGGGAAGCTA GAGTAAGTAG TTCGCCAGTT
4321 AATAGTTTGC GCAACGTTGT TGCCATTGCT ACAGGCATCG TGGTGTCACG CTCGTCGTTT
4381 GGTATGGCTT CATTCAGCTC CGGTTCCCAA CGATCAAGGC GAGTTACATG ATCCCCCATG
4441 TTGTGCAAAA AAGCGGTTAG CTCCTTCGGT CCTCCGATCG TTGTCAGAAG TAAGTTGGCC
4501 GCAGTGTTAT CACTCATGGT TATGGCAGCA CTGCATAATT CTCTTACTGT CATGCCATCC
4561 GTAAGATGCT TTTCTGTGAC TGGTGAGTAC TCAACCAAGT CATTCTGAGA ATAGTGTATG
4621 CGGCGACCGA GTTGCTCTTG CCCGGCGTCA ATACGGGATA ATACCGCGCC ACATAGCAGA
4681 ACTTTAAAAG TGCTCATCAT TGGAAAACGT TCTTCGGGGC GAAAACTCTC AAGGATCTTA
4741 CCGCTGTTGA GATCCAGTTC GATGTAACCC ACTCGTGCAC CCAACTGATC TTCAGCATCT
4801 TTTACTTTCA CCAGCGTTTC TGGGTGAGCA AAAACAGGAA GGCAAAATGC CGCAAAAAAG
4861 GGAATAAGGG CGACACGGAA ATGTTGAATA CTCATACTCT TCCTTTTTCA ATATTATTGA
4921 AGCATTTATC AGGGTTATTG TCTCATGAGC GGATACATAT TTGAATGTAT TTAGAAAAAT
4981 AAACAAATAG GGGTTCCGCG CACATTTCCC CGAAAAGTGC CAC
Sequência de ácido nucleico do plasmídeo E3L-FRT mCherry Kan (SEQ ID

NO: 31)

ATAGCGTCCCTAGGACGAACTACTGCCATTAATATCTCTATTATAGCTTCTG
GACATAATTCATCTATTATACCAGAATTAATGGGAACTATTCCGTATCTATC
TAACATAGTTTTAAGAAAGTCAGAATCTAAGACCTGATGTTCATATATTGGT
TCATACATGAAATGATCTCTATTGATGATAGTGACTATTTCATTCTCTGAAA
ATTGGTAACTCATTCTATATATGCTTTCCTTGTTGATGAAGGATAGAATATA
CTCAATAGAATTTGTACCAACAAACTGTTCTCTTATGAATCGTATATCATCA
TCTGAAATAATCATGTAAGGCATACATTTAACAATTAGAGACTTGTCTCCTG
TTATCAATATACTATTCTTGTGATAATTTATGTGTGAGGCAAATTTGTCCAC
GTTCTTTAATTTTGTTATAGTAGATATCAAATCCAATGGAGCTACAGTTCTT
GGCTTAAACAGATATAGTTTTTCTGGAACGAATTCTACAACATTATTATAAA
GGACTTTGGGTAGATAAGTGGGATGAAATCCTATTTTAATTAATGCGATAG
CCTTGTCCTCGTGCAGATATCCAAACGCTTTTGTGATAGTATGGCATTCATT
GTCTAGAAACGCTCTACGAATATCTGTGACAGATATCATCTTTAGAGAATAT
ACTAGTCGCGTTAATAGTACTACAATTTGTATTTTTTAATCTATCTCAATAAA
AAAATTAATATGTATGATTCAATGTATAACTAAACTACTAACTGTTATTGATA
ACTAGAATCAGAATCTAATGATGACGTAACCAAGCTAGCGCGGTTAACCGC
CTTTTTATCCATCAGGTGATCTGTTTTTATTGTGGAGTCTAGAACTAGTGGA
TCCCCCGGGCTGCAGGAATTCGATATCAAGCTCAGGCCTAGATCTGTCGA
CTTCGAGCTTATTTATATTCCAAAAAAAAAAAATAAAATTTCAATTTTTAAGC
TTTTGAAGTTCCTATACTTTCTAGAGAATAGGAACTTCCACTAATTCCAAAC
CCACCCGCTTTTTATAGTAAGTTTTTCACCCATAAATAATAAATACAATAATT
AATTTCTCGTAAAAGTAGAAAATATATTCTAATTTATTGCACGGTAAGGAAG
TAGATCATAACTCGAGGAATTGGGGATCTCTATAATCTCGCGCAACCTATT
TTCCCCTCGAACACTTTTTAAGCCGTAGATAAACAGGCTGGGACACTTCAC
ACGCGTATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGGATAACATGGCCATCATCAAGG
AGTTCATGCGCTTCAAGGTGCACATGGAGGGCTCCGTGAACGGCCACGA
GTTCGAGATCGAGGGCGAGGGCGAGGGCCGCCCCTACGAGGGCACCCA
GACCGCCAAGCTGAAGGTGACCAAGGGTGGCCCCCTGCCCTTCGCCTGG

GACATCCTGTCCCCTCAGTTCATGTACGGCTCCAAGGCCTACGTGAAGCA
CCCCGCCGACATCCCCGACTACTTGAAGCTGTCCTTCCCCGAGGGCTTCA
AGTGGGAGCGCGTGATGAACTTCGAGGACGGCGGCGTGGTGACCGTGAC
CCAGGACTCCTCCCTGCAGGACGGCGAGTTCATCTACAAGGTGAAGCTGC
GCGGCACCAACTTCCCCTCCGACGGCCCCGTAATGCAGAAGAAGACCATG
GGCTGGGAGGCCTCCTCCGAGCGGATGTACCCCGAGGACGGCGCCCTGA
AGGGCGAGATCAAGCAGAGGCTGAAGCTGAAGGACGGCGGCCACTACGA
CGCTGAGGTCAAGACCACCTACAAGGCCAAGAAGCCCGTGCAGCTGCCC
GGCGCCTACAACGTCAACATCAAGTTGGACATCACCTCCCACAACGAGGA
CTACACCATCGTGGAACAGTACGAACGCGCCGAGGGCCGCCACTCCACC
GGCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAATGAAGTTCCTATACTTTCTAGAGA
ATAGGAACTTCCGGTTAACCGGTGATATAGGCAACCAGCAATAAAACTAAT
TTATTTTATCATTTTTTTATTCATCATCCTCTGGTGGTTCGTCGTTTCTATCG
AATGTGGATCTGATTAACCCGTCATCTATAGGTGATGCTGGTTCTGGAGAT
TCTGGAGGAGATGGATTATTATCTGGAAGAATCTCTGTTATTTCCTTGTTTT
CATGTATCGATTGCGTTGTAACATTAAGATTGCGAAATGCTCTAAATTTGGG
AGGCTTAAAGTGTTGTTTGCAATCTCTACACGCATGTCTAACTAGTGGAGG
TTCGTCAGCGGCTCTAGTTTGAATCATCATCGGCGTAGTATTCCTACTTTTA
CAGTTAGGACACGGTGTATTGTATTTCTCGTCGAGAACGTTAAAATAATCG
TTGTAACTCACATCCTTTATTTTATCTATATTGTATTCTACTCCTTTCTTAATG
CATTTTATACCGAATAAGAGATAGCGAAGGAATTCTTTTTCGGTGCCGCTA
GTACCCTTAATCATATCACATAGTGTTTTATATTCCAAATTTGTGGCAATAG
ACGGTTTATTTCTATACGATAGTTTGTTTCTGGAATCCTTTGAGTATTCTATA
CCAATATTATTCTTTGATTCGAATTTAGTTTCTTCGATATTAGATTTTGTATT
ACCTATATTCTTGATGTAGTACTTTGATGATTTTTCCATGGCCCATTCTATC
ACGTAGAAAGCCAGTCCGCAGAAACGGTGCTGACCCCGGATGAATGTCAG
CTACTGGGCTATCTGGACAAGGGAAAACGCAAGCGCAAAGAGAAAGCAGG
TAGCTTGCAGTGGGCTTACATGGCGATAGCTAGACTGGGCGGTTTTATGG
ACAGCAAGCGAACCGGAATTGCCAGCTGGGGCGCCCTCTGGTAAGGTTG

GGAAGCCCTGCAAAGTAAACTGGATGGCTTTCTCGCCGCCAAGGATCTGA
TGGCGCAGGGGATCAAGCTCTGATCAAGAGACAGGATGAGGATCGTTTCG
CATGATTGAACAAGATGGATTGCACGCAGGTTCTCCGGCCGCTTGGGTGG
AGAGGCTATTCGGCTATGACTGGGCACAACAGACAATCGGCTGCTCTGAT
GCCGCCGTGTTCCGGCTGTCAGCGCAGGGGCGCCCGGTTCTTTTTGTCAA
GACCGACCTGTCCGGTGCCCTGAATGAACTGCAAGACGAGGCAGCGCGG
CTATCGTGGCTGGCCACGACGGGCGTTCCTTGCGCAGCTGTGCTCGACG
TTGTCACTGAAGCGGGAAGGGACTGGCTGCTATTGGGCGAAGTGCCGGG
GCAGGATCTCCTGTCATCTCACCTTGCTCCTGCCGAGAAAGTATCCATCAT
GGCTGATGCAATGCGGCGGCTGCATACGCTTGATCCGGCTACCTGCCCAT
TCGACCACCAAGCGAAACATCGCATCGAGCGAGCACGTACTCGGATGGAA
GCCGGTCTTGTCGATCAGGATGATCTGGACGAAGAGCATCAGGGGCTCG
CGCCAGCCGAACTGTTCGCCAGGCTCAAGGCGAGCATGCCCGACGGCGA
GGATCTCGTCGTGACCCATGGCGATGCCTGCTTGCCGAATATCATGGTGG
AAAATGGCCGCTTTTCTGGATTCATCGACTGTGGCCGGCTGGGTGTGGCG
GACCGCTATCAGGACATAGCGTTGGCTACCCGTGATATTGCTGAAGAGCT
TGGCGGCGAATGGGCTGACCGCTTCCTCGTGCTTTACGGTATCGCCGCTC
CCGATTCGCAGCGCATCGCCTTCTATCGCCTTCTTGACGAGTTCTTCTGAA
TTATTAACGCTTACAATTTCCTGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTG
CGGTATTTCACACCGCATACAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGG
AACCCCTATTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAG
GATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAA
AAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTTTGCCGGATCAAGAGCTACCAA
CTCTTTTTCCGAAGGTAACTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTG
TCCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCAC
CGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGT
GGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGA
TAAGGCGCAGCGGTCGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGC
TTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATG

AGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTA AGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGA AACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAG CGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGC CAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGGCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCA CATGTTCTTTCCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGC CTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGC GAGTCA
Sequência de ácido nucleico do plasmídeo E5R-FRT GFP Kan (SEQ ID NO: 32) TAGTGGAGGTTCGTCAGCGGCTCTAGTTTGAATCATCATCGGCGTAGTATT CCTACTTTTACAGTTAGGACACGGTGTATTGTATTTCTCGTCGAGAACGTTA AAATAATCGTTGTAACTCACATCCTTTATTTTATCTATATTGTATTCTACTCC TTTCTTAATGCATTTTATACCGAATAAGAGATAGCGAAGGAATTCTTTTTCG GTGCCGCTAGTACCCTTAATCATATCACATAGTGTTTTATATTCCAAATTTG TGGCAATAGACGGTTTATTTCTATACGATAGTTTGTTTCTGGAATCCTTTGA GTATTCTATACCAATATTATTCTTTGATTCGAATTTAGTTTCTTCGATATTAG ATTTTGTATTACCTATATTCTTGATGTAGTACTTTGATGATTTTTCCATGGCC CATTCTATTAAGTCTTCCAAGTTGGCATCATCCACATATTGTGATAGTAATT CTCGGATATCAGTAGCGGCTACCGCCATTGATGTTTGTTCATTGGATGAGT AACTACTAATGTATACATTTTCCATTTATAACACTTATGTATTAACTTTGTTC ATTTATATTTTTTCATTATTATGTTGATATTAACAAAAGTGAATATAAGCTAG CGCGGTTAACCGCCTTTTTATCCATCAGGTGATCTGTTTTTATTGTGGAGT CTAGAACTAGTGGATCCCCCGGGCTGCAGGAATTCGATATCAAGCTCAGG CCTAGATCTGTCGACTTCGAGCTTATTTATATTCCAAAAAAAAAAAATAAAA TTTCAATTTTTAAGCTTTTGAAGTTCCTATACTTTCTAGAGAATAGGAACTTC CACTAATTCCAAACCCACCCGCTTTTTATAGTAAGTTTTTCACCCATAAATA ATAAATACAATAATTAATTTCTCGTAAAAGTAGAAAATATATTCTAATTTATT GCACGGTAAGGAAGTAGATCATAACTCGAGGAATTGGGGATCTCTATAATC

TCGCGCAACCTATTTTCCCCTCGAACACTTTTTAAGCCGTAGATAAACAGG
CTGGGACACTTCACACGCGTATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCAC
CGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCAC
AAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGC
TGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCC
ACCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCC
CGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCT
ACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACC
CGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGC
TGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCT
GGAGTACAACTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGA
AGAACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGC
AGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGCGACG
GCCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCAAGCTG
AGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGT
GACCGCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAATGAA
GTTCCTATACTTTCTAGAGAATAGGAACTTCCGGTTAACCGGTGATATTTCA
TCTTTCTCCAATACTAATTCAAATTGTTAAATTAATAATGGATAGTATAAATA
GTTATTAGTGATAAAATAGTAAAAATAATTATTAGAATAAGAGTGTAGTATCA
TAGATAACTCTCTTCTATAAAAATGGATTTTATTCGTAGAAAGTATCTTATAT
ACACAGTAGAAAATAATATAGATTTTTTAAAGGATGATACATTAAGTAAAGT
AAACAATTTTACCCTCAATCATGTACTAGCTCTCAAGTATCTAGTTAGCAAT
TTTCCTCAACACGTTATTACTAAGGATGTATTAGCTAATACCAATTTTTTTGT
TTTCATACATATGGTACGATGTTGTAAAGTGTACGAAGCGGTTTTACGACA
CGCATTTGATGCACCCACGTTGTACGTTAAAGCATTGACTAAGAATTATTTA
TCGTTTAGTAACGCAATACAATCGTACAAGGAAACCGTGCATAAACTAACA
CAAGATGAAAAATTTTTAGAGGTTGCCGAATACATGGACGAATTAGGAGAA
CTTATAGGCGTAAATTATGACTTAGTTCTTAATCCATTATTTCACGGAGGGG
AACCCATCAAAGATATGGAAATCATTTTTTTAAAACTGTTTAAGAAAACAGA

CTTCAAAGTTGTTAAAAAATTAAGTGTTATAAGATTACTTATTTGGGCTTACC
TAAGCAAGAAAGATACAGGTCACGTAGAAAGCCAGTCCGCAGAAACGGTG
CTGACCCCGGATGAATGTCAGCTACTGGGCTATCTGGACAAGGGAAAACG
CAAGCGCAAAGAGAAAGCAGGTAGCTTGCAGTGGGCTTACATGGCGATAG
CTAGACTGGGCGGTTTTATGGACAGCAAGCGAACCGGAATTGCCAGCTGG
GGCGCCCTCTGGTAAGGTTGGGAAGCCCTGCAAAGTAAACTGGATGGCTT
TCTCGCCGCCAAGGATCTGATGGCGCAGGGGATCAAGCTCTGATCAAGAG
ACAGGATGAGGATCGTTTCGCATGATTGAACAAGATGGATTGCACGCAGG
TTCTCCGGCCGCTTGGGTGGAGAGGCTATTCGGCTATGACTGGGCACAAC
AGACAATCGGCTGCTCTGATGCCGCCGTGTTCCGGCTGTCAGCGCAGGG
GCGCCCGGTTCTTTTTGTCAAGACCGACCTGTCCGGTGCCCTGAATGAAC
TGCAAGACGAGGCAGCGCGGCTATCGTGGCTGGCCACGACGGGCGTTCC
TTGCGCAGCTGTGCTCGACGTTGTCACTGAAGCGGGAAGGGACTGGCTG
CTATTGGGCGAAGTGCCGGGGCAGGATCTCCTGTCATCTCACCTTGCTCC
TGCCGAGAAAGTATCCATCATGGCTGATGCAATGCGGCGGCTGCATACGC
TTGATCCGGCTACCTGCCCATTCGACCACCAAGCGAAACATCGCATCGAG
CGAGCACGTACTCGGATGGAAGCCGGTCTTGTCGATCAGGATGATCTGGA
CGAAGAGCATCAGGGGCTCGCGCCAGCCGAACTGTTCGCCAGGCTCAAG
GCGAGCATGCCCGACGGCGAGGATCTCGTCGTGACCCATGGCGATGCCT
GCTTGCCGAATATCATGGTGGAAAATGGCCGCTTTTCTGGATTCATCGACT
GTGGCCGGCTGGGTGTGGCGGACCGCTATCAGGACATAGCGTTGGCTAC
CCGTGATATTGCTGAAGAGCTTGGCGGCGAATGGGCTGACCGCTTCCTCG
TGCTTTACGGTATCGCCGCTCCCGATTCGCAGCGCATCGCCTTCTATCGC
CTTCTTGACGAGTTCTTCTGAATTATTAACGCTTACAATTTCCTGATGCGGT
ATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTCACACCGCATACAGGTGGCAC
TTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTTCGTTCCACTGAGCGTCA
GACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGC
GTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGT
TTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACTGGCTTCAGC

AGAGCGCAGATACCAAATACTGTCCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCAC CACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTG TTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGA CTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCGGGCTGAACGGGG GGTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAG ATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAA AGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCAC GAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTCGGGT TTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGG CGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGG CTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTTCCTGCGTTATCCCCTGATTCT GTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCAG CCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCA
Sequência de ácido nucleico do plasmídeo C11L-FRT mCherry Kan (SEQ ID NO: 33) ATTGGAGACGTAACAATGTAGCGCATTGTTTCCTCGTCTATCTATATGTTTT GATAAGTTGTGACACGTTTCAATTTCTAGTTTTATTTTTTTGTACGTCACATC TTCATCCAGTAGACGACATAGAATACATGTGCAATCCATAGCTATTCTGGT GCTAATTATTCCTCATAAGATGATAAAAAGTGTAGTGAGAGAGCATGAAGG AGATTTAGTATTTAGCAGTGCGGATATGATCCAAGAGGGTGAGATAGTCGT TCTCGTTCAGAATCTTTCGCAGCATAAGTAGTATGTCGATATACTTATCGTT GAAGACTCTTCCAGAGACGATAGCTGATTGAGTACAAAGTCCAATGATTGC ACGAAGTTCTTCGGCGGTTTTCATGGAGTCATTTCTGATGAAACATTTAATG ATCTAAATTTCAGTTTATGTTTGTACCCCGTATTCATACTTAACAAATTGGTA TTACATACCATTAATAATGCAAGCATAAAAAATCGTTAGTAGATGTTTCTAA ATATAGGTTCCGTAAGCTAGCGCGGTTAACCGCCTTTTTATCCATCAGGTG ATCTGTTTTTATTGTGGAGTCTAGAACTAGTGGATCCCCCGGGCTGCAGGA ATTCGATATCAAGCTCAGGCCTAGATCTGTCGACTTCGAGCTTATTTATATT CCAAAAAAAAAAAATAAAATTTCAATTTTTAAGCTTTTGAAGTTCCTATACTT

TCTAGAGAATAGGAACTTCCACTAATTCCAAACCCACCCGCTTTTTATAGTA
AGTTTTTCACCCATAAATAATAAATACAATAATTAATTTCTCGTAAAAGTAGA
AAATATATTCTAATTTATTGCACGGTAAGGAAGTAGATCATAACTCGAGGAA
TTGGGGATCTCTATAATCTCGCGCAACCTATTTTCCCCTCGAACACTTTTTA
AGCCGTAGATAAACAGGCTGGGACACTTCACACGCGTATGGTGAGCAAGG
GCGAGGAGGATAACATGGCCATCATCAAGGAGTTCATGCGCTTCAAGGTG
CACATGGAGGGCTCCGTGAACGGCCACGAGTTCGAGATCGAGGGCGAGG
GCGAGGGCCGCCCCTACGAGGGCACCCAGACCGCCAAGCTGAAGGTGAC
CAAGGGTGGCCCCCTGCCCTTCGCCTGGGACATCCTGTCCCCTCAGTTCA
TGTACGGCTCCAAGGCCTACGTGAAGCACCCCGCCGACATCCCCGACTAC
TTGAAGCTGTCCTTCCCCGAGGGCTTCAAGTGGGAGCGCGTGATGAACTT
CGAGGACGGCGGCGTGGTGACCGTGACCCAGGACTCCTCCCTGCAGGAC
GGCGAGTTCATCTACAAGGTGAAGCTGCGCGGCACCAACTTCCCCTCCGA
CGGCCCCGTAATGCAGAAGAAGACCATGGGCTGGGAGGCCTCCTCCGAG
CGGATGTACCCCGAGGACGGCGCCCTGAAGGGCGAGATCAAGCAGAGGC
TGAAGCTGAAGGACGGCGGCCACTACGACGCTGAGGTCAAGACCACCTA
CAAGGCCAAGAAGCCCGTGCAGCTGCCCGGCGCCTACAACGTCAACATC
AAGTTGGACATCACCTCCCACAACGAGGACTACACCATCGTGGAACAGTA
CGAACGCGCCGAGGGCCGCCACTCCACCGGCGGCATGGACGAGCTGTAC
AAGTAATGAAGTTCCTATACTTTCTAGAGAATAGGAACTTCCGGTTCACTC
GACGAACTAAACTACCTATACAAGATATGGTTGTGCCATAATTTTTATAAAT
TTTTTTTATGAGTATTTTTACAAAAATGTATAAAGTGTATGTCTTATGTATATT
TATAAAAATGCTAAATATGCGATGTATCTATGTTATTTGTATTTATCTAAACA
ATACCTCTACCTCTAGATATTATACAAAAATTTTTTATTTCGGCATATTAAAG
TAAAATCTAGTTACCTTGAAAATGAATACAGTGGGTGGTTCCGTATCACCA
GTAAGAACATAATAGTCGAATACAGTATCCGATTGAGATTTTGCATACAATA
CTAGTCTAGAAAGAAATTTGTAATCATCTTCTGTGACGGGAGTCCATATATC
TGTATCATCGTCCCATGCTATATTCCTGTTATCATCATTAGTTAATGAAAATA
ACTCTCGTGCTTCAGAAAAGTCAAATATTGTATCCATACATACATCTCCAAA

ACTATCGCTTATACGTTTATCTTTAACGATACCTATACCTAGATGGTTATTTA
CTAACAGACATTTTCCAGATCTATTGACTATAACTCCTATAGTTTCCACATC
AACCAAGTAATGATCATCTATTGTTATATAACAATAACATAACTCTTTTCCGT
TTTTATCAGTATGTATATCTATATCAACGTCGTCGTTGTAGTGAGCTCCTTT
TCACGTAGAAAGCCAGTCCGCAGAAACGGTGCTGACCCCGGATGAATGTC
AGCTACTGGGCTATCTGGACAAGGGAAAACGCAAGCGCAAAGAGAAAGCA
GGTAGCTTGCAGTGGGCTTACATGGCGATAGCTAGACTGGGCGGTTTTAT
GGACAGCAAGCGAACCGGAATTGCCAGCTGGGGCGCCCTCTGGTAAGGT
TGGGAAGCCCTGCAAAGTAAACTGGATGGCTTTCTCGCCGCCAAGGATCT
GATGGCGCAGGGGATCAAGCTCTGATCAAGAGACAGGATGAGGATCGTTT
CGCATGATTGAACAAGATGGATTGCACGCAGGTTCTCCGGCCGCTTGGGT
GGAGAGGCTATTCGGCTATGACTGGGCACAACAGACAATCGGCTGCTCTG
ATGCCGCCGTGTTCCGGCTGTCAGCGCAGGGGCGCCCGGTTCTTTTTGTC
AAGACCGACCTGTCCGGTGCCCTGAATGAACTGCAAGACGAGGCAGCGC
GGCTATCGTGGCTGGCCACGACGGGCGTTCCTTGCGCAGCTGTGCTCGA
CGTTGTCACTGAAGCGGGAAGGGACTGGCTGCTATTGGGCGAAGTGCCG
GGGCAGGATCTCCTGTCATCTCACCTTGCTCCTGCCGAGAAAGTATCCAT
CATGGCTGATGCAATGCGGCGGCTGCATACGCTTGATCCGGCTACCTGCC
CATTCGACCACCAAGCGAAACATCGCATCGAGCGAGCACGTACTCGGATG
GAAGCCGGTCTTGTCGATCAGGATGATCTGGACGAAGAGCATCAGGGGCT
CGCGCCAGCCGAACTGTTCGCCAGGCTCAAGGCGAGCATGCCCGACGGC
GAGGATCTCGTCGTGACCCATGGCGATGCCTGCTTGCCGAATATCATGGT
GGAAAATGGCCGCTTTTCTGGATTCATCGACTGTGGCCGGCTGGGTGTGG
CGGACCGCTATCAGGACATAGCGTTGGCTACCCGTGATATTGCTGAAGAG
CTTGGCGGCGAATGGGCTGACCGCTTCCTCGTGCTTTACGGTATCGCCGC
TCCCGATTCGCAGCGCATCGCCTTCTATCGCCTTCTTGACGAGTTCTTCTG
AATTATTAACGCTTACAATTTCCTGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTG
TGCGGTATTTCACACCGCATACAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGC
GGAACCCCTATTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAA

AGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACA
AAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTTTGCCGGATCAAGAGCTACC
AACTCTTTTTCCGAAGGTAACTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATAC
TGTCCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGC
ACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCA
GTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCG
GATAAGGCGCAGCGGTCGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCA
GCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTA
TGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGG
TAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGG
GAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTG
AGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAAC
GCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGGCTTTTGCTGGCCTTTTGCT
CACATGTTCTTTCCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACC
GCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCA
GCGAGTCA

[0454] Em algumas modalidades, o vírus MVAΔE5R manipulado é gerado pela inserção de um construto de expressão, como aqueles ilustrados por SEQ ID NOs: 22-24 e 32 (**Tabela 2**) na região genômica do MVA que corresponde à posição do locus E5R (*por exemplo*, posição 38.432 a 39.385 de SEQ ID NO: 1; ou posição 38.389 a 39.389 da sequência estabelecida no GenBank No. de Acesso AY603355). Em algumas modalidades, o vírus MVAΔE5R é adicionalmente projetado pela inserção de um construto de expressão, tal como ilustrado por SEQ ID NO: 31 na região genômica de MVA que corresponde ao locus E3L (*por exemplo*, posição 36, 931 a 37.497 da sequência estabelecida no GenBank No. de Acesso AY603355). Em algumas modalidades, o vírus MVAΔE5R é adicionalmente projetado pela inserção de um construto de expressão, tal como ilustrado por SEQ ID NO: 33 na região genômica de MVA que corresponde ao locus C11R (*por exemplo*, posição

4.160-4.785 da sequência estabelecida no GenBank No. de Acesso AY603355).

[0455] Um exemplo não limitativo de uma estrutura de leitura aberta de construto MVAΔK7R de acordo com a presente tecnologia é mostrado na SEQ ID NO: 25 (**Tabela 3**).

TABELA 3
Sequências de nucleotídeos exemplares para as estruturas de leitura aberta dos construtos de MVAΔK7R recombinantes da presente tecnologia.
Sequência de ácido nucleico do vetor pUC57-MVA-ΔK7R-mCherry (SEQ ID NO: 25) 1 TCGCGCGTTT CGGTGATGAC GGTGAAAACC TCTGACACAT GCAGCTCCCG GAGACGGTCA 61 CAGCTTGTCT GTAAGCGGAT GCCGGGAGCA GACAAGCCCG TCAGGGCGCG TCAGCGGGTG 121 TTGGCGGGTG TCGGGGCTGG CTTAACTATG CGGCATCAGA GCAGATTGTA CTGAGAGTGC 181 ACCATATGCG GTGTGAAATA CCGCACAGAT GCGTAAGGAG AAAATACCGC ATCAGGCGCC 241 ATTCGCCATT CAGGCTGCGC AACTGTTGGG AAGGGCGATC GGTGCGGGCC TCTTCGCTAT 301 TACGCCAGCT GGCGAAAGGG GGATGTGCTG CAAGGCGATT AAGTTGGGTA ACGCCAGGGT 361 TTTCCCAGTC ACGACGTTGT AAAACGACGG CCAGTGAATT Cttgctgtaa acaagtttgg 421 attatcgtaa gaggctagta tagaaattgt tgctcccatg gaatgaccca ataagtagat 481 ttaatagtta ccacgtgctg taccaaagtc atcaatcatc atttttttcac cattacttct 541 tccatgtcca atatgatcat gtgagaatac taaaattcct aacgatgata tgttttcagc 601 tagttcgtca taacgtccag aatgtttacc agctccatga cttatgaata ctaatgcctt 661 aggatatgta atcattgtcc agattgaaca tacagtttgc actcatgatt cacgttatat

721 aactatcaat attaacagtt cgtttgatga tcatattatt tttatgtttt attgataatt
781 gtaaaaacat acaattaaat caatatagag gaaggagacg gctactgtct tttgtgagat
841 agtcgatatc tcactaattc caaacccacc cgctttttat agtaagtttt tcacccataa
901 ataataaata caataattaa tttctcgtaa aagtagaaaa tatattctaa tttattgcac
961 ggtaaggaag tagatcataa ctcgacatgg tgagcaaggg cgaggaggat aacatggcca
1021 tcatcaagga gttcatgcgc ttcaaggtgc acatggaggg ctccgtgaac ggccacgagt
1081 tcgagatcga gggcgagggc gagggccgcc cctacgaggg cacccagacc gccaagctga
1141 aggtgaccaa gggtggcccc ctgcccttcg cctgggacat cctgtcccct cagttcatgt
1201 acggctccaa ggcctacgtg aagcaccccg ccgacatccc cgactacttg aagctgtcct
1261 tccccgaggg cttcaagtgg gagcgcgtga tgaacttcga ggacggcggc gtggtgaccg
1321 tgacccagga ctcctccctg caggacggcg agttcatcta caaggtgaag ctgcgcggca
1381 ccaacttccc ctccgacggc cccgtaatgc agaagaagac catgggctgg gaggcctcct
1441 ccgagcggat gtaccccgag gacggcgccc tgaagggcga gatcaagcag aggctgaagc
1501 tgaaggacgg cggccactac gacgctgagg tcaagaccac ctacaaggcc aagaagcccg
1561 tgcagctgcc cggcgcctac aacgtcaaca tcaagttgga catcacctcc cacaacgagg
1621 actacaccat cgtggaacag tacgaacgcg ccgagggccg ccactccacc ggcggcatgg
1681 acgagctGAT CACGAATTgt taactgatat aggggtcttc ataacgcata attattacgt
1741 tagcattcta tatccgtgtt aaaaaaaatt atcctatcat gtatttgaga gttttatatg
1801 tagcaaacat gatagctgtg atgccaataa gctttagata ttcacgcgtg ctagtgttag
1861 ggatggtatt atctggtggt gaaatgtccg ttatataatc tacaaaacaa tcatcgcata
1921 tagtatgcga tagtagagta aacattttta tagtttttac tggattcata catcgtctac
1981 ccaattcggt tatgaatgaa attgtcgcca atcttacacc caacccctttg ttatccatta
2041 gtatagtatt aacttcgtta tttatgtcat aaactgtaaa tgattttgta gatgccatat
2101 catacatgat attcatgtcc ctattataat cAAGCTTGGC GTAATCATGG TCATAGCTGT
2161 TTCCTGTGTG AAATTGTTAT CCGCTCACAA TTCCACACAA CATACGAGCC GGAAGCATAA
2221 AGTGTAAAGC CTGGGGTGCC TAATGAGTGA GCTAACTCAC ATTAATTGCG TTGCGCTCAC

2281 TGCCCGCTTT CCAGTCGGGA AACCTGTCGT GCCAGCTGCA TTAATGAATC GGCCAACGCG

2341 CGGGGAGAGG CGGTTTGCGT ATTGGGCGCT CTTCCGCTTC CTCGCTCACT GACTCGCTGC

2401 GCTCGGTCGT TCGGCTGCGG CGAGCGGTAT CAGCTCACTC AAAGGCGGTA ATACGGTTAT

2461 CCACAGAATC AGGGGATAAC GCAGGAAAGA ACATGTGAGC AAAAGGCCAG CAAAAGGCCA

2521 GGAACCGTAA AAAGGCCGCG TTGCTGGCGT TTTTCCATAG GCTCCGCCCC CCTGACGAGC

2581 ATCACAAAAA TCGACGCTCA AGTCAGAGGT GGCGAAACCC GACAGGACTA TAAAGATACC

2641 AGGCGTTTCC CCCTGGAAGC TCCCTCGTGC GCTCTCCTGT TCCGACCCTG CCGCTTACCG

2701 GATACCTGTC CGCCTTTCTC CCTTCGGGAA GCGTGGCGCT TTCTCATAGC TCACGCTGTA

2761 GGTATCTCAG TTCGGTGTAG GTCGTTCGCT CCAAGCTGGG CTGTGTGCAC GAACCCCCCG

2821 TTCAGCCCGA CCGCTGCGCC TTATCCGGTA ACTATCGTCT TGAGTCCAAC CCGGTAAGAC

2881 ACGACTTATC GCCACTGGCA GCAGCCACTG GTAACAGGAT TAGCAGAGCG AGGTATGTAG

2941 GCGGTGCTAC AGAGTTCTTG AAGTGGTGGC CTAACTACGG CTACACTAGA AGAACAGTAT

3001 TTGGTATCTG CGCTCTGCTG AAGCCAGTTA CCTTCGGAAA AAGAGTTGGT AGCTCTTGAT

3061 CCGGCAAACA AACCACCGCT GGTAGCGGTG GTTTTTTTGT TTGCAAGCAG CAGATTACGC

3121 GCAGAAAAAA AGGATCTCAA GAAGATCCTT TGATCTTTTC

TACGGGGTCT GACGCTCAGT

3181 GGAACGAAAA CTCACGTTAA GGGATTTTGG TCATGAGATT ATCAAAAAGG ATCTTCACCT

3241 AGATCCTTTT AAATTAAAAA TGAAGTTTTA AATCAATCTA AAGTATATAT GAGTAAACTT

3301 GGTCTGACAG TTACCAATGC TTAATCAGTG AGGCACCTAT CTCAGCGATC TGTCTATTTC

3361 GTTCATCCAT AGTTGCCTGA CTCCCCGTCG TGTAGATAAC TACGATACGG GAGGGCTTAC

3421 CATCTGGCCC CAGTGCTGCA ATGATACCGC GAGACCCACG CTCACCGGCT CCAGATTTAT

3481 CAGCAATAAA CCAGCCAGCC GGAAGGGCCG AGCGCAGAAG TGGTCCTGCA ACTTTATCCG

3541 CCTCCATCCA GTCTATTAAT TGTTGCCGGG AAGCTAGAGT AAGTAGTTCG CCAGTTAATA

3601 GTTTGCGCAA CGTTGTTGCC ATTGCTACAG GCATCGTGGT GTCACGCTCG TCGTTTGGTA

3661 TGGCTTCATT CAGCTCCGGT TCCCAACGAT CAAGGCGAGT TACATGATCC CCCATGTTGT

3721 GCAAAAAAGC GGTTAGCTCC TTCGGTCCTC CGATCGTTGT CAGAAGTAAG TTGGCCGCAG

3781 TGTTATCACT CATGGTTATG GCAGCACTGC ATAATTCTCT TACTGTCATG CCATCCGTAA

3841 GATGCTTTTC TGTGACTGGT GAGTACTCAA CCAAGTCATT CTGAGAATAG TGTATGCGGC

3901 GACCGAGTTG CTCTTGCCCG GCGTCAATAC GGGATAATAC CGCGCCACAT AGCAGAACTT

3961 TAAAAGTGCT CATCATTGGA AAACGTTCTT CGGGGCGAAA ACTCTCAAGG ATCTTACCGC

4021 TGTTGAGATC CAGTTCGATG TAACCCACTC GTGCACCCAA CTGATCTTCA GCATCTTTTA
4081 CTTTCACCAG CGTTTCTGGG TGAGCAAAAA CAGGAAGGCA AAATGCCGCA AAAAAGGGAA
4141 TAAGGGCGAC ACGGAAATGT TGAATACTCA TACTCTTCCT TTTTCAATAT TATTGAAGCA
4201 TTTATCAGGG TTATTGTCTC ATGAGCGGAT ACATATTTGA ATGTATTTAG AAAAATAAAC
4261 AAATAGGGGT TCCGCGCACA TTTCCCCGAA AAGTGCCACC TGACGTCTAA GAAACCATTA
4321 TTATCATGAC ATTAACCTAT AAAAATAGGC GTATCACGAG GCCCTTTCGT C

VACVΔC7L

[0456] A divulgação da presente tecnologia se refere a um vírus vaccinia mutante C7L (*ou seja*, VACVΔC7L; VACV compreendendo uma deleção C7L; VACV geneticamente modificado para compreender um gene C7L mutante), ou composições imunogênicas compreendendo o vírus, em que o vírus é modificado para expressar um ou mais genes específicos de interesse (SG), como OX40L, e seu uso como imunoterápico contra o câncer (VACVΔC7L-OX40L). Em algumas modalidades, o gene C7 do vírus vaccinia, por meio de técnicas de recombinação homóloga, é projetado para conter uma interrupção que compreende uma sequência de ácido nucleico heteróloga compreendendo um ou mais cassetes de expressão, que resultam em um nocaute C7 de modo que o gene C7 não seja expresso, expressa em níveis tão baixos que não têm efeito, ou a proteína expressa não é funcional (*por exemplo*, é uma mutação nula). Em algumas modalidades, o mutante ΔC7L inclui uma sequência de ácido nucleico heterólogo no lugar de toda ou a maioria da sequência do gene C7L. Por exemplo, em algumas modalidades a sequência de ácido nucleico correspondente à posição de C7 no genoma de VACV (*por exemplo*, posição 15.716 to 16.168 de SEQ ID NO: 2) é substituído

por uma sequência de ácido nucleico heterólogo compreendendo uma estrutura de leitura aberta que codifica um gene específico de interesse (SG), como OX40L humano, resultando em VACVΔC7L-OX40L. Em algumas modalidades, o cassete de expressão compreende uma única estrutura de leitura aberta que codifica hFlt3L, resultando em VACVΔC7L-hFlt3L.

[0457] Adicionalmente ou alternativamente, em algumas modalidades, VACVΔC7L é manipulado para expressar OX40L e hFlt3L. Em algumas modalidades, o gene da timidina quinase (TK) do vírus vaccinia (*por exemplo*, posição 80.962 a 81.032 da SEQ ID NO: 2), por meio de recombinação homóloga, é projetada para conter uma interrupção compreendendo uma sequência de ácido nucleico heterólogo compreendendo uma ou mais cassetes de expressão, o que resulta em um nocaute do gene TK de modo que o gene TK não seja expresso, expresso em níveis tão baixos a ponto de ter nenhum efeito, ou a proteína expressa não é funcional (*por exemplo*, é uma mutação nula). O vírus VACVΔC7L-TK(-) resultante é ainda modificado para compreender uma ou mais cassetes de expressão que são flanqueados por uma sequência parcial do gene TK (TK-L e TK-R) em ambos os lados. Em algumas modalidades, o cassete de expressão compreende uma única estrutura de leitura aberta que codifica um gene específico de interesse (SG), como OX40L usando o promotor precoce e tardio sintético viral de vaccinia (PsE/L), resultando em VACVΔC7L-TK(-)-OX40L. Em algumas modalidades, o vírus recombinante é ainda modificado no locus C7, por meio de técnicas de recombinação homóloga, para conter uma interrupção que compreende uma sequência de ácido nucleico heterólogo compreendendo um ou mais cassetes de expressão, que resultam em um nocaute de C7 de modo que o gene C7 não seja expresso, expresso em níveis tão baixos que não têm efeito, ou a proteína expressa não é funcional (*por exemplo*, é uma mutação nula). Em algumas modalidades, o cassete de expressão compreende uma única estrutura de leitura aberta que codifica um gene específico de interesse (SG), como hFlt3L, resultando em VACVΔC7L-hFlt3L-TK(-)-OX40L. Em

algumas modalidades, o cassete de expressão que codifica OX40L é inserido no locus C7, enquanto o cassete de expressão que codifica hFlt3L é inserido no locus TK. Em algumas modalidades, um vírus VACVΔC7L-anti-CTLA-4-hFlt3L-TK(-) é ainda modificado para codificar OX40L, resultando em VACVΔC7L-anti-CTLA-4-TK(-)-hFlt3L-OX40L. Em algumas modalidades, o vírus VACVΔC7L-anti-CTLA-4-TK(-)-hFlt3L-OX40L é ainda modificado para expressar hIL-12, resultando em VACVΔC7L-anti-CTLA-4-TK(-)-hFlt3L-OX40L-hIL-12.

[0458] Adicionalmente ou alternativamente, em algumas modalidades, a sequência de ácido nucleico heterólogo compreende um cassete de expressão compreendendo duas ou mais estruturas de leitura aberta que codificam dois ou mais genes específicos de interesse, separados por uma sequência de nucleotídeos que codifica, na direção 5’ para 3', um sítio de clivagem de protease (*por exemplo*, um sítio de clivagem de furina) e uma sequência de peptídeo 2A (Pep2A).

[0459] Em algumas modalidades, a divulgação da presente tecnologia fornece um vírus VVACVΔC7L-TK(-)-anti-CTLA-4-OX40L. Em algumas modalidades, a divulgação da presente tecnologia fornece um vírus VACVΔC7L-E3LΔ83N-TK(-)-hFlt3L-anti-CTLA-4-OX40L.

[0460] Em algumas modalidades, os vírus VACVΔC7L-OX40L recombinantes descrito acima são modificados para expressar pelo menos um outro gene heterólogo, tal como qualquer um ou mais de hFlt3L, hIL-2, hIL-12, hIL-15, hIL-15/IL-15Rα, hIL-18, hIL-21, anti-huCTLA-4, anti-huPD-1, anti-huPD-L1, GITRL, 4-1BBL, ou CD40L e/ou incluir pelo menos uma outra mutação ou deleção de gene viral, como qualquer uma ou mais dentre as seguintes deleções: E3L (ΔE3L); E3LΔ83N; B2R (ΔB2R), B19R (B18R; ΔWR200); E5R; K7R; C12L (IL18BP); B8R; B14R; N1L; C11R; K1L; M1L; N2L; e/ou WR199. Em outras modalidades, nenhum outro gene heterólogo é adicionado além daqueles fornecidos no nome do vírus aqui (*por exemplo*, OX40L ou OX40L e

hFlt3L), e/ou nenhum outro gene viral diferente de C7L ou C7L e TK são interrompidos ou deletados.

[0461] Embora em certas modalidades descritas acima, o transgene possa ser inserido no locus TK, dividindo o gene TK e obliterando-o, outros loci de integração adequados podem ser selecionados. Por exemplo, VACV codifica vários genes imunomoduladores, incluindo, mas não se limitando a C11, K3, F1, F2, F4, F6, F8, F9, F11, F14.5, J2, A46, E3L, B18R (WR200), E5R, K7R, C12L, B8R, B14R, N1L, C11R, K1L, C16, M1L, N2L e WR199. Consequentemente, em algumas modalidades, esses genes podem ser deletados para aumentar as propriedades de ativação reações imunológicas do vírus e permitir a inserção de transgenes.

[0462] Em algumas modalidades, a sequência de nucleotídeos heterólogos compreende ainda um cassete de expressão adicional que compreende uma estrutura de leitura aberta que codifica um marcador selecionável operacionalmente ligado a um promotor que é capaz de dirigir a expressão do marcador selecionável. Em algumas modalidades, o marcador selecionável é um gene da xantina-guanina fosforibosil transferase (gpt). Em algumas modalidades, o marcador selecionável é um gene de proteína fluorescente verde (GFP). Em algumas modalidades, o marcador selecionável é um gene mCherry que codifica uma proteína fluorescente vermelha.

VACVΔE5R

[0463] A divulgação da presente tecnologia se refere a um vírus vaccinia mutante E5R (*ou seja*, VACVΔE5R; VACV compreendendo uma deleção E5R; VACV geneticamente modificado para compreender um gene E5R mutante), ou composições imunogênicas compreendendo o vírus, em que o vírus é modificado para expressar um ou mais genes específicos de interesse (SG), como OX40L, e seu uso como imunoterápico contra o câncer (VACVΔE5R-OX40L). Em algumas modalidades, o gene E5R do vírus vaccinia, por meio de técnicas de recombinação homóloga, é projetado para conter uma interrupção que compreende uma sequência de ácido nucleico heteróloga

compreendendo um ou mais cassetes de expressão, que resultam em um nocaute E5R de modo que o gene E5R não seja expresso, expressa em níveis tão baixos que não têm efeito, ou a proteína expressa não é funcional (*por exemplo*, é uma mutação nula). Em algumas modalidades, o mutante ΔE5R inclui uma sequência de ácido nucleico heterólogo no lugar de toda ou a maioria da sequência do gene E5R. Por exemplo, em algumas modalidades a sequência de ácido nucleico correspondente à posição de E5R no genoma de VACV (*por exemplo*, posição 49.236 to 50.261 de SEQ ID NO: 2) é substituído por uma sequência de ácido nucleico heterólogo compreendendo uma estrutura de leitura aberta que codifica um gene específico de interesse (SG), como OX40L humano, resultando em VACVΔE5R-OX40L. Em algumas modalidades, o cassete de expressão compreende uma única estrutura de leitura aberta que codifica hFlt3L, resultando em VACVΔE5R-hFlt3L.

[0464] Adicionalmente ou alternativamente, em algumas modalidades, VACVΔE5R é manipulado para expressar OX40L e hFlt3L. Em algumas modalidades, o gene da timidina quinase (TK) do vírus vaccinia (*por exemplo*, posição 80.962 a 81.032 da SEQ ID NO: 2), por meio de recombinação homóloga, é projetada para conter uma interrupção compreendendo uma sequência de ácido nucleico heterólogo compreendendo uma ou mais cassetes de expressão, o que resulta em um nocaute do gene TK de modo que o gene TK não seja expresso, expresso em níveis tão baixos a ponto de ter nenhum efeito, ou a proteína expressa não é funcional (*por exemplo*, é uma mutação nula). O vírus VACVΔE5R-TK(-) resultante é ainda modificado para compreender uma ou mais cassetes de expressão que são flanqueados por uma sequência parcial do gene TK (TK-L e TK-R) em ambos os lados. Em algumas modalidades, o cassete de expressão compreende uma única estrutura de leitura aberta que codifica um gene específico de interesse (SG), como OX40L usando o promotor precoce e tardio sintético viral de vaccinia (PsE/L), resultando em VACVΔE5R-TK(-)-OX40L. Em algumas modalidades, o vírus recombinante é ainda modificado no locus E5R, por meio

de técnicas de recombinação homóloga, para conter uma interrupção que compreende uma sequência de ácido nucleico heterólogo compreendendo um ou mais cassetes de expressão, que resultam em um nocaute de E5R de modo que o gene E5R não seja expresso, expresso em níveis tão baixos que não têm efeito, ou a proteína expressa não é funcional (*por exemplo*, é uma mutação nula). Em algumas modalidades, o cassete de expressão compreende uma única estrutura de leitura aberta que codifica um gene específico de interesse (SG), como hFlt3L, resultando em VACVΔE5R-hFlt3L-TK(-)-OX40L. Em algumas modalidades, o cassete de expressão que codifica OX40L é inserido no locus E5R, enquanto o cassete de expressão que codifica hFlt3L é inserido no locus TK. Em algumas modalidades, um vírus VACVΔE5R-anti-CTLA-4-hFlt3L-TK(-) é ainda modificado para codificar OX40L, resultando em VACVΔE5R-anti-CTLA-4-TK(-)-hFlt3L-OX40L. Em algumas modalidades, o vírus VACVΔE5R-anti-CTLA-4-TK(-)-hFlt3L-OX40L é ainda modificado para expressar hIL-12, resultando em VACVΔE5R-anti-CTLA-4-TK(-)-hFlt3L-OX40L-hIL-12. Em algumas modalidades, o VACVΔE5R é modificado para compreender um ácido nucleico que codifica IL-15/IL-15Rα (VACVΔE5R-IL-15/IL-15Rα) sozinho ou em combinação com uma ou mais modificações adicionais, conforme descrito neste documento. Por exemplo, em algumas modalidades, o VACVΔE5R-IL-15/IL-15Rα é ainda modificado para compreender um ácido nucleico que codifica OX40L (VACVΔE5R-IL-15/IL-15Rα-OX40L).

[0465] Adicionalmente ou alternativamente, em algumas modalidades, a sequência de ácido nucleico heterólogo compreende um cassete de expressão compreendendo duas ou mais estruturas de leitura aberta que codificam dois ou mais genes específicos de interesse, separados por uma sequência de nucleotídeos que codifica, na direção 5’ para 3', um sítio de clivagem de protease (*por exemplo*, um sítio de clivagem de furina) e uma sequência de peptídeo 2A (Pep2A). Por exemplo, em algumas modalidades, o locus TK do genoma da vaccinia é modificado por meio de recombinação

homóloga para expressar ambas as cadeias pesada e leve de um anticorpo, tal como anti-CTLA-4, em que as sequências de codificação da cadeia pesada e leve são separadas por um cassete incluindo um sítio de clivagem de furina seguido por uma sequência de peptídeo 2A (Pep2A) para produzir VACV-TK(-)-anti-CTLA-4. Em algumas modalidades, o genoma de VACV-TK(-)-anti-CTLA-4 é ainda modificado para compreender uma deleção de E5R, em que toda ou a maioria da sequência do gene E5R é substituída por um primeiro gene específico de interesse (*por exemplo*, hFlt3L) e um segundo gene específico de interesse (*por exemplo*, OX40L), em que as sequências de codificação do primeiro e do segundo genes específicos de interesse são separadas por um cassete incluindo um sítio de clivagem de furina, seguido por uma sequência de peptídeo 2A (Pep2A), formando assim um vírus recombinante, como VACV-TK^{-}-anti-CTLA-4-E5R^{-}-hFlt3L-OX40L (or VACVΔE5R-TK(-)-anti-CTLA-4-hFlt3L-OX40L) (*Consulte, por exemplo*, **FIG. 85A**).

[0466] Em algumas modalidades, os vírus VACVΔE5R recombinantes geneticamente modificado descrito acima são modificados para expressar pelo menos um outro gene heterólogo, tal como qualquer um ou mais de hOX40L, hFlt3L, hIL-2, hIL-12, hIL-15, hIL-15/IL-15Rα, hIL-18, hIL-21, anti-huCTLA-4, anti-huPD-1, anti-huPD-L1, GITRL, 4-1BBL, ou CD40L, e/ou incluir pelo menos uma outra mutação ou deleção de gene viral, como qualquer uma ou mais dentre as seguintes deleções: E3L (ΔE3L); E3LΔ83N; C7 (ΔC7L); B2R (ΔB2R), B19R (B18R; ΔWR200); E5R; K7R; C12L (IL18BP); B8R; B14R; N1L; C11R; K1L; M1L; N2L; e/ou WR199. Em outras modalidades, nenhum outro gene heterólogo é adicionado além daqueles fornecidos no nome do vírus aqui (*por exemplo*, OX40L ou OX40L e hFlt3L), e/ou nenhum outro gene viral diferente de E5R ou E5R e TK são interrompidos ou deletados.

[0467] Embora em certas modalidades descritas acima, o transgene possa ser inserido no locus TK, dividindo o gene TK e obliterando-o, outros loci de integração adequados podem ser selecionados. Por exemplo, VACV codifica vários genes imunomoduladores, incluindo, mas não se limitando a C7,

C11, K3, F1, F2, F4, F6, F8, F9, F11, F14.5, J2, A46, E3L, B18R (WR200), E5R, K7R, C12L, B8R, B14R, N1L, C11R, K1L, C16, M1L, N2L, e WR199. Consequentemente, em algumas modalidades, esses genes podem ser deletados para aumentar as propriedades de ativação reações imunológicas do vírus e permitir a inserção de transgenes.

[0468] Em outras modalidades, nenhum outro gene heterólogo é adicionado além daqueles fornecidos no nome do vírus aqui (*por exemplo*, OX40L), e/ou nenhum outro gene viral diferente de E5R ou E5R e TK são interrompidos ou deletados.

[0469] Em algumas modalidades, a sequência de nucleotídeos heterólogos compreende ainda um cassete de expressão adicional que compreende uma estrutura de leitura aberta que codifica um marcador selecionável operacionalmente ligado a um promotor que é capaz de dirigir a expressão do marcador selecionável. Em algumas modalidades, o marcador selecionável é um gene da xantina-guanina fosforibosil transferase (gpt). Em algumas modalidades, o marcador selecionável é um gene de proteína fluorescente verde (GFP). Em algumas modalidades, o marcador selecionável é um gene mCherry que codifica uma proteína fluorescente vermelha.

[0470] Exemplos não limitativos de estruturas de leitura aberta de construto VACVΔE5R de acordo com a presente tecnologia são mostrados em SEQ ID NOs: 26-28 (**Tabela 4**).

TABELA 4
Sequências de nucleotídeos exemplares para as estruturas de leitura aberta dos construtos de VACVΔE5R recombinantes da presente tecnologia.
Sequência de ácido nucleico do vetor pUC57-VACV-ΔE5R-mCherry (SEQ ID NO: 26) 1 TCGCGCGTTT CGGTGATGAC GGTGAAAACC TCTGACACAT GCAGCTCCCG GAGACGGTCA 61 CAGCTTGTCT GTAAGCGGAT GCCGGGAGCA GACAAGCCCG

TCAGGGCGCG TCAGCGGGTG

121 TTGGCGGGTG TCGGGGCTGG CTTAACTATG CGGCATCAGA GCAGATTGTA CTGAGAGTGC

181 ACCATATGCG GTGTGAAATA CCGCACAGAT GCGTAAGGAG AAAATACCGC ATCAGGCGCC

241 ATTCGCCATT CAGGCTGCGC AACTGTTGGG AAGGGCGATC GGTGCGGGCC TCTTCGCTAT

301 TACGCCAGCT GGCGAAAGGG GGATGTGCTG CAAGGCGATT AAGTTGGGTA ACGCCAGGGT

361 TTTCCCAGTC ACGACGTTGT AAAACGACGG CCAGTGAATT CGAGCTCGGT ACCgagatag

421 cgaaggaatt ctttttcggt gccgctagta cccttaatca tatcacatag tgttttatat

481 tccaaatttg tggcaataga cggtttattt ctatacgata gtttgtttct ggaatccttt

541 gagtattcta taccaatatt attctttgat tcgaatttag tttcttcgat attagatttt

601 gtattaccta tattcttgat gtagtacttt gatgattttt ccatggccca ttctattaag

661 tcttccaagt tggcatcatc cacatattgt gatagtaatt ctcggatatc agtagcggtt

721 accgccattg atgtttgttc attggatgag taactactaa tgtatacatt ttccatttat

781 aacacttatg tattaacttt gttcatttat atttttcat tattaagctt gatcaggcct

841 tcactaattc caaacccacc cgctttttat agtaagtttt tcacccataa ataataaata

901 caataattaa tttctcgtaa aagtagaaaa tatattctaa tttattgcac ggtaaggaag

961 tagatcataa ctcgacatgg tgagcaaggg cgaggaggat aacatggcca tcatcaagga

1021 gttcatgcgc ttcaaggtgc acatggaggg ctccgtgaac ggccacgagt tcgagatcga

1081 gggcgagggc gagggccgcc cctacgaggg cacccagacc gccaagctga aggtgaccaa

1141 gggtggcccc ctgcccttcg cctgggacat cctgtcccct cagttcatgt acggctccaa

1201 ggcctacgtg aagcaccccg ccgacatccc cgactacttg aagctgtcct tccccgaggg

1261 cttcaagtgg gagcgcgtga tgaacttcga ggacggcggc gtggtgaccg tgacccagga

1321 ctcctccctg caggacggcg agttcatcta caaggtgaag ctgcgcggca ccaacttccc

1381 ctccgacggc cccgtaatgc agaagaagac catgggctgg gaggcctcct ccgagcggat

1441 gtaccccgag gacggcgccc tgaagggcga gatcaagcag aggctgaagc tgaaggacgg
1501 cggccactac gacgctgagg tcaagaccac ctacaaggcc aagaagcccg tgcagctgcc
1561 cggcgcctac aacgtcaaca tcaagttgga catcacctcc cacaacgagg actacaccat
1621 cgtggaacag tacgaacgcg ccgagggccg ccactccacc ggcggcatgg acgagctGAT
1681 CACGAATTgt taacctgcat ttcatctttc tccaatacta attcaaattg ttaaattaat
1741 aatggatagt ataaatagtt attagtgata aaatagtaaa aataattatt agaataagag
1801 tgtagtatca tagataactc tcttctataa aaatggattt tattcgtaga aagtatctta
1861 tatacacagt agaaaataat atagattttt taaaggatga tacattaagt aaagtaaaca
1921 attttaccct caatcatgta ctagctctca agtatctagt tagcaatttt cctcaacatg
1981 ttattactaa ggatgtatta gctaatacca atttttttgt tttcatacat atggtacgat
2041 gttgtaaagt gtacgaagcg gttttacgac acgcatttga tgcacccacg ttgtacgtta
2101 aagcattgac taagaattat tGGATCCCGG GCCCGTCGAC TGCAGAGGCC TGCATGCAAG
2161 CTTGGCGTAA TCATGGTCAT AGCTGTTTCC TGTGTGAAAT TGTTATCCGC TCACAATTCC
2221 ACACAACATA CGAGCCGGAA GCATAAAGTG TAAAGCCTGG GGTGCCTAAT GAGTGAGCTA
2281 ACTCACATTA ATTGCGTTGC GCTCACTGCC CGCTTTCCAG TCGGGAAACC TGTCGTGCCA
2341 GCTGCATTAA TGAATCGGCC AACGCGCGGG GAGAGGCGGT TTGCGTATTG GGCGCTCTTC
2401 CGCTTCCTCG CTCACTGACT CGCTGCGCTC GGTCGTTCGG CTGCGGCGAG CGGTATCAGC
2461 TCACTCAAAG GCGGTAATAC GGTTATCCAC AGAATCAGGG GATAACGCAG GAAAGAACAT
2521 GTGAGCAAAA GGCCAGCAAA AGGCCAGGAA CCGTAAAAAG GCCGCGTTGC TGGCGTTTTT
2581 CCATAGGCTC CGCCCCCCTG ACGAGCATCA CAAAAATCGA CGCTCAAGTC AGAGGTGGCG

2641 AAACCCGACA GGACTATAAA GATACCAGGC GTTTCCCCCT GGAAGCTCCC TCGTGCGCTC

2701 TCCTGTTCCG ACCCTGCCGC TTACCGGATA CCTGTCCGCC TTTCTCCCTT CGGGAAGCGT

2761 GGCGCTTTCT CATAGCTCAC GCTGTAGGTA TCTCAGTTCG GTGTAGGTCG TTCGCTCCAA

2821 GCTGGGCTGT GTGCACGAAC CCCCCGTTCA GCCCGACCGC TGCGCCTTAT CCGGTAACTA

2881 TCGTCTTGAG TCCAACCCGG TAAGACACGA CTTATCGCCA CTGGCAGCAG CCACTGGTAA

2941 CAGGATTAGC AGAGCGAGGT ATGTAGGCGG TGCTACAGAG TTCTTGAAGT GGTGGCCTAA

3001 CTACGGCTAC ACTAGAAGAA CAGTATTTGG TATCTGCGCT CTGCTGAAGC CAGTTACCTT

3061 CGGAAAAAGA GTTGGTAGCT CTTGATCCGG CAAACAAACC ACCGCTGGTA GCGGTGGTTT

3121 TTTTGTTTGC AAGCAGCAGA TTACGCGCAG AAAAAAAGGA TCTCAAGAAG ATCCTTTGAT

3181 CTTTTCTACG GGGTCTGACG CTCAGTGGAA CGAAAACTCA CGTTAAGGGA TTTTGGTCAT

3241 GAGATTATCA AAAAGGATCT TCACCTAGAT CCTTTTAAAT TAAAAATGAA GTTTTAAATC

3301 AATCTAAAGT ATATATGAGT AAACTTGGTC TGACAGTTAC CAATGCTTAA TCAGTGAGGC

3361 ACCTATCTCA GCGATCTGTC TATTTCGTTC ATCCATAGTT GCCTGACTCC CCGTCGTGTA

3421 GATAACTACG ATACGGGAGG GCTTACCATC TGGCCCCAGT GCTGCAATGA TACCGCGAGA

3481 CCCACGCTCA CCGGCTCCAG ATTTATCAGC AATAAACCAG

CCAGCCGGAA GGGCCGAGCG

3541 CAGAAGTGGT CCTGCAACTT TATCCGCCTC CATCCAGTCT ATTAATTGTT GCCGGGAAGC

3601 TAGAGTAAGT AGTTCGCCAG TTAATAGTTT GCGCAACGTT GTTGCCATTG CTACAGGCAT

3661 CGTGGTGTCA CGCTCGTCGT TTGGTATGGC TTCATTCAGC TCCGGTTCCC AACGATCAAG

3721 GCGAGTTACA TGATCCCCCA TGTTGTGCAA AAAAGCGGTT AGCTCCTTCG GTCCTCCGAT

3781 CGTTGTCAGA AGTAAGTTGG CCGCAGTGTT ATCACTCATG GTTATGGCAG CACTGCATAA

3841 TTCTCTTACT GTCATGCCAT CCGTAAGATG CTTTTCTGTG ACTGGTGAGT ACTCAACCAA

3901 GTCATTCTGA GAATAGTGTA TGCGGCGACC GAGTTGCTCT TGCCCGGCGT CAATACGGGA

3961 TAATACCGCG CCACATAGCA GAACTTTAAA AGTGCTCATC ATTGGAAAAC GTTCTTCGGG

4021 GCGAAAACTC TCAAGGATCT TACCGCTGTT GAGATCCAGT TCGATGTAAC CCACTCGTGC

4081 ACCCAACTGA TCTTCAGCAT CTTTTACTTT CACCAGCGTT TCTGGGTGAG CAAAAACAGG

4141 AAGGCAAAAT GCCGCAAAAA AGGGAATAAG GGCGACACGG AAATGTTGAA TACTCATACT

4201 CTTCCTTTTT CAATATTATT GAAGCATTTA TCAGGGTTAT TGTCTCATGA GCGGATACAT

4261 ATTTGAATGT ATTTAGAAAA ATAAACAAAT AGGGGTTCCG CGCACATTTC CCCGAAAAGT

4321 GCCACCTGAC GTCTAAGAAA CCATTATTAT CATGACATTA ACCTATAAAA ATAGGCGTAT

4381 CACGAGGCCC TTTCGTC

Sequência de ácido nucleico do pUC57-VACV-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L (SEQ ID NO: 27)

1 tcgcgcgttt cggtgatgac ggtgaaaacc tctgacacat gcagctcccg gagacggtca
61 cagcttgtct gtaagcggat gccgggagca gacaagcccg tcagggcgcg tcagcgggtg
121 ttggcgggtg tcggggctgg cttaactatg cggcatcaga gcagattgta ctgagagtgc
181 accatatgcg gtgtgaaata ccgcacagat gcgtaaggag aaaataccgc atcaggcgcc
241 attcgccatt caggctgcgc aactgttggg aagggcgatc ggtgcgggcc tcttcgctat
301 tacgccagct ggcgaaaggg ggatgtgctg caaggcgatt aagttgggta acgccagggt
361 tttcccagtc acgacgttgt aaaacgacgg ccagtgaatt cgagctcggt accgagatag
421 cgaaggaatt ctttttcggt gccgctagta cccttaatca tatcacatag tgttttatat
481 tccaaatttg tggcaataga cggtttattt ctatacgata gtttgtttct ggaatccttt
541 gagtattcta taccaatatt attctttgat tcgaatttag tttcttcgat attagatttt
601 gtattaccta tattcttgat gtagtacttt gatgattttt ccatggccca ttctattaag
661 tcttccaagt tggcatcatc cacatattgt gatagtaatt ctcggatatc agtagcggtt
721 accgccattg atgtttgttc attggatgag taactactaa tgtatacatt ttccatttat
781 aacacttatg tattaacttt gttcatttat atttttttcat tattaagctt ggatccaaaa
841 attgaaattt tatttttttt ttttggaata taaataagct cgaagtcgac gaattcatga
901 cagtactagc tccagcttgg tccccgacaa cataccttct actactacta ttgctatcct
961 ccggactatc tggaacccag gattgctctt ttcagcactc tccgatctcg tctgatttcg
1021 cggttaagat cagagagcta tccgactact tgctacagga ttacccagta accgtcgcgt
1081 ccaacctaca agatgaagaa ctatgtggtg gactttggag actagtccta gcgcaaagat
1141 ggatggaaag acttaagacc gtagcgggat ctaagatgca gggactacta gaaagagtca
1201 acaccgagat ccacttcgtc acaaagtgtg cgtttcaacc accaccgtcc tgtctaagat
1261 tcgtccagac aaacatctcc agactactac aagaaacctc cgagcagcta gtagcgctaa
1321 aaccgtggat cacaagacag aacttctcga gatgtctaga gctacagtgt cagccggatt
1381 cttctacatt accaccacca tggtcaccaa gaccactaga agctacagct ccaactgctc
1441 cacaaccacc attgctactt ttgctattgc tacccgtcgg attgctacta ttagctgctg
1501 cttggtgtct acactggcag agaactagaa gaagaactcc aagaccggga gaacaagtac

1561 caccagtacc atctccacag gacctactac tagtcgagca cagaagaaga agaagatcgg
1621 gagcgaccaa cttctcgcta ttgaaacaag cgggagatgt cgaagaaaat ccgggaccaa
1681 tggaaagagt acagccgcta gaagaaaacg taggaaatgc ggctagaccg agattcgaga
1741 gaaacaagct actattggtc gcgtccgtca tccaaggact aggattgcta ttgtgcttca
1801 cctacatctg cctacacttc tccgcgctac aagtctctca tagatacccg agaatccagt
1861 ccatcaaggt ccagttcacc gagtacaaga aagagaaggg attcatccta acctcgcaga
1921 aagaggacga gatcatgaag gtccagaaca actccgtcat catcaactgc gacggattct
1981 acctaatctc cctaaaggga tacttctccc aagaagtcaa catctccttg cactaccaga
2041 aggatgagga accgctattc cagctaaaga aagtcagatc cgtcaactcc ctaatggtcg
2101 cctctctaac gtacaaggac aaggtctacc taaacgtcac caccgacaac acatccctag
2161 atgatttcca cgtaaacggt ggagagctaa tcctaatcca tcagaacccg ggagagttct
2221 gtgtattata agttaacctg catttcatct ttctccaata ctaattcaaa ttgttaaatt
2281 aataatggat agtataaata gttattagtg ataaaatagt aaaaataatt attagaataa
2341 gagtgtagta tcatagataa ctctcttcta taaaaatgga ttttattcgt agaaagtatc
2401 ttatatacac agtagaaaat aatatagatt ttttaaagga tgatacatta agtaaagtaa
2461 acaattttac cctcaatcat gtactagctc tcaagtatct agttagcaat tttcctcaac
2521 atgttattac taaggatgta ttagctaata ccaatttttt tgttttcata catatggtac
2581 gatgttgtaa agtgtacgaa gcggttttac gacacgcatt tgatgcaccc acgttgtacg
2641 ttaaagcatt gactaagaat tattggatcc cgggcccgtc gaccaagctt ggcgtaatca
2701 tggtcatagc tgtttcctgt gtgaaattgt tatccgctca caattccaca caacatacga
2761 gccggaagca taaagtgtaa agcctggggt gcctaatgag tgagctaact cacattaatt
2821 gcgttgcgct cactgcccgc tttccagtcg ggaaacctgt cgtgccagct gcattaatga
2881 atcggccaac gcgcggggag aggcggtttg cgtattgggc gctcttccgc ttcctcgctc
2941 actgactcgc tgcgctcggt cgttcggctg cggcgagcgg tatcagctca ctcaaaggcg
3001 gtaatacggt tatccacaga atcaggggat aacgcaggaa agaacatgtg agcaaaaggc
3061 cagcaaaagg ccaggaaccg taaaaaggcc gcgttgctgg cgtttttcca taggctccgc
3121 ccccctgacg agcatcacaa aaatcgacgc tcaagtcaga ggtggcgaaa cccgacagga
3181 ctataaagat accaggcgtt tccccctgga agctccctcg tgcgctctcc tgttccgacc
3241 ctgccgctta ccggatacct gtccgccttt ctcccttcgg gaagcgtggc gctttctcat

3301 agctcacgct gtaggtatct cagttcggtg taggtcgttc gctccaagct gggctgtgtg
3361 cacgaacccc ccgttcagcc cgaccgctgc gccttatccg gtaactatcg tcttgagtcc
3421 aacccggtaa gacacgactt atcgccactg gcagcagcca ctggtaacag gattagcaga
3481 gcgaggtatg taggcggtgc tacagagttc ttgaagtggt ggcctaacta cggctacact
3541 agaagaacag tatttggtat ctgcgctctg ctgaagccag ttaccttcgg aaaaagagtt
3601 ggtagctctt gatccggcaa acaaaccacc gctggtagcg gtggtttttt tgtttgcaag
3661 cagcagatta cgcgcagaaa aaaaggatct caagaagatc ctttgatctt ttctacgggg
3721 tctgacgctc agtggaacga aaactcacgt taagggattt tggtcatgag attatcaaaa
3781 aggatcttca cctagatcct tttaaattaa aaatgaagtt ttaaatcaat ctaaagtata
3841 tatgagtaaa cttggtctga cagttaccaa tgcttaatca gtgaggcacc tatctcagcg
3901 atctgtctat ttcgttcatc catagttgcc tgactccccg tcgtgtagat aactacgata
3961 cgggagggct taccatctgg ccccagtgct gcaatgatac cgcgagaccc acgctcaccg
4021 gctccagatt tatcagcaat aaaccagcca gccggaaggg ccgagcgcag aagtggtcct
4081 gcaactttat ccgcctccat ccagtctatt aattgttgcc gggaagctag agtaagtagt
4141 tcgccagtta atagtttgcg caacgttgtt gccattgcta caggcatcgt ggtgtcacgc
4201 tcgtcgtttg gtatggcttc attcagctcc ggttcccaac gatcaaggcg agttacatga
4261 tcccccatgt tgtgcaaaaa agcggttagc tccttcggtc ctccgatcgt tgtcagaagt
4321 aagttggccg cagtgttatc actcatggtt atggcagcac tgcataattc tcttactgtc
4381 atgccatccg taagatgctt ttctgtgact ggtgagtact caaccaagtc attctgagaa
4441 tagtgtatgc ggcgaccgag ttgctcttgc ccggcgtcaa tacgggataa taccgcgcca
4501 catagcagaa ctttaaaagt gctcatcatt ggaaaacgtt cttcggggcg aaaactctca
4561 aggatcttac cgctgttgag atccagttcg atgtaaccca ctcgtgcacc caactgatct
4621 tcagcatctt ttactttcac cagcgtttct gggtgagcaa aaacaggaag gcaaaatgcc
4681 gcaaaaaagg gaataagggc gacacggaaa tgttgaatac tcatactctt cctttttcaa
4741 tattattgaa gcatttatca gggttattgt ctcatgagcg gatacatatt tgaatgtatt
4801 tagaaaaata aacaaatagg ggttccgcgc acatttcccc gaaaagtgcc acctgacgtc
4861 taagaaacca ttattatcat gacattaacc tataaaaata ggcgtatcac gaggcccttt
4921 cgtc

Sequência de ácido nucleico do pUC57-VACV-ΔE5R-hFlt3L-mOX40L (SEQ ID

NO: 28)

1 tcgcgcgttt cggtgatgac ggtgaaaacc tctgacacat gcagctcccg gagacggtca

61 cagcttgtct gtaagcggat gccgggagca gacaagcccg tcagggcgcg tcagcgggtg

121 ttggcgggtg tcggggctgg cttaactatg cggcatcaga gcagattgta ctgagagtgc

181 accatatgcg gtgtgaaata ccgcacagat gcgtaaggag aaaataccgc atcaggcgcc

241 attcgccatt caggctgcgc aactgttggg aagggcgatc ggtgcgggcc tcttcgctat

301 tacgccagct ggcgaaaggg ggatgtgctg caaggcgatt aagttgggta acgccagggt

361 tttcccagtc acgacgttgt aaaacgacgg ccagtgaatt cgagctcggt accgagatag

421 cgaaggaatt ctttttcggt gccgctagta cccttaatca tatcacatag tgttttatat

481 tccaaatttg tggcaataga cggtttattt ctatacgata gtttgtttct ggaatccttt

541 gagtattcta taccaatatt attctttgat tcgaatttag tttcttcgat attagatttt

601 gtattaccta tattcttgat gtagtacttt gatgattttt ccatggccca ttctattaag

661 tcttccaagt tggcatcatc cacatattgt gatagtaatt ctcggatatc agtagcggtt

721 accgccattg atgtttgttc attggatgag taactactaa tgtatacatt ttccatttat

781 aacacttatg tattaacttt gttcatttat atttttttcat tattaagctt ggatccaaaa

841 attgaaattt tatttttttt ttttggaata taaataagct cgaagtcgac gaattcatga

901 cagtactagc tccagcttgg tccccgacaa cataccttct actactacta ttgctatcct

961 ccggactatc tggaacccag gattgctctt ttcagcactc tccgatctcg tctgatttcg

1021 cggttaagat cagagagcta tccgactact tgctacagga ttacccagta accgtcgcgt

1081 ccaacctaca agatgaagaa ctatgtggtg gactttggag actagtccta gcgcaaagat

1141 ggatggaaag acttaagacc gtagcgggat ctaagatgca gggactacta gaaagagtca

1201 acaccgagat ccacttcgtc acaaagtgtg cgtttcaacc accaccgtcc tgtctaagat

1261 tcgtccagac aaacatctcc agactactac aagaaacctc cgagcagcta gtagcgctaa

1321 aaccgtggat cacaagacag aacttctcga gatgtctaga gctacagtgt cagccggatt

1381 cttctacatt accaccacca tggtcaccaa gaccactaga agctacagct ccaactgctc

1441 cacaaccacc attgctactt ttgctattgc tacccgtcgg attgctacta ttagctgctg

1501 cttggtgtct acactggcag agaactagaa gaagaactcc aagaccggga gaacaagtac

1561 caccagtacc atctccacag gacctactac tagtcgagca cagaagaaga agaagatcgg

1621 gagcgaccaa cttctcgcta ttgaaacaag cgggagatgt cgaagaaaat ccgggaccaa

1681 tggagggcga gggggtccag cctctggacg agaacctcga aaacgggtct cgccctcgct
1741 ttaaatggaa gaagactctt aggctcgttg taagcggcat caaggggggcc ggtatgttgc
1801 tgtgcttcat atatgtgtgt ttgcaactta gctcttcacc tgcaaaagac ccccccatac
1861 aacgccttcg gggggctgtg acccgctgtg aagatggtca attgtttatt tcttcttaca
1921 agaacgagta tcagacgatg gaagtccaga ataactccgt agtgattaag tgtgacggac
1981 tgtacatcat ctacttgaaa ggatcttttt tccaggaggt caaaattgac ctccacttca
2041 gggaggatca caaccctatc tcaatcccta tgttgaacga cggcagaaga atcgtcttta
2101 ctgtagtcgc ttcactggcc ttcaaggata aggtgtactt gaccgtaaac gctcctgata
2161 ccttgtgcga gcatttgcaa atcaacgatg gagaacttat cgttgtccaa ctcacaccag
2221 gttactgtgc tcctgagggc agttatcaca gtacagtgaa ccaagtccca ctgtgagtta
2281 acctgcattt catctttctc caatactaat tcaaattgtt aaattaataa tggatagtat
2341 aaatagttat tagtgataaa atagtaaaaa taattattag aataagagtg tagtatcata
2401 gataactctc ttctataaaa atggatttta ttcgtagaaa gtatcttata tacacagtag
2461 aaaataatat agatttttta aaggatgata cattaagtaa agtaaacaat tttaccctca
2521 atcatgtact agctctcaag tatctagtta gcaattttcc tcaacatgtt attactaagg
2581 atgtattagc taataccaat ttttttgttt tcatacatat ggtacgatgt tgtaaagtgt
2641 acgaagcggt tttacgacac gcatttgatg cacccacgtt gtacgttaaa gcattgacta
2701 agaattattg gatcccgggc ccgtcgacca agcttggcgt aatcatggtc atagctgttt
2761 cctgtgtgaa attgttatcc gctcacaatt ccacacaaca tacgagccgg aagcataaag
2821 tgtaaagcct ggggtgccta atgagtgagc taactcacat taattgcgtt gcgctcactg
2881 cccgctttcc agtcgggaaa cctgtcgtgc cagctgcatt aatgaatcgg ccaacgcgcg
2941 gggagaggcg gtttgcgtat tgggcgctct tccgcttcct cgctcactga ctcgctgcgc
3001 tcggtcgttc ggctgcggcg agcggtatca gctcactcaa aggcggtaat acggttatcc
3061 acagaatcag gggataacgc aggaaagaac atgtgagcaa aaggccagca aaaggccagg
3121 aaccgtaaaa aggccgcgtt gctggcgttt ttccataggc tccgcccccc tgacgagcat
3181 cacaaaaatc gacgctcaag tcagaggtgg cgaaacccga caggactata aagataccag
3241 gcgtttcccc ctggaagctc cctcgtgcgc tctcctgttc cgaccctgcc gcttaccgga
3301 tacctgtccg cctttctccc ttcgggaagc gtggcgcttt ctcatagctc acgctgtagg

3361 tatctcagtt cggtgtaggt cgttcgctcc aagctgggct gtgtgcacga acccccccgtt
3421 cagcccgacc gctgcgcctt atccggtaac tatcgtcttg agtccaaccc ggtaagacac
3481 gacttatcgc cactggcagc agccactggt aacaggatta gcagagcgag gtatgtaggc
3541 ggtgctacag agttcttgaa gtggtggcct aactacggct acactagaag aacagtattt
3601 ggtatctgcg ctctgctgaa gccagttacc ttcggaaaaa gagttggtag ctcttgatcc
3661 ggcaaacaaa ccaccgctgg tagcggtggt ttttttgttt gcaagcagca gattacgcgc
3721 agaaaaaaag gatctcaaga agatcctttg atcttttcta cggggtctga cgctcagtgg
3781 aacgaaaact cacgttaagg gattttggtc atgagattat caaaaaggat cttcacctag
3841 atccttttaa attaaaaatg aagttttaaa tcaatctaaa gtatatatga gtaaacttgg
3901 tctgacagtt accaatgctt aatcagtgag gcacctatct cagcgatctg tctatttcgt
3961 tcatccatag ttgcctgact ccccgtcgtg tagataacta cgatacggga gggcttacca
4021 tctggcccca gtgctgcaat gataccgcga gacccacgct caccggctcc agatttatca
4081 gcaataaacc agccagccgg aagggccgag cgcagaagtg gtcctgcaac tttatccgcc
4141 tccatccagt ctattaattg ttgccgggaa gctagagtaa gtagttcgcc agttaatagt
4201 ttgcgcaacg ttgttgccat tgctacaggc atcgtggtgt cacgctcgtc gtttggtatg
4261 gcttcattca gctccggttc ccaacgatca aggcgagtta catgatcccc catgttgtgc
4321 aaaaaagcgg ttagctcctt cggtcctccg atcgttgtca gaagtaagtt ggccgcagtg
4381 ttatcactca tggttatggc agcactgcat aattctctta ctgtcatgcc atccgtaaga
4441 tgcttttctg tgactggtga gtactcaacc aagtcattct gagaatagtg tatgcggcga
4501 ccgagttgct cttgcccggc gtcaatacgg gataataccg cgccacatag cagaacttta
4561 aaagtgctca tcattggaaa acgttcttcg gggcgaaaac tctcaaggat cttaccgctg
4621 ttgagatcca gttcgatgta acccactcgt gcacccaact gatcttcagc atcttttact
4681 ttcaccagcg tttctgggtg agcaaaaaca ggaaggcaaa atgccgcaaa aaagggaata
4741 agggcgacac ggaaatgttg aatactcata ctcttccttt ttcaatatta ttgaagcatt
4801 tatcagggtt attgtctcat gagcggatac atatttgaat gtatttagaa aaataaacaa
4861 atagggttc cgcgcacatt tccccgaaaa gtgccacctg acgtctaaga aaccattatt
4921 atcatgacat taacctataa aaataggcgt atcacgaggc cctttcgtc

[0471] Em algumas modalidades, o vírus VACVΔE5R manipulado é gerado pela inserção de um construto de expressão, como aqueles ilustrados por SEQ ID NOs: 26-28 (**Tabela 4**) na região genômica do VACV que

corresponde à posição do locus E5R (*por exemplo*, posição 49.236 to 50.261 de SEQ ID NO: 2).

[0472] Um exemplo não limitativo de uma leitura aberta de anticorpo anti-CTLA-4 para inserção no locus TK de VACV, usando, *por exemplo*, um vetor baseado em plasmídeo pCB, é mostrado na SEQ ID NO: 29 (**Tabela 5**).

TABELA 5
Sequências de nucleotídeos exemplificativas para as estruturas de leitura aberta dos construtos do vírus vaccinia da presente tecnologia.
sequência de nucleotídeos anti-muCTLA4-muIgG2a (SEQ ID NO: 29). 5'*ATGGAATGGTCCTTTGTCTTTCTTTTTTTCTTGTCCGCAGCTGCCGGAGT ACATTCGGAG*GCGAAGTTGCAAGAGTCCGGACCTGTACTTGTTAAGCCCG GAGCTTCAGTGAAAATGTCCTGTAAAGCATCCGGATATACCTTTACAGATT ATTATATGAATTGGGTGAAGCAAAGTCATGGAAAGAGTCTTGAATGGATAG GAGTAATTAATCCTTATAACGGAGATACATCTTATAATCAAAAGTTCAAAGG AAAAGCTACACTAACTGTTGATAAATCCTCAAGTACTGCTTATATGGAACTA AACTCACTAACTAGTGAAGATTCTGCAGTTTATTATTGTGCTCGTTATTATG GTTCGTGGTTTGCATATTGGGGACAGGGAACCTTAATAACTGTAAGTACAG CAAAAACAACGGCGCCTTCTGTTTATCCATTAGCGCCTGTATGTGGAGATA CAACTGGTTCTTCTGTTACATTAGGATGTCTAGTCAAAGGATATTTCCCAGA ACCTGTTACATTAACCTGGAACTCCGGTTCGCTATCATCAGGTGTACACAC TTTCCCGGCGGTTCTACAATCTGATTTGTATACATTATCATCTTCCGTTACA GTTACTTCTTCCACTTGGCCATCGCAAAGTATCACATGTAACGTAGCGCAC CCAGCTTCATCAACAAAAGTCGATAAAAAAATAGAGCCGCGAGGTCCCACT ATAAAGCCGTGTCCACCTTGTAAATGTCCAGCTCCTAATTTATTAGGAGGA CCCAGTGTATTTATTTTCCCTCCTAAAATTAAAGATGTATTGATGATTTCTTT ATCTCCAATTGTTACATGCGTGGTTGTAGATGTATCCGAAGACGATCCGGA TGTGCAAATATCGTGGTTCGTTAATAATGTGGAAGTTCACACCGCGCAAAC TCAAACTCACAGAGAGGATTACAATTCTACCTTGCGTGTAGTGTCGGCTCT ACCTATACAACACCAAGATTGGATGTCTGGAAAAGAATTTAAATGCAAAGTT

AATAACAAAGACCTTCCAGCGCCAATAGAAAGAACAATATCCAAACCTAAA
GGTAGTGTAAGAGCTCCTCAAGTATACGTTTTACCGCCTCCTGAAGAAGAA
ATGACGAAAAAACAAGTTACATTAACCTGTATGGTGACAGATTTTATGCCA
GAGGATATTTATGTGGAGTGGACTAATAATGGAAAAACGGAATTGAATTAC
AAAAATACTGAACCTGTATTAGATAGTGATGGATCATATTTTATGTACAGTA
AATTGAGAGTGGAAAAAAAGAATTGGGTTGAAAGAAATTCGTACTCTTGTT
CAGTTGTACATGAGGGACTACATAATCATCATACCACTAAGAGTTTTTCAAG
AACCCCTGGTAAA**CGTAGAAGGCGTAGGAGATCTGGTGCTACTAATTTCT**
CCTTGTTAAAACAAGCCGGTGACGTCGAAGAAAACCCTGGTCCTATG*AT*
GACATGGACTCTACTATTCCTTGCCTTCCTTCATCACTTAACAGGGTCATGT
*GCC****GACATCGTTATGACCCAAACTACTCTTTCATTACCTGTGTCATTAGG***
AGACCAGGCATCCATCTCATGCCGATCCTCTCAATCGATAGTACACTCTA
ATGGAAATACCTATTTAGAATGGTATTTGCAGAAGCCGGGTCAATCTCCG
AAGTTACTAATTTATAAAGTTTCTAACAGATTTTCAGGAGTTCCAGATAGA
TTTAGTGGTTCAGGATCCGGTACTGACTTTACATTAAAGATCTCTCGTGTA
GAAGCTGAGGATCTTGGTGTATATTATTGTTTCCAAGGATCTCACGTCCC
ATATACTTTCGGAGGAGGAACCAAACTAGAAATTAAGCGTGCTGATGCG
GCTCCCACAGTAAGTATATTCCCACCGTCGTCAGAACAATTAACCTCGGG
AGGAGCCTCGGTCGTTTGTTTCTTAAATAACTTTTATCCTAAGGATATCAA
CGTTAAATGGAAAATTGATGGTTCTGAACGTCAGAATGGAGTGTTGAATT
CATGGACTGATCAAGATTCCAAAGACTCTACTTATTCGATGTCGAGTACA
CTTACTTTAACAAAAGATGAATATGAACGACATAACTCATATACTTGTGA
AGCAACCCATAAGACATCTACTTCACCAATTGTAAAGTCTTTTAATCGAA
ACGAATGCTAA

CASO SUPERIOR ITÁLICO= sequência líder kappa de IgG humana

CASO SUPERIOR SUBLINHADO=Cadeia Pesada anti-CTLA-4

CASO SUPERIOR NEGRITADO=sítio de clivagem de Furina

CASO SUPERIOR NEGRITADO SUBLINHADO=Pep2A

CASO SUPERIOR ITÁLICO NEGRITADO=Cadeia Pesada anti-CTLA-4

[0473] Exemplos não limitativos de construtos de expressão de IL-12 para inserção, por exemplo, no locus E5R, usando, por exemplo, um vetor pUC57, de acordo com a presente tecnologia pela qual, por exemplo, o construto VACV-E3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-hIL-12 é modificado são mostradas em SEQ ID NOs: 35-38 (**Tabela 5A**) (*consulte* também **FIG. 169**).

TABELA 5A
Sequências de nucleotídeos exemplificativas para construtos de expressão de IL-12 da presente tecnologia (proteínas de fusão de IL-12 humana e murina).
Sequência de ácido nucleico de IL-12 humano (SEQ ID NO: 35) ATGTGTCACCAGCAGCTAGTGATCTCGTGGTTCTCCCTAGTATTTCTAGCC TCTCCGCTAGTAGCGATCTGGGAGCTAAAAAAGGATGTCTACGTCGTCGA GCTAGACTGGTATCCAGATGCTCCGGGAGAAATGGTAGTCCTAACATGTG ATACACCGGAAGAGGATGGAATCACCTGGACCTTGGATCAATCCTCCGAA GTACTAGGATCCGGAAAGACCCTAACCATCCAAGTCAAAGAATTCGGAGAT GCGGGACAGTACACCTGTCACAAAGGTGGAGAAGTCCTATCGCACTCCCT ACTACTATTGCACAAGAAAGAGGACGGTATCTGGTCCACCGATATCCTAAA GGATCAGAAAGAGCCGAAGAACAAGACCTTCCTAAGATGCGAAGCGAAGA ACTACTCCGGAAGATTCACATGTTGGTGGCTAACCACAATCTCCACCGACC TAACCTTCTCCGTCAAATCTTCTAGAGGATCCAGTGATCCGCAGGGTGTAA CATGTGGTGCTGCTACATTATCTGCGGAGAGAGTCAGAGGAGACAACAAA GAGTACGAGTACTCCGTCGAGTGTCAAGAGGATTCTGCTTGTCCAGCTGC GGAAGAATCTCTACCGATCGAAGTAATGGTAGACGCGGTCCACAAGTTGA AGTACGAGAACTACACCTCCTCGTTCTTCATCAGAGACATCATCAAACCAG ATCCGCCGAAGAATCTACAGCTAAAGCCGCTAAAGAACTCCAGACAGGTC GAAGTATCTTGGGAATACCCGGATACTTGGTCTACACCGCACTCCTACTTT TCGTTGACCTTCTGTGTACAAGTCCAGGGAAAGTCCAAGAGAGAGAAGAA GGACAGAGTCTTTACCGACAAGACATCCGCGACCGTCATCTGTAGAAAGA ACGCCTCTATTTCTGTCAGAGCGCAGGACAGATATTACTCCTCGTCTTGGA

GTGAATGGGCGTCTGTACCATGTTCCAGAAGAAGAAGAAGAAGAGCGACC AACTTCTCGCTATTGAAGCAAGCGGGAGATGTAGAAGAAAATCCGGGACC GTTAGATATGTGTCCGGCGAGATCTCTACTACTAGTCGCGACACTAGTCCT ACTAGACCATCTATCTCTAGCGAGAAATTTGCCAGTAGCGACACCAGATCC TGGAATGTTTCCGTGTCTACACCACTCGCAGAATCTACTAAGAGCCGTGTC TAACATGCTACAGAAGGCGAGACAGACCTTGGAATTCTACCCGTGTACCTC CGAAGAAATCGATCACGAGGATATCACCAAGGACAAGACCTCTACAGTCG AAGCTTGTCTACCGCTAGAGTTGACCAAGAACGAGTCCTGCCTAAACTCCA GAGAAACCTCCTTCATCACCAACGGATCTTGCCTAGCGTCTAGAAAGACCT CTTTCATGATGGCGCTATGCCTATCCTCTATCTACGAGGACCTAAAGATGT ACCAGGTCGAATTCAAGACCATGAACGCGAAGCTACTAATGGACCCGAAG AGACAGATCTTCTTGGACCAGAATATGCTAGCGGTCATCGACGAACTAATG CAGGCGCTAAACTTCAACTCTGAAACCGTGCCGCAGAAGTCCAGTTTAGA AGAACCGGATTTCTACAAGACCAAGATCAAGCTATGCATCCTACTACACGC GTTCAGAATCAGAGCGGTCACCATCGATAGAGTCATGTCTTACCTAAACGC GTCCAGAAGACCGAAAGGAAGAGGAAAGAGAAGAAGAGAAAAGCAAAGAC CGACCGACTGCCATCTATGA
Sequência de aminoácidos HuIL12p40-PEP2A-huIL12p35-AA-PIGF-AA (SEQ ID NO: 36) MCHQQLVISWFSLVFLASPLVAIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDT PEEDGITW TLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWS TDILKDQ KEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGA ATLSAERV RGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIK PDPPKN LQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFT DKTSATVIC

RKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCS

RRRRRRATNFSLLKQAGDVEENPGPLD

MCPARSLLLVATLVLLDHLSLARNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQ KARQTLE

FYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRK TSFMM

ALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFN SETVPQK

SSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS

RRPKGRGKRRREKQRPTDCHL

SUBLINHADO=sequência PEP2A

NEGRITO SUBLINHADO=Tag de ligação à matriz

Sequência de ácido nucleico de IL-12 murino (SEQ ID NO: 37)

ATGTGTCCACAAAAGCTCACCATCTCATGGTTCGCTATAGTATTGCTCGTTT CCCCATTGATGGCAATGTGGGAGCTTGAAAAAGATGTGTATGTAGTGGAG GTTGACTGGACTCCTGATGCACCCGGAGAGACAGTCAATTTGACATGCGA CACCCCCGAAGAAGATGATATTACATGGACATCCGACCAACGGCACGGGG TCATCGGATCTGGGAAGACCTTGACAATTACAGTGAAGGAGTTCTTGGATG CAGGACAGTACACATGTCATAAAGGGGGCGAGACACTCTCACATTCACAT CTGCTCCTGCATAAAAAGGAGAACGGAATCTGGTCCACCGAAATCCTTAAG AATTTCAAGAACAAAACCTTTCTTAAGTGTGAGGCCCCTAATTATTCCGGAA GATTTACATGCAGCTGGTTGGTCCAGCGCAATATGGACCTCAAATTTAATA TCAAGTCTTCTTCCAGCTCCCCAGATTCTCGGGCAGTGACTTGCGGCATG GCATCCCTCTCCGCTGAGAAAGTAACATTGGATCAACGAGACTACGAGAA GTACTCTGTTAGTTGTCAAGAGGACGTTACATGCCCTACCGCAGAAGAGA CATTGCCAATTGAATTGGCCCTTGAAGCACGCCAGCAGAATAAGTACGAAA ATTACAGTACAAGCTTTTTCATCCGAGACATAATTAAACCCGATCCTCCTAA GAATCTCCAAATGAAACCTTTGAAGAATAGCCAAGTGGAAGTTTCATGGGA GTATCCAGATTCCTGGTCCACACCACATTCCTATTTCTCCCTTAAGTTCTTC

GTCAGAATCCAGAGGAAGAAAGAAAAGATGAAGGAAACCGAGGAAGGCTG
CAACCAGAAGGGCGCCTTTCTGGTAGAGAAAACCAGCACTGAGGTTCAGT
GTAAGGGGGGAAACGTGTGTGTGCAGGCACAAGATCGATACTACAACTCA
AGCTGTAGTAAATGGGCCTGCGTACCTTGTCGGGTTCGATCCAGACGACG
CCGGAGACGAGCTACCAATTTTTCCTTGCTCAAGCAGGCAGGCGATGTGG
AGGAAAACCCAGGGCCCCTTGACATGTGTCAGAGCCGGTACCTCCTTTTC
CTCGCAACCCTGGCTCTGCTTAACCACCTCTCACTGGCTAGGGTAATTCCC
GTATCTGGGCCTGCCCGATGCCTCAGCCAGAGTCGGAATCTCCTTAAGAC
CACAGACGATATGGTAAAAACAGCAAGGGAGAAACTCAAACATTACTCTTG
TACAGCAGAGGACATCGATCATGAAGACATAACCCGGGACCAGACCTCAA
CATTGAAAACTTGTCTGCCACTGGAGCTTCATAAGAACGAGTCCTGCCTTG
CCACACGAGAGACCTCTAGCACTACACGGGGGTCCTGCCTGCCTCCACAG
AAAACCTCCTTGATGATGACCCTGTGTCTCGGCAGTATTTACGAAGATTTG
AAGATGTACCAAACAGAGTTTCAGGCCATTAACGCAGCATTGCAAAACCAT
AATCACCAGCAGATAATCCTTGATAAGGGTATGCTGGTAGCCATCGACGAA
CTTATGCAATCTCTGAATCATAATGGCGAAACTCTGCGACAAAAGCCCCCA
GTTGGAGAAGCCGACCCCTACCGAGTCAAGATGAAACTCTGCATACTCCT
GCATGCCTTTTCCACACGGGTTGTTACTATCAATCGAGTCATGGGGTATCT
TTCTTCAGCACGGCGCCCTAAAGGGCGCGGAAAACGCCGCCGGGAAAAA
CAAAGACCTACTGATTGCCATCTGTGA

Sequência de aminoácidos da proteína de fusão IL-12 murino (SEQ ID NO: 38)

MCPQKLTISWFAIVLLVSPLMAMWELEKDVYVVEVDWTPDAPGETVNLTCDT
PEEDDITWTSDQRHGVIGSGKTLTITVKEFLDAGQYTCHKGGETLSHSHLLLH
KKENGIWSTEILKNFKNKTFLKCEAPNYSGRFTCSWLVQRNMDLKFNIKSSSS
SPDSRAVTCGMASLSAEKVTLDQRDYEKYSVSCQEDVTCPTAEETLPIELALE
ARQQNKYENYSTSFFIRDIIKPDPPKNLQMKPLKNSQVEVSWEYPDSWSTPH
SYFSLKFFVRIQRKKEKMKETEEGCNQKGAFLVEKTSTEVQCKGGNVCVQAQ
DRYYNSSCSKWACVPCRVRSRRRRRRATNFSLLKQAGDVEENPGPLDMCQ
SRYLLFLATLALLNHLSLARVIPVSGPARCLSQSRNLLKTTDDMVKTAREKLKH

YSCTAEDIDHEDITRDQTSTLKTCLPLELHKNESCLATRETSSTTRGSCLPPQK TSLMMTLCLGSIYEDLKMYQTEFQAINAALQNHNHQQIILDKGMLVAIDELMQS LNHNGETLRQKPPVGEADPYRVKMKLCILLHAFSTRVVTINRVMGYLSSA**RRP KGRGKRRREKQRPTDCHL***

SUBLINHADO=sequência PEP2A

NEGRITO SUBLINHADO=Tag de ligação à matriz

[0474] Em algumas modalidades, os vírus VACV modificados da presente tecnologia compreendem um construto de expressão, tal como ilustrado por SEQ ID NO: 29 (**Tabela 5**) inserido na região genômica VACV que corresponde à posição do locus TK (*por exemplo*, posição 80.962 a 81.032 da SEQ ID NO: 2).

VACVΔB2R

[0475] O gene VACV *B2R* codifica poxina, uma nuclease que desempenha um papel na evasão viral de cGAS-STING hospedeiras imunidade inata. A divulgação da presente tecnologia se refere a um vírus vaccinia mutante B2R (*ou seja*, VACVΔB2R; VACV compreendendo uma deleção B2R; VACV geneticamente modificado para compreender um gene B2R mutante), ou composições imunogênicas compreendendo o vírus, em que o vírus é modificado para expressar um ou mais genes específicos de interesse (SG), como OX40L (VACVΔB2R-OX40L), e seu uso como imunoterápico contra o câncer. Em algumas modalidades, o gene B2R do vírus vaccinia, por meio de técnicas de recombinação homóloga, é projetado para conter uma interrupção que compreende uma sequência de ácido nucleico heteróloga compreendendo um ou mais cassetes de expressão, que resultam em um nocaute B2R de modo que o gene B2R não seja expresso, expressa em níveis tão baixos que não têm efeito, ou a proteína expressa não é funcional (*por exemplo*, é uma mutação nula). Em algumas modalidades, o mutante ΔB2R inclui uma sequência de ácido nucleico heterólogo no lugar de toda ou a maioria da sequência do gene B2R. Por exemplo, em algumas modalidades a sequência de ácido nucleico correspondente à posição de B2R no genoma de

VACV (*por exemplo*, posição 164.856 to 165.530 de SEQ ID NO: 2) é substituído por uma sequência de ácido nucleico heterólogo. Em algumas modalidades, a sequência de ácido nucleico heterólogo compreende uma estrutura de leitura aberta que codifica um marcador selecionável. Em algumas modalidades, o marcador selecionável é uma proteína fluorescente (*por exemplo*, gpt, GFP, mCherry). Em algumas modalidades, o vírus VACVΔB2R abrange um VACV recombinante que não expressa uma proteína B2R funcional. Em algumas modalidades, um gene específico de interesse (*por exemplo*, OX40L, hFlt3L) é inserido no locus B2R do genoma VACV, dividindo o gene B2R e obliterando-o.

[0476] Adicionalmente ou alternativamente, em algumas modalidades, VACVΔB2R é manipulado para expressar OX40L e hFlt3L. Em algumas modalidades, o gene da timidina quinase (TK) do vírus vaccinia (*por exemplo*, posição 80.962 a 81.032 da SEQ ID NO: 2), por meio de recombinação homóloga, é projetada para conter uma interrupção compreendendo uma sequência de ácido nucleico heterólogo compreendendo uma ou mais cassetes de expressão, o que resulta em um nocaute do gene TK de modo que o gene TK não seja expresso, expresso em níveis tão baixos a ponto de ter nenhum efeito, ou a proteína expressa não é funcional (*por exemplo*, é uma mutação nula). O vírus VACVΔB2R-TK(-) resultante é ainda modificado para compreender uma ou mais cassetes de expressão que são flanqueados por uma sequência parcial do gene TK (TK-L e TK-R) em ambos os lados. Em algumas modalidades, o cassete de expressão compreende uma única estrutura de leitura aberta que codifica um gene específico de interesse (SG), como OX40L usando o promotor precoce e tardio sintético viral de vaccinia (PsE/L), resultando em VACVΔB2R-TK(-)-OX40L. Em algumas modalidades, o vírus recombinante é ainda modificado no locus B2R, por meio de técnicas de recombinação homóloga, para conter uma interrupção que compreende uma sequência de ácido nucleico heterólogo compreendendo um ou mais cassetes de expressão, que resultam em um nocaute de B2R de modo

que o gene B2R não seja expresso, expresso em níveis tão baixos que não têm efeito, ou a proteína expressa não é funcional (*por exemplo*, é uma mutação nula). Em algumas modalidades, o cassete de expressão compreende uma única estrutura de leitura aberta que codifica um gene específico de interesse (SG), como hFlt3L, resultando em VACVΔB2R-hFlt3L-TK(-)-OX40L. Em algumas modalidades, o cassete de expressão que codifica OX40L é inserido no locus B2R, enquanto o cassete de expressão que codifica hFlt3L é inserido no locus TK. Em algumas modalidades, um vírus VACVΔB2R-anti-CTLA-4-hFlt3L-TK(-) é ainda modificado para codificar OX40L, resultando em VACVΔB2R-anti-CTLA-4-TK(-)-hFlt3L-OX40L. Em algumas modalidades, o vírus VACVΔB2R-anti-CTLA-4-TK(-)-hFlt3L-OX40L é ainda modificado para expressar hIL-12, resultando em VACVΔB2R-anti-CTLA-4-TK(-)-hFlt3L-OX40L-hIL-12. Em algumas modalidades, um genoma VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-hIL-12 é modificado para compreender uma deleção de B2R (VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12-ΔB2R) (*ver, por exemplo*, **FIG. 168**).

[0477] Adicionalmente ou alternativamente, em algumas modalidades, a sequência de ácido nucleico heterólogo compreende um cassete de expressão compreendendo duas ou mais estruturas de leitura aberta que codificam dois ou mais genes específicos de interesse, separados por uma sequência de nucleotídeos que codifica, na direção 5’ para 3', um sítio de clivagem de protease (*por exemplo*, um sítio de clivagem de furina) e uma sequência de peptídeo 2A (Pep2A).

[0478] Em algumas modalidades, os vírus VACVΔB2R recombinantes geneticamente modificado descrito acima são modificados para expressar pelo menos um outro gene heterólogo, tal como qualquer um ou mais de hOX40L, hFlt3L, hIL-2, hIL-12, hIL-15, hIL-15/IL-15Rα, hIL-18, hIL-21, anti-huCTLA-4, anti-huPD-1, anti-huPD-L1, GITRL, 4-1BBL, ou CD40L, e/ou incluir pelo menos uma outra mutação ou deleção de gene viral, como qualquer uma ou mais dentre as seguintes deleções: E3L (ΔE3L); E3LΔ83N; C7 (ΔC7L);

B19R (B18R; ΔWR200); E5R (ΔE5R); K7R; C12L (IL18BP); B8R; B14R; N1L; C11R; K1L; M1L; N2L; e/ou WR199. Em algumas modalidades, os vírus VACVΔB2R geneticamente modificados ou recombinantes são selecionados a partir de VACVΔB2R-ΔE5R, VACVΔB2R-ΔE5R-E3LΔ83N, e VACVΔB2R-E3LΔ83N. Em outras modalidades, nenhum outro gene heterólogo é adicionado, exceto aqueles fornecidos no nome do vírus descritos neste documento, e/ou nenhum outro gene viral é interrompido ou deletado, exceto aqueles fornecidos no nome do vírus descritos neste documento.

[0479] Embora em certas modalidades descritas acima, o transgene possa ser inserido no locus B2R, dividindo o gene B2R e obliterando-o ou substituindo-o, outros loci de integração adequados podem ser selecionados. Por exemplo, VACV codifica vários genes imunomoduladores, incluindo, mas não se limitando a C7, C11, K3, F1, F2, F4, F6, F8, F9, F11, F14.5, J2, A46, E3L, B18R (WR200), E5R, K7R, C12L, B8R, B14R, N1L, C11R, K1L, C16, M1L, N2L, e WR199. Consequentemente, em algumas modalidades, esses genes podem ser deletados para aumentar as propriedades de ativação reações imunológicas do vírus e permitir a inserção de transgenes.

[0480] Em algumas modalidades, a sequência de nucleotídeos heterólogos compreende ainda um cassete de expressão adicional que compreende uma estrutura de leitura aberta que codifica um marcador selecionável operacionalmente ligado a um promotor que é capaz de dirigir a expressão do marcador selecionável. Em algumas modalidades, o marcador selecionável é um gene da xantina-guanina fosforibosil transferase (gpt). Em algumas modalidades, o marcador selecionável é um gene de proteína fluorescente verde (GFP). Em algumas modalidades, o marcador selecionável é um gene mCherry que codifica uma proteína fluorescente vermelha.

[0481] Um exemplo não limitativo de um construto de deleção VACVΔB2R compreendendo uma estrutura de leitura aberta que codifica um marcador selecionável de acordo com a presente tecnologia é mostrado na SEQ ID NO: 30 (**Tabela 7**).

TABELA 7
Sequências de nucleotídeos exemplares para as estruturas de leitura aberta dos construtos de VACVΔB2R recombinantes da presente tecnologia.
Sequência de ácido nucleico do plasmídeo B2R-FRT GFP Kan (SEQ ID NO: 30) GTCTATACAAATCCATTAATGTGGAATATCGATTCTTGGTAATTAATAGATT AGGTGCAGATCTAGATGCGGTGATCAGAGCCAATAATAATAGATTACCAAA AAGGTCGGTGATGTTGATCGGAATCGAAATCTTAAATACCATACAATTTATG CACGAGCAAGGATATTCTCACGGAGATATTAAAGCGAGTAATATAGTCTTG GATCAAATAGATAAGAATAAATTATATCTAGTGGATTACGGATTGGTTTCTA AATTCATGTCTAATGGAGAACATGTTCCATTTATAAGAAATCCAAATAAAAT GGATAACGGTACTCTAGAATTTACACCTATAGATTCGCATAAAGGATACGT TGTATCTAGACGTGGAGATCTAGAAACACTTGGATATTGTATGATTAGATG GTTGGGAGGTATCTTGCCATGGACTAAGATATCTGAAACAAAGAATTGTGC ATTAGTAAGTGCCACAAAACAGAAATATGTTAACAATACTGCGACTTTGTTA ATGACCAGTTTGCAATATGCACCTAGAGAATTGCTGCAATATATTACCATG GTAAACTCTTTGACATATTTTGAGGAACCCAATTATGACGAGTTTCGGCAC ATATTAATGCAGGGTGTATATTATTAAGTGTGGTGTTTGGTCGATGTAAAAT TTTTGTCGATAAAAATTAAAAAATAACTTAATTTATTATTGATCTCGTGTATA AGCTAGCGCGGTTAACCGCCTTTTTATCCATCAGGTGATCTGTTTTTATTGT GGAGTCTAGAACTAGTGGATCCCCCGGGCTGCAGGAATTCGATATCAAGC TCAGGCCTAGATCTGTCGACTTCGAGCTTATTTATATTCCAAAAAAAAAAAA TAAAATTTCAATTTTTAAGCTTTTGAAGTTCCTATACTTTCTAGAGAATAGGA ACTTCCACTAATTCCAAACCCACCCGCTTTTTATAGTAAGTTTTTCACCCAT AAATAATAAATACAATAATTAATTTCTCGTAAAAGTAGAAAATATATTCTAAT TTATTGCACGGTAAGGAAGTAGATCATAACTCGAGGAATTGGGGATCTCTA TAATCTCGCGCAACCTATTTTCCCCTCGAACACTTTTTAAGCCGTAGATAAA CAGGCTGGGACACTTCACACGCGTATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGT TCACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGG

CCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGC
AAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTG
GCCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCT
ACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAA
GGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAA
GACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATC
GAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACA
AGCTGGAGTACAACTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAG
CAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGA
CGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGC
GACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCA
AGCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGA
GTTCGTGACCGCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGT
AATGAAGTTCCTATACTTTCTAGAGAATAGGAACTTCCGGTTAACCGGTGA
TATCACCTCTCTGGAAGACAGCGTGAATAATGTACTCATGAAACGTTTGGA
AACTATACGCCATATGTGGTCTGTCGTATATGATCATTTTGATATTGTGAAT
GGTAAAGAATGCTGTTATGTGCATACGCATTTGTCTAATCAAAATCTTATAC
CGAGTACTGTAAAAACAAATTTGTACATGAAGACTATGGGATCATGCATTC
AAATGGATTCCATGGAAGCTCTAGAGTATCTTAGCGAACTGAAGGAATCAG
GTGGATGGAGTCCCAGACCAGAAATGCAGGAATTTGAATATCCAGATGGA
GTGGAAGACACTGAATCAATTGAGAGATTGGTAGAGGAGTTCTTCAATAGA
TCAGAACTTCAGGCTGGTGAATCAGTCAAATTTGGTAATTCTATTAATGTTA
AACATACATCTGTTTCAGCTAAGCAACTAAGAACACGTATACGGCAGCAGC
TTCCTTTATACTCTCATCTTTTACCAACACAAAGGGTGGATATTTGTTCATT
GGAGTTGATAATAATACACACAAAGTAATTGGATTCACGGTGGGTCATGAC
TACCTCAGACTGGTAGAGAATGATATAGAAAAGCATATCAAAAGACTTCGT
GTTGTGCATTTCTGTGAGAAGAAAGAGGACATCAAGTACACGTGTCGATTC
ATCAAGGTATATAAACCTGGGGATGAGGCTTCACGTAGAAAGCCAGTCCG
CAGAAACGGTGCTGACCCCGGATGAATGTCAGCTACTGGGCTATCTGGAC

AAGGGAAAACGCAAGCGCAAAGAGAAAGCAGGTAGCTTGCAGTGGGCTTA
CATGGCGATAGCTAGACTGGGCGGTTTTATGGACAGCAAGCGAACCGGAA
TTGCCAGCTGGGGCGCCCTCTGGTAAGGTTGGGAAGCCCTGCAAAGTAAA
CTGGATGGCTTTCTCGCCGCCAAGGATCTGATGGCGCAGGGGATCAAGCT
CTGATCAAGAGACAGGATGAGGATCGTTTCGCATGATTGAACAAGATGGAT
TGCACGCAGGTTCTCCGGCCGCTTGGGTGGAGAGGCTATTCGGCTATGAC
TGGGCACAACAGACAATCGGCTGCTCTGATGCCGCCGTGTTCCGGCTGTC
AGCGCAGGGGCGCCCGGTTCTTTTTGTCAAGACCGACCTGTCCGGTGCC
CTGAATGAACTGCAAGACGAGGCAGCGCGGCTATCGTGGCTGGCCACGA
CGGGCGTTCCTTGCGCAGCTGTGCTCGACGTTGTCACTGAAGCGGGAAG
GGACTGGCTGCTATTGGGCGAAGTGCCGGGGCAGGATCTCCTGTCATCTC
ACCTTGCTCCTGCCGAGAAAGTATCCATCATGGCTGATGCAATGCGGCGG
CTGCATACGCTTGATCCGGCTACCTGCCCATTCGACCACCAAGCGAAACA
TCGCATCGAGCGAGCACGTACTCGGATGGAAGCCGGTCTTGTCGATCAGG
ATGATCTGGACGAAGAGCATCAGGGGCTCGCGCCAGCCGAACTGTTCGC
CAGGCTCAAGGCGAGCATGCCCGACGGCGAGGATCTCGTCGTGACCCAT
GGCGATGCCTGCTTGCCGAATATCATGGTGGAAAATGGCCGCTTTTCTGG
ATTCATCGACTGTGGCCGGCTGGGTGTGGCGGACCGCTATCAGGACATAG
CGTTGGCTACCCGTGATATTGCTGAAGAGCTTGGCGGCGAATGGGCTGAC
CGCTTCCTCGTGCTTTACGGTATCGCCGCTCCCGATTCGCAGCGCATCGC
CTTCTATCGCCTTCTTGACGAGTTCTTCTGAATTATTAACGCTTACAATTTC
CTGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTCACACCGCATA
CAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTTCGTTCCA
CTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTT
TTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAAACCACCGCTACCAGC
GGTGGTTTGTTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAAC
TGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTCCTTCTAGTGTAGCCGTA
GTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCT
GCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTA

CCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCGGG CTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTAC ACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCC CGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACA GGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATA GTCCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCT CGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTT ACGGTTCCTGGGCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTTCCTGCGTT ATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATAC CGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCA

[0482] In some embodiments, engineered VACVΔB2R virus is generated by inserting an expression construct such as that illustrated by SEQ ID NO: 30 (**Tabela 7**) na região genômica do VACV que corresponde à posição do locus B2R (*por exemplo*, posição 164.856 to 165.530 de SEQ ID NO: 2).

MVAΔWR199

[0483] Um exemplo não limitativo de uma estrutura de leitura aberta de construto MVAΔWR199 de acordo com a presente tecnologia é mostrado na SEQ ID NO: 34 (**Tabela 8**). Em algumas modalidades, o MVA compreendendo um mutante ΔWR199 é gerado pela inserção de um construto de expressão, com, *por exemplo*, um plasmídeo nocaute WR199, tal como aquele ilustrado por SEQ ID NO: 34 na região genômica MVA que corresponde à posição do locus WR199 (*por exemplo*, posição 158.399 a 160.143 da sequência estabelecida no GenBank No. de Acesso AY603355) (*ver, por exemplo*, **FIG. 153**).

TABELA 8
Sequências de nucleotídeos exemplares para as estruturas de leitura aberta dos construtos de MVAΔWR199 recombinantes da presente tecnologia.
Sequência de ácido nucleico do plasmídeo WR199-FRT mCherry Kan (SEQ ID NO: 34)

CGTGAATGTATGTTGTTACATTTCCATGTCAATTGAGTTTATAAGAATTTTTA
TACATTATCTTCCAACAAACAATTGACGAACGTATTGCTATGATTAACTCCC
ACGATACTATGCATATTATTAATCATTAACTTGCAGACTATACCTAGTGCTA
TTTTGACATACTCATGTTCTTGTGTAATTGCGGTATCTATATTATTAAAGTAC
GTAAATCTAGCTATAGTTTTATTATTTAATTTTAGATAATATACCGTCTCCTT
ATTTTTAAAAATTGCCACATCCTTTATTAAATCATGAATGGGAATTTCTATGT
CATCGTTAATATATTGTGAACAACAAGAGCAGATATCTATAGGAAAGGGTG
GAATGCGATACATTGATCTATGTAGTTTTAAAACACACGCGAACTTTGAAGA
ATTTATATAAATCATTCCATCGATACATCCTTCTATGTTGACATGTATATATC
CAGGAATTCTTTTATTAATGTCAGGAAATGTATAAACTAAAACATTGCCCGA
AAGCGGTGCCTCTATCTGCGTTATATCCGTTCTTAACTTACAAAATGTAACC
AATACCTTTGCATGACTTGTTTTGTTCGGCAACGTTAGTTTAAACTTGACGA
ATGGATTAATTACAATAGCATGATCCGCGCATCTATTAAGTTTTTTTACTTTA
ACGCCCTTGTATGTTTTTACAGAGACTTTATCTAAATTTCTAGTGCTTGTAT
GTGTTATAAATATAACGGGATATAGAACTGAATCACCTACCTTAGATACCCA
ATTACATTTTATCAGATCCAGATAATAAACAAATTTTGTCGCCCTAACTAATT
CTATATTGTTATATATTTTACAATTGGTTATGATATCATGTAATAACTTGGAG
TCTAACGCGCATCGTCGTACGTTTATACAATTGTGATTTAGTGTAGTATATC
TACACATGTATTTTTCCGCACTATAGTATTCTGGACTAGTGATAAAACTATC
GTTATATCTGTCTTCAATGAACTCATCGAGATATTGCTCTCTGTCATATTCA
TACACCTGCATAAACTTTCTAGACATCTTACAATCCGTGTTATTTTAGGATC
ATATTTACATATTTACGGGTATATCAAAGATGTTAGATTAGTTAATGGGAAT
CGTCTATAATAATGAATATTAAACAATTATATGAGGACTTTAAGCTAGCGCG
GTTAACCGCCTTTTTATCCATCAGGTGATCTGTTTTTATTGTGGAGTCTAGA
ACTAGTGGATCCCCCGGGCTGCAGGAATTCGATATCAAGCTCAGGCCTAG
ATCTGTCGACTTCGAGCTTATTTATATTCCAAAAAAAAAAAATAAAATTTCAA
TTTTTAAGCTTTTGAAGTTCCTATACTTTCTAGAGAATAGGAACTTCCACTA
ATTCCAAACCCACCCGCTTTTTATAGTAAGTTTTTCACCCATAAATAATAAAT
ACAATAATTAATTTCTCGTAAAAGTAGAAAATATATTCTAATTTATTGCACGG

TAAGGAAGTAGATCATAACTCGAGGAATTGGGGATCTCTATAATCTCGCGC
AACCTATTTTCCCCTCGAACACTTTTTAAGCCGTAGATAAACAGGCTGGGA
CACTTCACACGCGTATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGGATAACATGGCCATC
ATCAAGGAGTTCATGCGCTTCAAGGTGCACATGGAGGGCTCCGTGAACGG
CCACGAGTTCGAGATCGAGGGCGAGGGCGAGGGCCGCCCCTACGAGGG
CACCCAGACCGCCAAGCTGAAGGTGACCAAGGGTGGCCCCCTGCCCTTC
GCCTGGGACATCCTGTCCCCTCAGTTCATGTACGGCTCCAAGGCCTACGT
GAAGCACCCCGCCGACATCCCCGACTACTTGAAGCTGTCCTTCCCCGAGG
GCTTCAAGTGGGAGCGCGTGATGAACTTCGAGGACGGCGGCGTGGTGAC
CGTGACCCAGGACTCCTCCCTGCAGGACGGCGAGTTCATCTACAAGGTGA
AGCTGCGCGGCACCAACTTCCCCTCCGACGGCCCCGTAATGCAGAAGAA
GACCATGGGCTGGGAGGCCTCCTCCGAGCGGATGTACCCCGAGGACGGC
GCCCTGAAGGGCGAGATCAAGCAGAGGCTGAAGCTGAAGGACGGCGGCC
ACTACGACGCTGAGGTCAAGACCACCTACAAGGCCAAGAAGCCCGTGCAG
CTGCCCGGCGCCTACAACGTCAACATCAAGTTGGACATCACCTCCCACAA
CGAGGACTACACCATCGTGGAACAGTACGAACGCGCCGAGGGCCGCCAC
TCCACCGGCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAATGAAGTTCCTATACTTTC
TAGAGAATAGGAACTTCCGGTTAACCGGTGATTGTATTTTTCTCATGCGAT
GTGTGTAAAAAAACTGATATTATATAAATATTTTAGTGCCGTATAATGAAGA
TGACGATGAAAATGATGGTACATATATATTTCGTATCATTATTGTTATTGCTA
TTCCACAGTTACGCCATAGACATCGAAAATGAAATCACAGAATTCTTCAATA
AAATGAGAGATACTCTACCAGCTAAAGACTCTAAATGGTTGAATCCAGCAT
GTATGTTCGGAGGCACAATGAATGATATAGCCGCTCTAGGAGAGCCATTC
AGCGCAAAGTGTCCTCCTATTGAAGACAGTCTTTTATCGCACAGATATAAA
GACTATGTGGTTAAATGGGAGAGGCTAGAAAAAAATAGACGGCGACAGGT
TTCTAATAAACGTGTTAAACATGGTGATTTATGGATAGCCAACTATACATCT
AAATTCAGTAACCGTAGGTATTTGTGTACCGTAACTACAAAGAATGGTGAC
TGTGTTCAGGGTATAGTTAGATCTCATATTAAAAAACCTCCTTCATGCATTC
CAAAAACATATGAACTAGGTACTCATGATAAGTATGGCATAGACTTATACTG

TGGAATTCTTTACGCAAAACATTATAATAATATAACTTGGTATAAAGATAATA
AGGAAATTAATATCGACGATATTAAGTATTCACAAACGGGAAAGAAATTAAT
TATTCATAATCCAGAGTTAGAAGATAGTGGAAGATACAACTGTTACGTTCAT
TACGACGACGTTAGAATCAAGATGTAAAATACTTACGGTTATACCGTCGCA
AGACCACAGGTTTAAACTAATACTAGATCCAAAAATCAACGTAACGATAGG
AGAACCTGCCAATATAACATGCACTGCTGTGTCAACGTCATTATTGATTGA
CGATGTACTGATTGAATGGGAAAATCCATCCGGATGGCTTATAGGATTCGA
TTTTGATGTATACTCTGTTTTAACTAGTAGAGGCGGTATCACCGAGGCGAC
CTTGTACTTTGAAAATGTTACTGAAGAATATATAGGTAATACATATAAATGT
CGTGGACACAACTATTATTTTGAAAAAACCCTACAACTACAGTAGTATTGGA
GTCCTTTTCACGTAGAAAGCCAGTCCGCAGAAACGGTGCTGACCCCGGAT
GAATGTCAGCTACTGGGCTATCTGGACAAGGGAAAACGCAAGCGCAAAGA
GAAAGCAGGTAGCTTGCAGTGGGCTTACATGGCGATAGCTAGACTGGGCG
GTTTTATGGACAGCAAGCGAACCGGAATTGCCAGCTGGGGCGCCCTCTGG
TAAGGTTGGGAAGCCCTGCAAAGTAAACTGGATGGCTTTCTCGCCGCCAA
GGATCTGATGGCGCAGGGGATCAAGCTCTGATCAAGAGACAGGATGAGG
ATCGTTTCGCATGATTGAACAAGATGGATTGCACGCAGGTTCTCCGGCCG
CTTGGGTGGAGAGGCTATTCGGCTATGACTGGGCACAACAGACAATCGGC
TGCTCTGATGCCGCCGTGTTCCGGCTGTCAGCGCAGGGGCGCCCGGTTC
TTTTTGTCAAGACCGACCTGTCCGGTGCCCTGAATGAACTGCAAGACGAG
GCAGCGCGGCTATCGTGGCTGGCCACGACGGGCGTTCCTTGCGCAGCTG
TGCTCGACGTTGTCACTGAAGCGGGAAGGGACTGGCTGCTATTGGGCGAA
GTGCCGGGGCAGGATCTCCTGTCATCTCACCTTGCTCCTGCCGAGAAAGT
ATCCATCATGGCTGATGCAATGCGGCGGCTGCATACGCTTGATCCGGCTA
CCTGCCCATTCGACCACCAAGCGAAACATCGCATCGAGCGAGCACGTACT
CGGATGGAAGCCGGTCTTGTCGATCAGGATGATCTGGACGAAGAGCATCA
GGGGCTCGCGCCAGCCGAACTGTTCGCCAGGCTCAAGGCGAGCATGCCC
GACGGCGAGGATCTCGTCGTGACCCATGGCGATGCCTGCTTGCCGAATAT
CATGGTGGAAAATGGCCGCTTTTCTGGATTCATCGACTGTGGCCGGCTGG

GTGTGGCGGACCGCTATCAGGACATAGCGTTGGCTACCCGTGATATTGCT
GAAGAGCTTGGCGGCGAATGGGCTGACCGCTTCCTCGTGCTTTACGGTAT
CGCCGCTCCCGATTCGCAGCGCATCGCCTTCTATCGCCTTCTTGACGAGT
TCTTCTGAATTATTAACGCTTACAATTTCCTGATGCGGTATTTTCTCCTTAC
GCATCTGTGCGGTATTTCACACCGCATACAGGTGGCACTTTTCGGGGAAA
TGTGCGCGGAACCCCTATTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAA
AAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCT
TGCAAACAAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTTTGCCGGATCAA
GAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATA
CCAAATACTGTCCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAAC
TCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCT
GCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATA
GTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACA
CAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCG
TGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGG
TATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTC
CAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTCGGGTTTCGCCACCTC
TGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATG
GAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGGCTTTTGCTGGC
CTTTTGCTCACATGTTCTTTCCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCG
TATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCG
AGCGCAGCGAGTCA

MYXVΔM31R

[0484] Mixoma M31R é ortólogo para VACV E5R (*consulte* **FIG. 88B**). A divulgação da presente tecnologia se refere a um vírus mixoma mutante M31R (*ou seja*, MYXVΔM31R; MYXV compreendendo uma deleção M31R; MYXV geneticamente modificado para compreender um gene M31R mutante) ou composições imunogênicas compreendendo o vírus e seu uso como imunoterapêutico contra o câncer. Em algumas modalidades, o vírus MYXVΔM31R é projetado para expressar um ou mais genes específicos de

interesse (SG), como OX40L, para uso como imunoterápico contra o câncer (MYXVΔM31R-OX40L). Em algumas modalidades, o vírus mixoma é derivado da cepa Lausanne (fornecido por, por *exemplo*, GenBank No. de Acesso AF170726.2). Em algumas modalidades, o gene M31R do vírus mixoma, por meio de técnicas de recombinação homóloga, é projetado para conter uma interrupção que compreende uma sequência de ácido nucleico heteróloga compreendendo um ou mais cassetes de expressão, que resultam em um nocaute M31R de modo que o gene M31R não seja expresso, expressa em níveis tão baixos que não têm efeito, ou a proteína expressa não é funcional (*por exemplo*, é uma mutação nula). Em algumas modalidades, o mutante ΔM31R inclui uma sequência de ácido nucleico heterólogo no lugar de toda ou a maioria da sequência do gene M31R. Por exemplo, em algumas modalidades, a sequência de ácido nucleico correspondente à posição de M31R no genoma de MYXV (*por exemplo*, posição 30.138 a 31.319 do genoma de mixoma) é substituída por uma sequência de ácido nucleico heteróloga compreendendo uma estrutura de leitura aberta que codifica um específico gene de interesse (SG), como OX40L humano, resultando em MYXVΔM31R-OX40L. Em algumas modalidades, o cassete de expressão compreende uma única estrutura de leitura aberta que codifica hFlt3L, resultando em MYXVΔM31R-hFlt3L.

[0485] Adicionalmente ou alternativamente, em algumas modalidades, MYXVΔM31R é manipulado para expressar OX40L e hFlt3L. Em algumas modalidades, o gene da timidina quinase (TK) do vírus mixoma (*por exemplo*, posição 57.797 a 58.333 do genoma do mixoma), por meio de recombinação homóloga, é projetado para conter uma interrupção que compreende uma sequência de ácido nucleico heteróloga compreendendo um ou mais cassetes de expressão, que resulta em um nocaute do gene TK de modo que o gene TK não seja expresso, expresso em níveis tão baixos que não têm efeito, ou a proteína expressa não é funcional (*por exemplo*, é uma mutação nula). O vírus MYXVΔM31R-TK(-) resultante é ainda modificado para

compreender uma ou mais cassetes de expressão que são flanqueados por uma sequência parcial do gene TK (TK-L e TK-R) em ambos os lados. Em algumas modalidades, o cassete de expressão compreende uma única estrutura de leitura aberta que codifica um gene específico de interesse (SG), como OX40L usando o promotor precoce e tardio sintético viral de vaccinia (PsE/L), resultando em MYXVΔM31R-TK(-)-OX40L. Em algumas modalidades, o vírus recombinante é ainda modificado no locus M31R, por meio de técnicas de recombinação homóloga, para conter uma interrupção que compreende uma sequência de ácido nucleico heterólogo compreendendo um ou mais cassetes de expressão, que resultam em um nocaute de M31R de modo que o gene M31R não seja expresso, expresso em níveis tão baixos que não têm efeito, ou a proteína expressa não é funcional (*por exemplo*, é uma mutação nula). Em algumas modalidades, o cassete de expressão compreende uma única estrutura de leitura aberta que codifica um gene específico de interesse (SG), como hFlt3L, resultando em MYXVΔM31R-hFlt3L-TK(-)-OX40L. Em algumas modalidades, o cassete de expressão que codifica OX40L é inserido no locus M31R, enquanto o cassete de expressão que codifica hFlt3L é inserido no locus TK. Em algumas modalidades, um vírus MYXVΔM31R-anti-CTLA-4-hFlt3L-TK(-) é ainda modificado para codificar OX40L, resultando em MYXVΔM31R-anti-CTLA-4-TK(-)-hFlt3L-OX40L. Em algumas modalidades, o vírus MYXVΔM31R-anti-CTLA-4-TK(-)-hFlt3L-OX40L é ainda modificado para expressar hIL-12, resultando em MYXVΔM31R-anti-CTLA-4-TK(-)-hFlt3L-OX40L-hIL-12.

[0486] Em algumas modalidades, os vírus MYXVΔM31R recombinantes geneticamente modificado descrito acima são modificados para expressar pelo menos um outro gene heterólogo, tal como qualquer um ou mais de hOX40L, hFlt3L, hIL-2, hIL-12, hIL-15, hIL-15/IL-15Rα, hIL-18, hIL-21, anti-huCTLA-4, anti-huPD-1, anti-huPD-L1, GITRL, 4-1BBL, ou CD40L, e/ou incluir pelo menos uma outra mutação ou deleção de gene viral, como qualquer uma ou mais dentre as seguintes deleções: E3L (ΔE3L); E3LΔ83N; C7 (ΔC7L);

B2R (ΔB2R), B19R (B18R; ΔWR200); E5R; K7R; C12L (IL18BP); B8R; B14R; N1L; C11R; K1L; M1L; N2L; e/ou WR199. Em outras modalidades, nenhum outro gene heterólogo é adicionado além daqueles fornecidos no nome do vírus aqui (*por exemplo*, OX40L ou OX40L e hFlt3L), e/ou nenhum outro gene viral diferente de M31R ou M31R e TK são interrompidos ou deletados.

[0487] Embora em certas modalidades descritas acima, o transgene possa ser inserido no locus TK, dividindo o gene TK e obliterando-o, outros loci de integração adequados podem ser selecionados. Por exemplo, MYXV codifica vários genes imunomoduladores, incluindo, mas não se limitando a C7, C11, K3, F1, F2, F4, F6, F8, F9, F11, F14.5, J2, A46, E3L, B18R (WR200), E5R, K7R, C12L, B8R, B14R, N1L, C11R, K1L, C16, M1L, N2L, e WR199. Consequentemente, em algumas modalidades, esses genes podem ser deletados para aumentar as propriedades de ativação reações imunológicas do vírus e permitir a inserção de transgenes.

[0488] Adicionalmente ou alternativamente, em algumas modalidades, a sequência de ácido nucleico heterólogo compreende um cassete de expressão compreendendo duas ou mais estruturas de leitura aberta que codificam dois ou mais genes específicos de interesse, separados por uma sequência de nucleotídeos que codifica, na direção 5’ para 3', um sítio de clivagem de protease (*por exemplo*, um sítio de clivagem de furina) e uma sequência de peptídeo 2A (Pep2A). Por exemplo, em algumas modalidades, MYXVΔM31R abrange um vírus MYXV recombinante em que toda ou a maioria da sequência do gene M31R é substituída por um primeiro gene específico de interesse (*por exemplo*, hFtl3L) e um segundo gene específico de interesse (*por exemplo*, OX40L), em que as sequências de codificação do primeiro e do segundo genes específicos de interesse são separadas por um cassete incluindo um sítio de clivagem de furina, seguido por uma sequência de peptídeo 2A (Pep2A), formando assim um vírus recombinante, como MYXVΔM31R-hFlt3L-OX40L.

[0489] Em algumas modalidades, a sequência de nucleotídeos heterólogos compreende ainda um cassete de expressão adicional que compreende uma estrutura de leitura aberta que codifica um marcador selecionável operacionalmente ligado a um promotor que é capaz de dirigir a expressão do marcador selecionável. Em algumas modalidades, o marcador selecionável é um gene da xantina-guanina fosforibosil transferase (gpt). Em algumas modalidades, o marcador selecionável é um gene de proteína fluorescente verde (GFP). Em algumas modalidades, o marcador selecionável é um gene mCherry que codifica uma proteína fluorescente vermelha.

MYXVΔM63R e MYXVΔM64R

[0490] A divulgação da presente tecnologia se refere a um vírus mixoma mutante M63R (*ou seja*, MYXVΔM63R; MYXV compreendendo uma deleção de M63R; MYXV geneticamente modificado para compreender um gene M63R mutante) e um vírus mixoma mutante M64R (*ou seja*, MYXVΔM64R, MYXV compreendendo uma deleção de M64R; MYXV geneticamente modificado para compreender um gene M64R mutante) ou composições imunogênicas compreendendo os vírus e seu uso como imunoterapêutico contra o câncer. Em algumas modalidades, os mutantes M63R ou M64R são inseridos em um genoma MYXVΔM127 mCherry (*ver, por exemplo*, **FIG. 170**). Em algumas modalidades, o vírus MYXVΔM63R ou MYXVΔM64R é modificado para expressar um ou mais genes específicos de interesse (SG), tais como aqueles divulgados neste documento, para uso como um imunoterapêutico contra o câncer. Em algumas modalidades, o vírus mixoma é derivado da cepa Lausanne (fornecido por, por *exemplo*, GenBank No. de Acesso AF170726.2). Em algumas modalidades, o gene M63R ou M64R do vírus mixoma, por meio de técnicas de recombinação homóloga, é projetado para conter uma interrupção que compreende uma sequência de ácido nucleico heteróloga compreendendo um ou mais cassetes de expressão, que resultam em um nocaute M63R ou M64R de modo que o gene M63R ou M64R não seja expresso, expressa em níveis tão baixos que não têm efeito, ou

a proteína expressa não é funcional (*por exemplo*, é uma mutação nula). Em algumas modalidades, o mutante ΔM63R ou ΔM64R inclui uma sequência de ácido nucleico heteróloga (*por exemplo*, uma sequência de ácido nucleico heteróloga compreendendo uma estrutura leitura aberta que codifica um gene específico de interesse (SG)).

[0491] Em algumas modalidades, os vírus MYXVΔM63R ou MYXVΔM64R recombinantes geneticamente modificado descrito acima são modificados para expressar pelo menos um outro gene heterólogo, tal como qualquer um ou mais de hOX40L, hFlt3L, hIL-2, hIL-12, hIL-15, hIL-15/IL-15Rα, hIL-18, hIL-21, anti-huCTLA-4, anti-huPD-1, anti-huPD-L1, GITRL, 4-1BBL, ou CD40L, e/ou incluir pelo menos uma outra mutação ou deleção de gene viral, como qualquer uma ou mais dentre as seguintes deleções: E3L (ΔE3L); E3LΔ83N; C7 (ΔC7L); B2R (ΔB2R), B19R (B18R; ΔWR200); E5R; K7R; C12L (IL18BP); B8R; B14R; N1L; C11R; K1L; M1L; N2L; e/ou WR199. Em outras modalidades, nenhum outro gene heterólogo é adicionado além daqueles fornecidos no nome do vírus, e/ou nenhum outro gene viral diferente de M63R ou M64R são interrompidos ou deletados.

[0492] Em algumas modalidades, a sequência de nucleotídeos heterólogos compreende ainda um cassete de expressão adicional que compreende uma estrutura de leitura aberta que codifica um marcador selecionável operacionalmente ligado a um promotor que é capaz de dirigir a expressão do marcador selecionável. Em algumas modalidades, o marcador selecionável é um gene da xantina-guanina fosforibosil transferase (gpt). Em algumas modalidades, o marcador selecionável é um gene de proteína fluorescente verde (GFP). Em algumas modalidades, o marcador selecionável é um gene mCherry que codifica uma proteína fluorescente vermelha.

[0493] Exemplos não limitativos de estruturas de leitura aberta de construto de MVAΔ63R e MVAΔ64R de acordo com a presente tecnologia são mostrados em SEQ ID NOs: 39 e 40 (**Tabela 9**).

TABELA 9
Sequências de nucleotídeos exemplares para as estruturas de leitura aberta dos construtos de MVAΔ63R e MVAΔ64R recombinantes da presente tecnologia.
Sequência de ácido nucleico do plasmídeo pUC57-dM63-GFP (SEQ ID NO: 40) TCGCGCGTTTCGGTGATGACGGTGAAAACCTCTGACACATGCAGCTCCCG GAGACGGTCACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCC GTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTTGGCGGGTGTCGGGGCTGGCTTAACTA TGCGGCATCAGAGCAGATTGTACTGAGAGTGCACCATATGCGGTGTGAAA TACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAATACCGCATCAGGCGCCATTCGCCA TTCAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTCTTCGC TATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGG GTAACGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGA ATTCGAGCTCGGTACCCATCAAAATAAAATTGGATAAGGAAAAGACGTTCA AATTCGTCATCGTATTGGAACCGGAGTGGATAGATGAGATAAAACCTATAT ACATGAAAGTTAACGACGAGTCGGTGGAGTTAGAATTAGACTATAAAGACG CCATCAAACGCATCTATTCGGCGGAGGTGGTATTATGTTCAGATTCCGTGA TCAACCTGTTCAGTGACGTCGACGTGTCTTATACGTGCGAATACCCTACGA TTAAGGTGAATACGATAAAAAAATACTACAGCGTACAGAACAGAGGGATGA CCTACGTACATATAGAATCGCCCATTAATACGAAAGATAAATGCTGGTTCG TGGAAAAGAACGGATGGTACGAGGATAGAACACATTCGTAATTTTTTTATAT AGTGAAAAATAATGTGAGCATTACGAGCGTGGGTTTATCTACACGGCTAGC AAAAATTGAAATTTTATTTTTTTTTTTTGGAATATAAATAAGCTCGAAGTCGA CAGATCTAGGCCTGGTACCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCACC GGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACA AGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCT GACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCA CCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCC GACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTA

CGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCC
GCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCT
GAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTG
GAGTACAACTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAA
GAACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCA
GCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGCGACGG
CCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGA
GCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTG
ACCGCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAAAGCTA
GCGATCAGGCCTTTTTTTTTATTGAAAAATAATAGTAAGAAAACGTTGCCGT
AAACATGGAGGAGGGTATCGTGCATAAATTAGACGTGTTTCTCATCGACGA
AAACGTGTCTATAAAACACGTTAATTTGTTCGACGGGGATAGTTACGGGTG
CAACATCCATTTAAAGACCGCCACGTGTAAGTACATCACCTTTATATTAGTC
TTAGAACCCGATTGGGAGAACATAGTCGAGGCAAAACCCATTCACATGAG
ATTGAACGGCAAAAAGATACGCGTACCACTCGTAGCAAAAACCCACACGT
CACTTATTTATAAAGTCGTTATCTACGTGGAGGAAGACGCCCTCGCACGAT
TCTACAGCGACGTGGAAAGGTCGTACACGGACGTGTATCCCACGTTTCTA
GTCAATACGGATACGCGACGTTATTACATTTTGGATAGCGGACGGACGTAT
ACGTACATAGATCCGTTTATATCGGACGAAGCTTGGCGTAATCATGGTCAT
AGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACAACATAC
GAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAA
CTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTG
TCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTT
TGCGTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCG
GTCGTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACG
GTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAG
GCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTC
CATAGGCTCCGCCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCA
GAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTG

GAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATAC
CTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACG
CTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTG
TGCACGAACCCCCCGTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTAT
CGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGC
CACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGT
TCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTA
TCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTT
GATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGTTTGCAAG
CAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTT
TCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACTCACGTTAAGGGATTTT
GGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAAAAA
TGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTT
ACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTCGTT
CATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAG
GGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTC
ACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGC
GCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTT
GCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCGCAACGTT
GTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTCACGCTCGTCGTTTGGTATGGC
TTCATTCAGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCCAT
GTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCCTCCGATCGTTGTCAGAA
GTAAGTTGGCCGCAGTGTTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATT
CTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACT
CAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGC
CCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGT
GCTCATCATTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACTCTCAAGGATCTTACC
GCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGATCTTC
AGCATCTTTTACTTTCACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCA

AAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCA TACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATG AGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCG CGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTCTAAGAAACCATTATTATC ATGACATTAACCTATAAAAATAGGCGTATCACGAGGCCCTTTCGTC
Sequência de ácido nucleico do plasmídeo pUC57-dM64-GFP (SEQ ID NO: 41) TCGCGCGTTTCGGTGATGACGGTGAAAACCTCTGACACATGCAGCTCCCG GAGACGGTCACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCC GTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTTGGCGGGTGTCGGGGCTGGCTTAACTA TGCGGCATCAGAGCAGATTGTACTGAGAGTGCACCATATGCGGTGTGAAA TACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAATACCGCATCAGGCGCCATTCGCCA TTCAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTCTTCGC TATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGG GTAACGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGA ATTCGAGCTCGGTACCATGGAACTGATAAAATCTTTACACACGTCCACGGA CTTAACGGTCTACAGAACATCAATGCTCCATCACCGTAATATGCCCGAGAA GGAGTACTGCTTCACGCAGATATACTCGGCTACGTTAAACATAGACACCAA GTCGACCGTCAGTTTTCGTAGTACGATACACGACGGGTTTCTTTCGACGTA TCCGACGATCTACATTAATCCGGAGGAAAAATATTACAAAGTCCAGAACAA AGGACGTCTGCGGATGCGGGTGGTTACACCTATCTTAAACAGCGACAAAC TACAGTTCATGGATAAGGGCGAGATGTATGCGGGTGTCGGCGACGACCCA TCGATCGTAGACAGTAGCGATAGCGACGATTATACCAGCAGTGAGGAAGA CACGGAGGAGGAAGACACGGAGGAGGAAGAAGATTGATTTTTTTTATTGA AAAATAATAGTAAGAAAACGTTGCCGTAAACGCTAGCAAAAATTGAAATTTT ATTTTTTTTTTTTGGAATATAAATAAGCTCGAAGTCGACAGATCTAGGCCTG GTACCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCACCGGGGTGGTGCCCAT CCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCC GGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCA TCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCACCCTCGTGACCAC

CCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGC
AGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGC
ACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAA
GTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGAC
TTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACTACAA
CAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGG
TGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCC
GACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGC
CCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAAC
GAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGA
TCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAAAGCTAGCGATCAGGCCTG
TTTTTATTATAATGATTTTTAAATTTAAACGTTATTAAAAATGGAACCGGTAT
CTATGGACAAACCCTTTATGTACTTCGATGAAATAGACGATGAATTAGAGTA
TGAACCCGAAAGCGTTAACGAAACACCTAAAAAACTCCCCCACCAGGGGC
AGTTGAAATTATTGCTAGGCGAGTTGTTTTTTCTAAGTAAATTACAACGCCA
CGGCATTTTAGACGGATCCACGATCGTGTATATAGGATCCGCTCCCGGCA
CCCACATCAAATACTTACGCGATCATTTTATGTCTATGGGATTGGTTATTAA
ATGGATGTTGATCGACGGACGCACGCACGATCCCATCCTTGAAGGATTAC
GCGACGTAATTCTCATTACCAAGTTCGTCGACGAGGCGTACATTCGACAGT
TGAAGAAACAACTGTATCCGTCTAGGGTTATTCTCATTTCGGACGTGCGCT
CGAAACGGGGACAGAAAAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCT
GTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGC
ATAAAGTGTAAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATT
GCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCT
GCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCGTATTGGG
CGCTCTTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTCGGCT
GCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAG
AATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAG
GCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCG

CCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAA
ACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTC
GTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTT
TCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCT
CAGTTCGGTGTAGGTCGTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCC
CCGTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCC
AACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAG
GATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGT
GGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGC
TGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAAC
AAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGC
GCAGAAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTG
ACGCTCAGTGGAACGAAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTAT
CAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAAAAATGAAGTTTTAAATCA
ATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCA
GTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTCGTTCATCCATAGTTGCCT
GACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGC
CCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTT
ATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCT
GCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGA
GTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCGCAACGTTGTTGCCATTGCTACA
GGCATCGTGGTGTCACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGG
TTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGC
GGTTAGCTCCTTCGGTCCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGCAG
TGTTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCATGCC
ATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTG
AGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATACGGG
ATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGGAAAAC
GTTCTTCGGGGCGAAAACTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTT

CGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTCA
CCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAG
GGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTTCAA
TATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTG
AATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAA
AAGTGCCACCTGACGTCTAAGAAACCATTATTATCATGACATTAACCTATAA
AAATAGGCGTATCACGAGGCCCTTTCGTC

XI. Melanoma

[0494] O melanoma, um dos cânceres mais mortais, é o câncer que mais cresce nos Estados Unidos e no mundo. Na maioria dos casos, o melanoma avançado é resistente às terapias convencionais, incluindo quimioterapia e radiação. Como resultado, pessoas com melanoma metastático têm um prognóstico muito ruim, com expectativa de vida de apenas 6 a 10 meses. A descoberta de que cerca de 50% dos melanomas têm mutações no BRAF (um gene promotor de tumores chave) abriu as portas para uma terapia direcionada para esta doença. Os primeiros ensaios clínicos com inibidores BRAF mostraram respostas notáveis, mas infelizmente não sustentáveis, em pacientes com melanomas com mutações BRAF. Portanto, estratégias alternativas de tratamento para esses pacientes, bem como outros com melanoma sem mutações BRAF, são urgentemente necessárias.

[0495] Dados patológicos humanos indicam que a presença de infiltrados de células T nas lesões de melanoma se correlaciona positivamente com a sobrevida mais longa do paciente (Oble *et al., Cancer Immun.* 9:3 (2009)). A importância do sistema imunológico na proteção contra o melanoma é ainda sustentada pelo sucesso parcial de imunoterapias, como os ativadores imunológicos IFN-α2b e IL-2 (Lacy *et al., Expert Rev. Dermatol.* 7 (1): 51-68 (2012)), bem como as respostas clínicas sem precedentes de pacientes com melanoma metastático à terapia de ponto de verificação imunológico, incluindo anti-CTLA-4 e anti-PD-1/PD-L1 como um agente sozinho ou em terapia de combinação (Sharma & Allison, *Science* 348 (6230) ”56-61 (2015); Hodi *et al*.,

NEJM 363 (8): 711-723 (2010); Wolchok *et al*., *Lancet Oncol*. 11(6) :155-164 (2010); Topalian *et al*., *NEJM* 366(26) :2443-2454 (2012); Wolchok *et al*., *NEJM* 369(2): 122-133 (2013); Hamid *et al*., *NEJM* 369(2) :134-144 (2013); Tumeh *et al*., *Nature* 515(7528) :568-571 (2014)). No entanto, muitos pacientes não respondem apenas à terapia de bloqueio do ponto de verificação imunológico.

XII. IFN tipo I e a via de detecção de DNA citosólica na imunidade tumoral

[0496] O IFN tipo I desempenha papéis importantes na imunidade antitumoral do hospedeiro (Fuertes *et al*., *Trends Immunol.* 34:67-73 (2013)). Camundongos deficientes em IFNAR1 são mais suscetíveis a desenvolver tumores após a implantação de células de tumor; A iniciação espontânea de células T específicas de tumor também é defeituosa em camundongos deficientes em IFNAR1 (Diamond *et al.*, *J. Exp. Med.* 208:1989-2003 (2011); Fuertes *et al.*, *J. Exp. Med.* 208:2005-2016 (2011)). Estudos mais recentes mostraram que a via de detecção de DNA citosólico é importante na detecção reações imunológicas inata de DNA derivado de tumor, o que leva ao desenvolvimento de imunidade de células $CD8^+$ T *anti tumorais (Woo et al.*, *Immunity* 41: 830-842 (2014)). Esta via também desempenha um papel na imunidade anti tumoral induzida por radiação (Deng *et al.*, *Immunity* 4: 843-852 (2014)). Embora as respostas de células T antitumorais espontâneas possam ser detectadas em pacientes com câncer, os cânceres eventualmente superam a imunidade antitumoral do hospedeiro na maioria dos pacientes. Novas estratégias para alterar o microambiente imunossupressor do tumor seriam benéficas para a terapia do câncer.

XIII. Resposta imunológica

[0497] Além da indução da resposta imunológica pela regulação positiva de atividades do sistema imunológico específicas (como a produção de anticorpos e/ou citocinas ou ativação da imunidade mediada por células), as respostas imunológicas também podem incluir supressão, atenuação ou qualquer outra diminuição regulação da imunidade detectável, de modo a

restabelecer a homeostase e prevenir danos excessivos aos próprios órgãos e tecidos do hospedeiro. Em algumas modalidades, uma resposta imunológica que é induzida de acordo com os métodos da presente divulgação gera células T efetoras (*por exemplo*, auxiliares, assassinas, células T reguladoras). Em algumas modalidades, uma resposta imunológica que é induzida de acordo com os métodos da presente divulgação gera células $CD8^+$ T efetoras (anti-tumor citotóxico $CD8^+$) ou células T auxiliares ativadas (T_H) (*por exemplo*, células $CD4^+$ T efetoras), ou ambas que podem causar direta ou indiretamente a morte, ou perda da capacidade de propagação, de uma célula tumoral.

[0498] A indução de uma resposta imunológica pelas composições e métodos da presente divulgação pode ser determinada pela detecção de qualquer um de uma variedade de parâmetros reações imunológicass bem conhecidos (Takaoka *et al*., *Cancer Sci*. 94:405-11 (2003); Nagorsen *et al*., *Crit. Rev. Immunol*. 22:449-62 (2002)). A indução de uma resposta imunológica pode, portanto, ser estabelecida por qualquer um de uma série de ensaios bem conhecidos, incluindo ensaios reações imunológicass. Tais ensaios incluem, mas não precisam estar limitados a, *in vivo*, *ex vivo*, ou *determinação in vitro* de imunoglobulinas ou anticorpos solúveis; mediadores solúveis, tais como citocinas, quimiocinas, hormônios, fatores de crescimento e similares, bem como outros pequenos peptídeos solúveis, carboidratos, nucleotídeos e/ou mediadores de lipídeos; alterações do estado de ativação celular, conforme determinado por propriedades funcionais ou estruturais alteradas das células do sistema imunológico, por exemplo, proliferação celular, motilidade alterada, gradiente ou concentração catiônica intracelular alterada (tal como cálcio); fosforilação ou desfosforilação de polipeptídeos celulares; indução de atividades especializadas, como expressão de genes específicos ou comportamento citolítico; diferenciação celular por células do sistema imunológico, incluindo perfis de expressão de antígeno de superfície alterados ou o início da apoptose (morte celular programada); ou qualquer outro critério pelo qual a presença de uma resposta imunológica possa ser detectada. Por

exemplo, os marcadores de superfície celular que distinguem tipos de células imunológicas podem ser detectados por anticorpos específicos que se ligam a células $CD4^+$, $CD8^+$ ou NK. Outros marcadores e componentes celulares que podem ser detectados incluem, mas não estão limitados a interferon γ (IFN-γ), fator de necrose tumoral (TNF), IFN-α, IFN-β (IFNB), IL-6 e CCL5. Os métodos comuns para detectar a resposta imunológica incluem, mas não estão limitados a, citometria de fluxo, ELISA, imunohistoquímica. Os procedimentos para realizar estes e outros ensaios similares são amplamente conhecidos e podem ser encontrados, por exemplo, em Letkovits (Immunology Methods Manual: The Comprehensive Sourcebook of Techniques, Current Protocols in Immunology, 1998).

XIV. <u>Composições e preparações farmacêuticas da present tecnologia</u>

[0499] São divulgadas neste documento composições farmacêuticas que compreendem MVAΔE3L-OX40L, MVAΔC7L-OX40L, MVAΔC7L-hFlt3L-OX40L, MVAΔC7LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, VACVΔC7L-OX40L, VACVΔC7L-hFlt3L-OX40L, VACVΔE5R, VACV-TK^--anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L, VACVΔB2R, VACVE3LΔ83NΔB2R, VACVΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83NΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12-ΔB2R, MYXVΔM31R, MYXVΔM31R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM63R, MYXVΔM64R, MVAΔWR199, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔWR199, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12ΔC11R, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12ΔC11R-hIL-15/IL-15α, VACVΔE5R-IL-15/IL-15Rα, VACVΔE5R-IL-15/IL-15Rα-OX40L, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200-hIL-15/IL-15Rα, VACVΔE3L83N-ΔTK-

anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200ΔC11R, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200-hIL-15/IL-15RαΔC11R, MYXVΔM63RΔM64R, MYXVΔM62R, MYXVΔM62RΔM63RΔM64R, MYXVΔM31R, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R, MYXVΔM63RΔM64R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-IL-15/IL-15Rα, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-anti-CTLA-4, e/ou MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-IL-15/IL-15Rα-anti-CTLA-4 que pode conter um veículo ou diluente, que pode ser um solvente ou meio de dispersão contendo, por exemplo, água, solução salina, tampão Tris, poliol (por exemplo, glicerol, propilenoglicol e polietilenoglicol líquido e similares), misturas adequadas destes e óleos vegetais A fluidez adequada pode ser mantida, por exemplo, pelo uso de um revestimento como a lecitina, pela manutenção do tamanho de partícula necessário no caso de dispersão e pelo uso de surfactantes. A prevenção da ação de microrganismos pode ser realizada por vários agentes antibacterianos e antifúngicos e conservantes, por exemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal e similares. Em algumas modalidades, agentes isotônicos, por exemplo, açúcares ou cloreto de sódio, e agentes tamponantes estão incluídos. A absorção prolongada das composições injetáveis pode ser conseguida pelo uso nas composições de agentes que retardam a absorção, por exemplo, monoestearato de alumínio e gelatina ou moléculas veículos. Outros excipientes podem incluir agentes molhantes ou emulsionantes. Em geral, excipientes adequados para preparações injetáveis podem ser incluídos como aparente para aqueles versados na técnica.

[0460500] Composições e preparações farmacêuticas que compreendem MVAΔE3L-OX40L, MVAΔC7L-OX40L, MVAΔC7L-hFlt3L-

OX40L, MVAΔC7LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, VACVΔC7L-OX40L, VACVΔC7L-hFlt3L-OX40L, VACVΔE5R, VACV-TK$^-$-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L, VACVΔB2R, VACVE3LΔ83NΔB2R, VACVΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83NΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12-ΔB2R, MYXVΔM31R, MYXVΔM31R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM63R, MYXVΔM64R, MVAΔWR199, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔWR199, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12ΔC11R, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12ΔC11R-hIL-15/IL-15α, VACVΔE5R-IL-15/IL-15Rα, VACVΔE5R-IL-15/IL-15Rα-OX40L, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200-hIL-15/IL-15Rα, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200ΔC11R, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200-hIL-15/IL-15RαΔC11R, MYXVΔM63RΔM64R, MYXVΔM62R, MYXVΔM62RΔM63RΔM64R, MYXVΔM31R, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R, MYXVΔM63RΔM64R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-IL-15/IL-15Rα, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-anti-CTLA-4, e/ou MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-IL-15/IL-15Rα-anti-CTLA-4 pode ser fabricado por meio de processos convencionais de mistura, dissolução, granulação, emulsificação, encapsulação, aprisionamento ou liofilização. As composições virais farmacêuticas podem ser formuladas de maneira convencional usando um ou mais veículos, diluentes, excipientes ou

auxiliares fisiologicamente aceitáveis que facilitam a formulação de preparações de vírus adequadas para uso *in vitro*, *in vivo* ou *ex vivo*. As composições podem ser combinadas com um ou mais agentes biologicamente ativos adicionais e podem ser formuladas com um veículo, diluente ou excipiente farmaceuticamente aceitável para gerar composições farmacêuticas (incluindo biológicas) ou veterinárias da presente divulgação adequadas para administração parenteral ou intratumoral.

[0461501] Muitos tipos de formulação são possíveis como é apreciado por aqueles versados na técnica. O tipo particular escolhido depende da via de administração escolhida, como é bem reconhecido na técnica. Por exemplo, as formulações sistêmicas serão geralmente projetadas para administração por injeção, *por exemplo*, intravenosa, bem como aquelas modificadas para administração intratumoral. Em algumas modalidades, a formulação sistêmica ou intratumoral é estéril.

[0462502] As soluções injetáveis estéreis são preparadas por incorporação MVAΔE3L-OX40L, MVAΔC7L-OX40L, MVAΔC7L-hFlt3L-OX40L, MVAΔC7LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, VACVΔC7L-OX40L, VACVΔC7L-hFlt3L-OX40L, VACVΔE5R, VACV-TK$^-$-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L, VACVΔB2R, VACVE3LΔ83NΔB2R, VACVΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83NΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12-ΔB2R, MYXVΔM31R, MYXVΔM31R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM63R, MYXVΔM64R, MVAΔWR199, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔWR199, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12ΔC11R, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12ΔC11R-hIL-15/IL-15α, VACVΔE5R-IL-15/IL-15Rα, VACVΔE5R-IL-15/IL-15Rα-OX40L, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-

hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200-hIL-15/IL-15Rα, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200ΔC11R, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200-hIL-15/IL-15RαΔC11R, MYXVΔM63RΔM64R, MYXVΔM62R, MYXVΔM62RΔM63RΔM64R, MYXVΔM31R, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R, MYXVΔM63RΔM64R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-IL-15/IL-15Rα, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-anti-CTLA-4, e/ou MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-IL-15/IL-15Rα-anti-CTLA-4 na quantidade necessária do solvente apropriado com vários outros ingredientes enumerados neste documento, conforme necessário, seguido por meios de esterilização adequados. Geralmente, as dispersões são preparadas incorporando os vários ingredientes ativos esterilizados em um veículo estéril que contém o meio de dispersão básico e os outros ingredientes necessários daqueles enumerados acima. No caso de pós estéreis para a preparação de soluções injetáveis estéreis, os métodos de preparação preferenciais são técnicas de secagem a vácuo e de liofilização, que produzem um pó do vírus mais qualquer ingrediente adicional desejado de uma solução previamente esterilizada por filtração.

[0503] Em algumas modalidades, MVAΔE3L-OX40L, MVAΔC7L-OX40L, MVAΔC7L-hFlt3L-OX40L, MVAΔC7LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, VACVΔC7L-OX40L, VACVΔC7L-hFlt3L-OX40L, VACVΔE5R, VACV-TK$^-$-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L, VACVΔB2R, VACVE3LΔ83NΔB2R, VACVΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83NΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12-

ΔB2R, MYXVΔM31R, MYXVΔM31R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM63R, MYXVΔM64R, MVAΔWR199, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔWR199, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12ΔC11R, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12ΔC11R-hIL-15/IL-15α, VACVΔE5R-IL-15/IL-15Rα, VACVΔE5R-IL-15/IL-15Rα-OX40L, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200-hIL-15/IL-15Rα, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200ΔC11R, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200-hIL-15/IL-15RαΔC11R, MYXVΔM63RΔM64R, MYXVΔM62R, MYXVΔM62RΔM63RΔM64R, MYXVΔM31R, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R, MYXVΔM63RΔM64R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-IL-15/IL-15Rα, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-anti-CTLA-4, e/ou MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-IL-15/IL-15Rα-anti-CTLA-4 as composições da presente divulgação podem ser formuladas em soluções aquosas ou em soluções ou tampões fisiologicamente compatíveis, como solução de Hanks, solução de Ringer, soluções de manitol ou tampão salino fisiológico.. Em certas modalidades, qualquer um dentre MVAΔE3L-OX40L, MVAΔC7L-OX40L, MVAΔC7L-hFlt3L-OX40L, MVAΔC7LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, VACVΔC7L-OX40L, VACVΔC7L-hFlt3L-OX40L, VACVΔE5R, VACV-TK$^-$-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L, VACVΔB2R, VACVE3LΔ83NΔB2R, VACVΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83NΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12-

ΔB2R, MYXVΔM31R, MYXVΔM31R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM63R, MYXVΔM64R, MVAΔWR199, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔWR199, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12ΔC11R, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12ΔC11R-hIL-15/IL-15α, VACVΔE5R-IL-15/IL-15Rα, VACVΔE5R-IL-15/IL-15Rα-OX40L, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200-hIL-15/IL-15Rα, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200ΔC11R, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200-hIL-15/IL-15RαΔC11R, MYXVΔM63RΔM64R, MYXVΔM62R, MYXVΔM62RΔM63RΔM64R, MYXVΔM31R, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R, MYXVΔM63RΔM64R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-IL-15/IL-15Rα, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-anti-CTLA-4, e/ou MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-IL-15/IL-15Rα-anti-CTLA-4 composições podem conter agentes formuladores, tais como agentes de suspensão, estabilização, penetração ou dispersão, tampões, lioprotetores ou conservantes, tais como polietilenoglicol, polissorbato 80, 1-dodecilhexahidro-2H-azepin-2-ona (laurocapran), ácido oleico, citrato de sódio, Tris HCl, dextrose, propilenoglicol, manitol, polissorbato polietilenossorbitano monolaurato (Tween®-20), miristato de isopropil, álcool benzílico, álcool isopropílico, etanol sacarose, trealose e outros geralmente conhecidos na técnica podem ser usados em qualquer uma das composições da divulgação. (Pramanick *et al., Pharma Times* 45(3):65-76 (2013)).

[0504] As composições biológicas ou farmacêuticas da presente divulgação podem ser formuladas para permitir que o vírus nelas contido esteja

disponível para infectar células de tumor após a administração da composição a um indivíduo. O nível de vírus no soro, tumores e, se desejado, em outros tecidos após a administração, pode ser monitorado por várias técnicas bem estabelecidas, tais como ensaios baseados em anticorpos (*por exemplo*, ELISA, imunohistoquímica, *etc.*).

[0505] Os poxvírus projetados da presente tecnologia podem ser armazenados a -80°C com um título de 3,5 x10 ^{7} pfu/mL formulado em cerca de 10 mM Tris, 140 mM NaCl pH 7,7. Para a preparação de vacinas, *por exemplo* 10^2-10^8 ou 10^2-10^9 partículas virais podem ser liofilizadas em 100 mL de solução salina tamponada com fosfato (PBS) na presença de 2% de peptona e 1% de albumina humana em uma ampola, preferencialmente uma ampola de vidro. Alternativamente, as preparações injetáveis podem ser produzidas por liofilização em etapas do poxvírus projetado em uma formulação. Esta formulação pode conter aditivos adicionais, como manitol, dextrano, açúcar, glicina, lactose ou polivinilpirrolidona ou outros aditivos, como antioxidantes ou gás inerte, estabilizadores ou proteínas recombinantes (*por exemplo*, albumina de soro humano) adequados para administração *in vivo.* A ampola de vidro é então selada e pode ser armazenada entre 4°C e a temperatura ambiente por vários meses. Em algumas modalidades, a ampola é armazenada a temperaturas abaixo de -20°C.

[0506] Para terapia, o liofilizado pode ser dissolvido em uma solução aquosa, como soro fisiológico ou tampão Tris, e administrado por via sistêmica sistemicamente ou intratumoral. O modo de administração, a dose e o número de administrações podem ser otimizados por aqueles versados na técnica.

[0507] A composição farmacêutica de acordo com a presente divulgação pode compreender um adjuvante adicional. Conforme usado neste documento, o "adjuvante" se refere a uma substância que aumenta, aumenta ou potencializa a resposta imunológica do hospedeiro aos antígenos tumorais. Um adjuvante típico pode ser sais de alumínio, tais como hidróxido de alumínio ou fosfato de alumínio, Quil A, peptidoglicanos da parede celular bacteriana,

partículas similares a vírus, polissacarídeos, receptores similares a toll, nano contas, *etc.* (Aguilar *et al*., *Vaccine* 25:3752-3762 (2007)).

XV. Métodos terapêuticos da presente tecnologia

[0508] Em um aspecto, a presente divulgação fornece um método para tratar um tumor sólido em um indivíduo em necessidade, o método compreendendo a administração ao s indivíduo de uma quantidade eficaz de: um vírus vaccinia Ankara (MVA) modificado recombinante compreendendo uma deleção de E3L (MVAΔE3L) modificado geneticamente para expressar OX40L (MVAΔE3L-OX40L); um vírus MVA recombinante compreendendo uma deleção de C7L (MVAΔC7L) modificado geneticamente para expressar OX40L (MVAΔC7L-OX40L); um MVAΔC7L recombinante modificado para expressar OX40L e hFlt3L (MVAΔC7L-hFlt3L-OX40L); um MVA recombinante modificado geneticamente para compreender uma deleção de C7L, uma deleção de E5R e para expressar hFlt3L e OX40L (MVAΔC7LΔE5R-hFlt3L-OX40L); um MVA recombinante modificado geneticamente para compreender uma deleção de E5R (MVAΔE5R); um MVA recombinante modificado geneticamente para compreender uma deleção de E5R e expressar hFlt3L e OX40L (MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L); um vírus vaccinia recombinante compreendendo uma deleção de C7L (VACVΔC7L) modificado geneticamente para expressar OX40L (VACVΔC7L-OX40L); um VACVΔC7L recombinante modificado geneticamente para expressar OX40L e hFlt3L (VACVΔC7L-hFlt3L-OX40L); um VACV modificado geneticamente para compreender uma deleção de E5R (VACVΔE5R); um VACV recombinante modificado geneticamente para compreender uma deleção de E5R, uma deleção de timidina quinase (TK) para expressar ani-CTLA-4, hFlt3L e OX40L (VACV-TK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L); um MYXV modificado geneticamente para compreender uma deleção de M31R (MYXVΔM31R); um MYXV recombinante modificado geneticamente para compreender uma deleção de M31R e para expressar hFl3L e OX40L (MYXVΔM31R-hFlt3L-OX40L); e/ou poxvírus modificados adicionais selecionados a partir deMVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12,

MVA∆E3L∆E5R-hFlt3L-mOX40L∆WR199-hIL-12∆C11R, MVA∆E3L∆E5R-hFlt3L-mOX40L∆WR199-hIL-12∆C11R-hIL-15/IL-15Rα, VACV∆E5R-IL-15/IL-15Rα, VACV∆E5R-IL-15/IL-15Rα-OX40L, VACV∆E3L83N-∆TK-anti-huCTLA-4-∆E5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12∆B2R∆WR199∆WR200, VACV∆E3L83N-∆TK-anti-huCTLA-4-∆E5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12∆B2R∆WR199∆WR200-hIL-15/IL-15Rα, VACV∆E3L83N-∆TK-anti-huCTLA-4-∆E5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12∆B2R∆WR199∆WR200∆C11R, VACV∆E3L83N-∆TK-anti-huCTLA-4-∆E5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12∆B2R∆WR199∆WR200-hIL-15/IL-15Rα∆C11R, MYXV∆M63R∆M64R, MYXV∆M62R, MYXV∆M62R∆M63R∆M64R, MYXV∆M31R, MYXV∆M62R∆M63R∆M64R∆M31R, MYXV∆M63R∆M64R-hFlt3L-OX40L, MYXV∆M62R∆M63R∆M64R-hFlt3L-OX40L, MYXV∆M62R∆M63R∆M64R∆M31R-hFlt3L-OX40L, MYXV∆M62R∆M63R∆M64R∆M31R-hFlt3L-OX40L-IL-12, MYXV∆M62R∆M63R∆M64R∆M31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-IL-15/IL-15Rα, MYXV∆M62R∆M63R∆M64R∆M31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-anti-CTLA-4, e/ou MYXV∆M62R∆M63R∆M64R∆M31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-IL-15/IL-15Rα-anti-CTLA-4, ou combinação dos mesmos. Em algumas modalidades o tratamento compreende um ou mais dentre os seguintes: induzir uma resposta imunológica no indivíduo contra o tumor ou aumentar ou promover uma resposta imunológica contínua contra o tumor no indivíduo, reduzir o tamanho do tumor, erradicar o tumor, inibir o crescimento do tumor, inibir o crescimento metastático do tumor, induzir apoptose de células de tumor ou prolongar a sobrevivência do indivíduo. Em algumas modalidades, a indução, o aumento ou a promoção da resposta imunológica compreende um ou mais dentre os seguintes: níveis aumentados de células T efetoras em células de tumor em comparação com células de tumor infectadas com o cepa de MVA, MVAΔE3L, MVAΔC7L, VACV, VACVΔC7L, ou MYXV; e aumento da produção esplênica de células T efetoras em comparação com a cepa MVA, MVAΔE3L, MVAΔC7L, VACV, VACVΔC7L, ou MYXV correspondente. Em algumas modalidades, o indivíduo é um humano. Em algumas modalidades, a composição da presente

tecnologia compreende MVAΔE3L-OX40L, MVAΔC7L-OX40L, MVAΔC7L-hFlt3L-OX40L, MVAΔC7LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, VACVΔC7L-OX40L, VACVΔC7L-hFlt3L-OX40L, VACVΔE5R, VACV-TK^{-}-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L, VACVΔB2R, VACVE3LΔ83NΔB2R, VACVΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83NΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12-ΔB2R, MYXVΔM31R, MYXVΔM31R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM63R, MYXVΔM64R, MVAΔWR199, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔWR199, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12ΔC11R, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12ΔC11R-hIL-15/IL-15α, VACVΔE5R-IL-15/IL-15Rα, VACVΔE5R-IL-15/IL-15Rα-OX40L, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200-hIL-15/IL-15Rα, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200ΔC11R, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200-hIL-15/IL-15RαΔC11R, MYXVΔM63RΔM64R, MYXVΔM62R, MYXVΔM62RΔM63RΔM64R, MYXVΔM31R, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R, MYXVΔM63RΔM64R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-IL-15/IL-15Rα, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-anti-CTLA-4, e/ou MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-IL-15/IL-15Rα-anti-CTLA-4 é administrada ao indivíduo por injeção intratumoral ou intravenosa ou uma combinação simultânea (isto é, concorrente) ou sequencial de injeção intratumoral e intravenosa.

[0509] Em algumas modalidades, o indivíduo é diagnosticado com um câncer, como melanoma, carcinoma de cólon, câncer de mama, câncer de próstata, fibrossarcoma, mixossarcoma, lipossarcoma, condrossarcoma, sarcoma osteogênico, cordoma, angiossarcoma, endoteliossarcoma, linfangiomama, limfangioendoteliossarcoma, sinoviosarcoma, tumor de Ewings e outros tumores ósseos (por exemplo, osteossarcoma, histiocitoma fibroso maligno), leiomiossarcoma, rabdomiossarcoma, câncer de pâncreas, câncer de ovário, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basais, adenocarcinoma, carcinoma de glândula sudorípara, carcinoma de glândula sebácea, carcinoma papilar, adenocarcinoma papilífero, cistoadenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma broncogênico, carcinoma de células renais, hepatoma, carcinoma do ducto biliar, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrionário, tumor de Wilms, câncer cervical, tumor testicular, carcinoma pulmonar, carcinoma pulmonar de células pequenas, carcinoma de bexiga, carcinoma epitelial, tumores cerebrais/CNS (por exemplo, astrocitoma, glioma, glioblastoma, tumores infantis, como tumor teratóide/rabdóide atípico, tumor de células germinativas, tumor embrionário, ependimoma), meduloblastoma, craniofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, meningioma, neuroblastoma, retinoblastoma, câncer de cabeça e pescoço, adenocarcinoma retal, glioma, carcinoma do tubo endometrial (por exemplo, câncer do tubo endometrial), câncer do tubo endometrial, câncer uterino, câncer de pulmão de células não pequenas (escamoso e adenocarcinoma), carcinoma ductal in situ e carcinoma hepatocelular, tumores adrenais (por exemplo, carcinoma adrenocortical), câncer esofágico, câncer de olho (por exemplo, melanoma, retinoblastoma), câncer de vesícula biliar, câncer gastrointestinal, câncer de coração, câncer de laringe e hipofaringe, câncer oral (por exemplo, lábio, boca, glândula salivar), câncer nasofaríngeo, neuroblastoma, câncer peritoneal, câncer pituitário, sarcoma de Kaposi, câncer de intestino delgado, câncer de estômago, câncer

de timo, câncer de tireoide, câncer de paratireoide, tumor vaginal e as metástases de qualquer um dos anteriores.

XVI. Terapia de combinação com outros agentes ativos

[0510] Em algumas modalidades, os poxvírus modificados da presente tecnologia (*por exemplo***,** MVAΔE3L-OX40L, MVAΔC7L-OX40L, MVAΔC7L-hFlt3L-OX40L, MVAΔC7LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, VACVΔC7L-OX40L, VACVΔC7L-hFlt3L-OX40L, VACVΔE5R, VACV-TK$^-$-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L, VACVΔB2R, VACVE3LΔ83NΔB2R, VACVΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83NΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12-ΔB2R, MYXVΔM31R, MYXVΔM31R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM63R, MYXVΔM64R, MVAΔWR199, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔWR199, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12ΔC11R, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12ΔC11R-hIL-15/IL-15α, VACVΔE5R-IL-15/IL-15Rα, VACVΔE5R-IL-15/IL-15Rα-OX40L, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200-hIL-15/IL-15Rα, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200ΔC11R, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200-hIL-15/IL-15RαΔC11R, MYXVΔM63RΔM64R, MYXVΔM62R, MYXVΔM62RΔM63RΔM64R, MYXVΔM31R, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R, MYXVΔM63RΔM64R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-IL-15/IL-15Rα, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-anti-CTLA-4, e/ou

MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-IL-15/IL-15Rα-anti-CTLA-4) são combinados ou separadamente, sequencialmente ou simultaneamente (ou seja, simultaneamente) administrados com qualquer combinação dentre: (i) um ou mais agentes de bloqueio de ponto de verificação imunológico e/ou um ou mais estimuladores do sistema imunológico; (ii) um ou mais medicamentos anticâncer; e (iii) uma medicamento imunomoduladora (*isto é*, fingolimode (FTY720)). Em algumas modalidades, a administração combinada dos poxvírus manipulados da presente tecnologia (*por exemplo*, MVAΔE3L-OX40L, MVAΔC7L-OX40L, MVAΔC7L-hFlt3L-OX40L, MVAΔC7LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, VACVΔC7L-OX40L, VACVΔC7L-hFlt3L-OX40L, VACVΔE5R, VACV-TK$^-$-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L, VACVΔB2R, VACVE3LΔ83NΔB2R, VACVΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83NΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12-ΔB2R, MYXVΔM31R, MYXVΔM31R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM63R, MYXVΔM64R, MVAΔWR199, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔWR199, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12ΔC11R, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12ΔC11R-hIL-15/IL-15α, VACVΔE5R-IL-15/IL-15Rα, VACVΔE5R-IL-15/IL-15Rα-OX40L, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200-hIL-15/IL-15Rα, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200ΔC11R, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200-hIL-15/IL-15RαΔC11R, MYXVΔM63RΔM64R, MYXVΔM62R, MYXVΔM62RΔM63RΔM64R, MYXVΔM31R, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R, MYXVΔM63RΔM64R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64R-hFlt3L-OX40L,

MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-IL-15/IL-15Rα, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-anti-CTLA-4, e/ou MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-IL-15/IL-15Rα-anti-CTLA-4) com qualquer um dentre: (i) um ou mais agentes de bloqueio de ponto de verificação imunológico e/ou um ou mais estimuladores do sistema imunológico; (ii) um ou mais medicamentos anticâncer; e (iii) uma medicamento imunomoduladora (*isto é*, fingolimode (FTY720)) resulta em um efeito sinérgico em relação ao tratamento de tumores sólidos.

A. Agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico e estimuladores do sistema imunológico

[0511] Em algumas modalidades, MVAΔE3L-OX40L, MVAΔC7L-OX40L, MVAΔC7L-hFlt3L-OX40L, MVAΔC7LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, VACVΔC7L-OX40L, VACVΔC7L-hFlt3L-OX40L, VACVΔE5R, VACV-TK$^-$-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L, VACVΔB2R, VACVE3LΔ83NΔB2R, VACVΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83NΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12-ΔB2R, MYXVΔM31R, MYXVΔM31R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM63R, MYXVΔM64R, MVAΔWR199, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔWR199, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12ΔC11R, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12ΔC11R-hIL-15/IL-15α, VACVΔE5R-IL-15/IL-15Rα, VACVΔE5R-IL-15/IL-15Rα-OX40L, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200-hIL-15/IL-15Rα, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200ΔC11R, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-

12ΔB2RΔWR199ΔWR200-hIL-15/IL-15RαΔC11R, MYXVΔM63RΔM64R, MYXVΔM62R, MYXVΔM62RΔM63RΔM64R, MYXVΔM31R, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R, MYXVΔM63RΔM64R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-IL-15/IL-15Rα, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-anti-CTLA-4, e/ou MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-IL-15/IL-15Rα-anti-CTLA-4 é combinado ou separadamente, sequencialmente ou simultaneamente (ou seja, simultaneamente) administrado com um ou mais agentes de bloqueio de ponto de verificação imunológico e/ou um ou mais estimuladores do sistema imunológico. O um ou mais agentes de bloqueio de ponto de verificação imunológico podem ter como alvo qualquer um ou mais dentre PD-1 (morte programada 1), PD-L1 (ligante de morte programada 1) ou CTLA-4 (antígeno de linfócito T citotóxico 4) (*por exemplo*, anticorpos anti-huPD-1, anti-huPD-L1 ou anti-huCTLA-4).

[0512] Em algumas modalidades, o um ou mais agentes de bloqueio de ponto de verificação imunológico são selecionados a partir do grupo que consiste em ipilimumabe, nivolumabe, pidilizumabe, lambrolizumabe, pembrolizumabe, atezolizumabe, avelumabe e durvalumabe, MPDL3280A, BMS-936559, MEDI-4736, MSB 00107180, anticorpos inibidores contra LAG-3 (gene de ativação de linfócitos 3), TIM3 (imunoglobulina de células T e mucina-3), B7-H3, B7-H4, TIGIT (imunorreceptor de células T com domínios Ig e ITIM), AMP-224, MDX-1105, arelumabe, tremelimumabe, IMP321, MGA271, BMS-986016, lirilumabe, urelumabe, PF-05082566, IPH2101, MEDI-6469, CP-870.893, mogamulizumabe, Varlilumabe, Galiximabe, AMP-514, AUNP 12, indoximode, NLG-919, INCB024360, CD80, CD86, ICOS (coestimulador de células T induzível), inibidores de DLBCL (linfoma difuso de células B grandes), BTLA (atenuador de linfócitos B e T), PDR001 e qualquer combinação dos

mesmos. As faixas de dosagem das anteriores são conhecidas ou facilmente dentro dos versados na técnica, uma vez que vários ensaios clínicos de dosagem foram concluídos, tornando possível a extrapolação para outros agentes.

[0513] A título de exemplo, mas não a título de limitação, em algumas modalidades, um ou mais estimuladores do sistema imunológico são selecionados entre um estimulador de células assassinas naturais (NK), um estimulador de células de apresentação de antígeno (APC), uma colônia de granulócitos e macrófagos -fator estimulante (GM-CSF) e um estimulador de receptor similar a toll.

[0514] Em algumas modalidades, o estimulador NK inclui, mas não está limitado a, IL-2, IL-15, complexo IL-15/IL-15RA, IL-18 e IL-12. Em algumas modalidades, o estimulador NK inclui um anticorpo que estimula pelo menos um dentre os seguintes receptores NKG2, KIR2DL1/S1, KRI2DL5A, NKG2D, NKp46, NKp44, ou NKp30.

[0515] Em algumas modalidades, o estimulador de APC inclui, mas não está limitado a, CD28, ICOS, CD40, CD30, CD27, OX-40, e 4-1BB.

[0516] Em algumas modalidades, a combinação de MVAΔE3L-OX40L, MVAΔC7L-OX40L, MVAΔC7L-hFlt3L-OX40L, MVAΔC7LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, VACVΔC7L-OX40L, VACVΔC7L-hFlt3L-OX40L, VACVΔE5R, VACV-TK$^-$-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L, VACVΔB2R, VACVE3LΔ83NΔB2R, VACVΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83NΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12-ΔB2R, MYXVΔM31R, MYXVΔM31R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM63R, MYXVΔM64R, MVAΔWR199, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔWR199, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12ΔC11R, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12ΔC11R-hIL-15/IL-15α, VACVΔE5R-IL-15/IL-15Rα, VACVΔE5R-IL-15/IL-

15Rα-OX40L, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200-hIL-15/IL-15Rα, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200ΔC11R, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200-hIL-15/IL-15RαΔC11R, MYXVΔM63RΔM64R, MYXVΔM62R, MYXVΔM62RΔM63RΔM64R, MYXVΔM31R, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R, MYXVΔM63RΔM64R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-IL-15/IL-15Rα, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-anti-CTLA-4, e/ou MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-IL-15/IL-15Rα-anti-CTLA-4 e um ou mais inibidores do ponto de verificação imunológico e/ou um ou mais estimuladores do sistema imunológico resultam em um efeito sinérgico. Em algumas modalidades, a combinação de MVAΔE3L-OX40L, MVAΔC7L-OX40L, MVAΔC7L-hFlt3L-OX40L, MVAΔC7LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, VACVΔC7L-OX40L, VACVΔC7L-hFlt3L-OX40L, VACVΔE5R, VACV-TK$^-$-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L, VACVΔB2R, VACVE3LΔ83NΔB2R, VACVΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83NΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12-ΔB2R, MYXVΔM31R, MYXVΔM31R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM63R, MYXVΔM64R, MVAΔWR199, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔWR199, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12ΔC11R, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12ΔC11R-hIL-15/IL-15α, VACVΔE5R-IL-15/IL-15Rα, VACVΔE5R-IL-15/IL-15Rα-OX40L, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-

12ΔB2RΔWR199ΔWR200, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200-hIL-15/IL-15Rα, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200ΔC11R, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200-hIL-15/IL-15RαΔC11R, MYXVΔM63RΔM64R, MYXVΔM62R, MYXVΔM62RΔM63RΔM64R, MYXVΔM31R, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R, MYXVΔM63RΔM64R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-IL-15/IL-15Rα, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-anti-CTLA-4, e/ou MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-IL-15/IL-15Rα-anti-CTLA-4 e um ou mais inibidores do ponto de verificação imunológico e/ou um ou mais estimuladores do sistema imunológico resultam em um efeito anti tumor sinérgico. Em algumas modalidades, a comnibação de MVAΔE3L-OX40L, MVAΔC7L-OX40L, MVAΔC7L-hFlt3L-OX40L, MVAΔC7LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, VACVΔC7L-OX40L, VACVΔC7L-hFlt3L-OX40L, VACVΔE5R, VACV-TK$^-$-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L, VACVΔB2R, VACVE3LΔ83NΔB2R, VACVΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83NΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12-ΔB2R, MYXVΔM31R, MYXVΔM31R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM63R, MYXVΔM64R, MVAΔWR199, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔWR199, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12ΔC11R, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12ΔC11R-hIL-15/IL-15α, VACVΔE5R-IL-15/IL-15Rα, VACVΔE5R-IL-15/IL-15Rα-OX40L, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-

hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200-hIL-15/IL-15Rα, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200ΔC11R, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200-hIL-15/IL-15RαΔC11R, MYXVΔM63RΔM64R, MYXVΔM62R, MYXVΔM62RΔM63RΔM64R, MYXVΔM31R, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R, MYXVΔM63RΔM64R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-IL-15/IL-15Rα, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-anti-CTLA-4, e/ou MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-IL-15/IL-15Rα-anti-CTLA-4 e o anti-PD-L1 resulta em um efeito sinérgico em relação ao tratamento de tumores sólidos. Em algumas modalidades, a comnibação de MVAΔE3L-OX40L, MVAΔC7L-OX40L, MVAΔC7L-hFlt3L-OX40L, MVAΔC7LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, VACVΔC7L-OX40L, VACVΔC7L-hFlt3L-OX40L, VACVΔE5R, VACV-TK$^-$-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L, VACVΔB2R, VACVE3LΔ83NΔB2R, VACVΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83NΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12-ΔB2R, MYXVΔM31R, MYXVΔM31R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM63R, MYXVΔM64R, MVAΔWR199, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔWR199, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12ΔC11R, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12ΔC11R-hIL-15/IL-15α, VACVΔE5R-IL-15/IL-15Rα, VACVΔE5R-IL-15/IL-15Rα-OX40L, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200-hIL-15/IL-15Rα, VACVΔE3L83N-ΔTK-

anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200ΔC11R, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200-hIL-15/IL-15RαΔC11R, MYXVΔM63RΔM64R, MYXVΔM62R, MYXVΔM62RΔM63RΔM64R, MYXVΔM31R, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R, MYXVΔM63RΔM64R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-IL-15/IL-15Rα, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-anti-CTLA-4, e/ou MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-IL-15/IL-15Rα-anti-CTLA-4 e o anti-PD-1 resulta em um efeito sinérgico em relação ao tratamento de tumores sólidos. Em algumas modalidades, a comnibação de MVAΔE3L-OX40L, MVAΔC7L-OX40L, MVAΔC7L-hFlt3L-OX40L, MVAΔC7LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, VACVΔC7L-OX40L, VACVΔC7L-hFlt3L-OX40L, VACVΔE5R, VACV-TK$^-$-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L, VACVΔB2R, VACVE3LΔ83NΔB2R, VACVΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83NΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12-ΔB2R, MYXVΔM31R, MYXVΔM31R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM63R, MYXVΔM64R, MVAΔWR199, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔWR199, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12ΔC11R, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12ΔC11R-hIL-15/IL-15α, VACVΔE5R-IL-15/IL-15Rα, VACVΔE5R-IL-15/IL-15Rα-OX40L, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200-hIL-15/IL-15Rα, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200ΔC11R, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-

12ΔB2RΔWR199ΔWR200-hIL-15/IL-15RαΔC11R, MYXVΔM63RΔM64R, MYXVΔM62R, MYXVΔM62RΔM63RΔM64R, MYXVΔM31R, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R, MYXVΔM63RΔM64R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-IL-15/IL-15Rα, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-anti-CTLA-4, e/ou MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-IL-15/IL-15Rα-anti-CTLA-4 e o anti-CTLA-4 resulta em um efeito sinérgico em relação ao tratamento de tumores sólidos.

[0517] Em algumas modalidades, a combinação de MVAΔE3L-OX40L, MVAΔC7L-OX40L, MVAΔC7L-hFlt3L-OX40L, MVAΔC7LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, VACVΔC7L-OX40L, VACVΔC7L-hFlt3L-OX40L, VACVΔE5R, VACV-TK$^-$-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L, VACVΔB2R, VACVE3LΔ83NΔB2R, VACVΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83NΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12-ΔB2R, MYXVΔM31R, MYXVΔM31R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM63R, MYXVΔM64R, MVAΔWR199, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔWR199, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12ΔC11R, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12ΔC11R-hIL-15/IL-15α, VACVΔE5R-IL-15/IL-15Rα, VACVΔE5R-IL-15/IL-15Rα-OX40L, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200-hIL-15/IL-15Rα, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200ΔC11R, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200-hIL-15/IL-15RαΔC11R, MYXVΔM63RΔM64R,

MYXVΔM62R, MYXVΔM62RΔM63RΔM64R, MYXVΔM31R, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R, MYXVΔM63RΔM64R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-IL-15/IL-15Rα, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-anti-CTLA-4, e/ou MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-IL-15/IL-15Rα-anti-CTLA-4 com um ou mais agentes de bloqueio de ponto de verificação imunológico e/ou um ou mais estimuladores do sistema imunológico é ainda combinado ou separadamente, sequencialmente ou simultaneamente (ou seja, simultaneamente) administrado com um ou mais medicamentos anti câncer e/ou medicamentos imunomoduladores descritos abaixo nas Seções XVI B e C. Em algumas modalidades, a combinação de MVAΔE3L-OX40L, MVAΔC7L-OX40L, MVAΔC7L-hFlt3L-OX40L, MVAΔC7LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, VACVΔC7L-OX40L, VACVΔC7L-hFlt3L-OX40L, VACVΔE5R, VACV-TK$^-$-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L, VACVΔB2R, VACVE3LΔ83NΔB2R, VACVΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83NΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12-ΔB2R, MYXVΔM31R, MYXVΔM31R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM63R, MYXVΔM64R, MVAΔWR199, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔWR199, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12ΔC11R, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12ΔC11R-hIL-15/IL-15α, VACVΔE5R-IL-15/IL-15Rα, VACVΔE5R-IL-15/IL-15Rα-OX40L, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200-hIL-15/IL-15Rα, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200ΔC11R,

VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200-hIL-15/IL-15RαΔC11R, MYXVΔM63RΔM64R, MYXVΔM62R, MYXVΔM62RΔM63RΔM64R, MYXVΔM31R, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R, MYXVΔM63RΔM64R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-IL-15/IL-15Rα, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-anti-CTLA-4, e/ou MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-IL-15/IL-15Rα-anti-CTLA-4 com um ou mais agentes de bloqueio de ponto de verificação imunológico e/ou um ou mais estimuladores do sistema imunológico e uma ou mais medicamentos anticâncer e/ou medicamentos imunomoduladoras descritas abaixo nas Seções XVI B e C resulta em um efeito sinérgico em relação ao tratamento de sólidos tumores..

[0518] Foi relatado que a administração sequencial (*ou seja*, em série) de anticorpo anti-OX40 seguido pelo inibidor de ponto de verificação imunológico, anticorpo anti-PD-1, melhora a eficácia terapêutica da combinação, resultando em progressão do tumor retardada e, em alguns casos, regressão completa do tumor. (*Ver, por exemplo*, Shrimali *et al*., *Cancer Immunol.* 80:59). OF1-OF12 (2017); Messenheimer *et al*., *Clin. Cancer Res.* 23(20):6165-6177 (2017)). No entanto, os mesmos estudos mostram que a administração simultânea (*ou seja*, concorrente) do anticorpo anti-OX40 e do anticorpo anti-PD-1 anula os efeitos antitumorais do anticorpo OX40 e resulta em maus resultados de tratamento em camundongos. (*Ver,* Shrimali *et al*., (2017); Messenheimer *et al*., (2017)). Em contraste, como mostrado nas **FIGS. 11B-11G**, a administração combinada simultânea (*ou seja*, concorrente) dos vírus que expressam o transgene OX40L da presente tecnologia (*por exemplo*, MVAΔC7L-hFlt3L-OX40L) e um inibidor de ponto de verificação imunológico (*por exemplo*, MVAΔC7L-hFlt3L-OX40L + anti-PD-L1 ou MVAΔC7L-hFlt3L-

OX40L + anti-CTLA-4 ou MVAΔC7L-hFlt3L-OX40L + anti-PD-1 (não mostrado)) em um modelo de melanoma de camundongo surpreendentemente e inesperadamente resulta em efeitos anti tumorais aumentados em ambos os tumores injetados e não injetados e maior sobrevida em comparação aos controles. m algumas modalidades, a combinação dos vírus que expressam o transgene OX40L da presente tecnologia, por exemplo, MVAΔE3L-OX40L, MVAΔC7L-OX40L, MVAΔC7L-hFlt3L-OX40L, MVAΔC7LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, VACVΔC7L-OX40L, VACVΔC7L-hFlt3L-OX40L, VACV-TK$^-$-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12-ΔB2R, MYXVΔM31R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔWR199, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12ΔC11R, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12ΔC11R-hIL-15/IL-15α, VACVΔE5R-IL-15/IL-15Rα-OX40L, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200-hIL-15/IL-15Rα, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200ΔC11R, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200-hIL-15/IL-15RαΔC11R, MYXVΔM63RΔM64R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-IL-15/IL-15Rα, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-anti-CTLA-4, e MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-IL-15/IL-15Rα-anti-CTLA-4 e/ou e um ou mais inibidores de ponto de verificação imunológico (por exemplo, anticorpo anti-PD-L1, anticorpo anti-PD-1, anticorpo anti-CTLA-4) resulta em um efeito anti tumoral aprimorado surpreendente e inesperado em

comparação com a combinação de um inibidor do ponto de verificação imunológico e anticorpo agonista anti-OX40. Em algumas modalidades, a combinação de MVAΔE3L-OX40L, MVAΔC7L-OX40L, MVAΔC7L-hFlt3L-OX40L, MVAΔC7LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, VACVΔC7L-OX40L, VACVΔC7L-hFlt3L-OX40L, VACV-TK$^-$-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12-ΔB2R, MYXVΔM31R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔWR199, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12ΔC11R, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12ΔC11R-hIL-15/IL-15α, VACVΔE5R-IL-15/IL-15Rα-OX40L, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200-hIL-15/IL-15Rα, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200ΔC11R, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200-hIL-15/IL-15RαΔC11R, MYXVΔM63RΔM64R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-IL-15/IL-15Rα, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-anti-CTLA-4, e MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-IL-15/IL-15Rα-anti-CTLA-4 e e um ou mais inibidores de ponto de verificação imunológico (por exemplo, anticorpo anti-PD-L1, anticorpo anti-PD-1, anticorpo anti-CTLA-4) resulta em um efeito sinérgico surpreendente e inesperado com relação ao tratamento de tumores sólidos em comparação com a combinação de um inibidor do ponto de verificação imunológico e anticorpo agonista anti-OX40.

B. Medicamentos anticâncer

[0519] Os receptores de tirosina quinases, como EGFR e HER2, foram implicados na promoção da proliferação e sobrevivência de células de tumor por meio da via Ras-Raf-Mek-Erk (Ras-MAPK). Raf e Mek também são alvos para inibir sinais oncogênicos decorrentes de receptor de tirosina quinase a montante ou de mutações de ganho de função em *RAS* ou *RAF* que conduzem a sinalização Ras-MAPK. A identificação de mutações de ativação chave em cânceres, incluindo melanoma, levou ao desenvolvimento de terapias direcionadas ao longo da via MAPK. Por exemplo, mutações de ativação em BRAF ocorrem em mais da metade dos cânceres de melanoma, a maioria dos quais inclui a mutação $BRAF^{V600E}$, que ativa constitutivamente a via de sinalização MAPK. Isso, por sua vez, leva a um aumento do comportamento metastático, incluindo capacidade de invasão, enquanto reduz a apoptose (*ou seja*, aumenta a sobrevivência das células de câncer). Vários medicamentos anticâncer foram desenvolvidos para mitigar a sinalização patogênica dessa via. As terapias direcionadas a esta via incluem inibidores de EGFR, HER2, BRAF, RAF e MEK.

[0520] Imunoterapias que consistem em inibidores de ponto de verificação (PD-1/PD-L1, CTLA-4) e combinações de terapias direcionadas à via MAPK têm mostrado resultados promissores em, por exemplo, melanoma avançado positivo para BRAF. Foi relatado que a ativação da via de MAPK contribui para o escape imunológico, enquanto a inibição da via de MAPK contribui para um ambiente imunológico mais favorável por meio da revogação de fatores imunossupressores, bem como desregulação de certas outras proteínas imunorreguladoras, como PD-L1. Além disso, o vírus do herpes oncolítico (T-Vec) em combinação dupla com a inibição da via de MAPK demonstrou em modelos pré-clínicos aumentar a morte de células de câncer em comparação com o agente único sozinho, enquanto a combinação tripla de inibidor de MAPK, T-Vec e um o inibidor de ponto de verificação (*por exemplo*, anticorpo anti-PD-L1) mostrou efeitos imunoestimuladores sinérgicos. A

resposta imunológica robusta com a inibição da via de MAPK foi fortemente associada ao aumento da ativação do influxo de células T CD8 e ao aumento dos níveis de IFN e TNF-α secretados.

[0521] Como demonstrado neste documento, os construtos virais recombinantes da presente tecnologia compreendendo deleções de E5R (ou seu ortólogo), como MVAΔE5R, VACVΔE5R e MYXVΔM31R, que aumentam significativamente os níveis de expressão do gene IFN maiores do que 1000 vezes em comparação com um vírus do tipo selvagem correspondente (*consulte* **FIG. 60A**).

[0522] Em algumas modalidades, MVAΔE3L-OX40L, MVAΔC7L-OX40L, MVAΔC7L-hFlt3L-OX40L, MVAΔC7LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, VACVΔC7L-OX40L, VACVΔC7L-hFlt3L-OX40L, VACVΔE5R, VACV-TK$^-$-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L, VACVΔB2R, VACVE3LΔ83NΔB2R, VACVΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83NΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12-ΔB2R, MYXVΔM31R, MYXVΔM31R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM63R, MYXVΔM64R, MVAΔWR199, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔWR199, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12ΔC11R, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12ΔC11R-hIL-15/IL-15α, VACVΔE5R-IL-15/IL-15Rα, VACVΔE5R-IL-15/IL-15Rα-OX40L, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200-hIL-15/IL-15Rα, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200ΔC11R, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200-hIL-15/IL-15RαΔC11R, MYXVΔM63RΔM64R, MYXVΔM62R, MYXVΔM62RΔM63RΔM64R, MYXVΔM31R, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R, MYXVΔM63RΔM64R-hFlt3L-OX40L,

MYXVΔM62RΔM63RΔM64R-hFlt3L-OX40L,
MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L,
MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12,
MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-IL-15/IL-15Rα,
MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-anti-CTLA-4, e/ou MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-IL-15/IL-15Rα-anti-CTLA-4 é combinado ou separadamente, sequencialmente ou simultaneamente (ou seja, simultaneamente) administrado com um ou mais medicamentos anticâncer selecionados do grupo que consiste em inibidores de Mek (por exemplo, U0126, selumitinibe (AZD6244), PD98059, trametinibe, cobimetinibe), inibidores de EGFR (por exemplo, lapatinibe (LPN), erlotinibe (ERL)), inibidores de HER2 (por exemplo, lapatinibe (LPN), trastuzumabe), inibidores de Raf (por exemplo, sorafenibe (SFN)), inibidores de BRAF (por exemplo, dabrafenibe, vemurafenibe), um anti Anticorpo -OX40, um anticorpo agonista de GITR, um anticorpo anti-CSFR, um inibidor de CSFR, paclitaxel, agonista de TLR9 CpG e inibidores de VEGF (por exemplo, bevacizumabe).

[0523] Em algumas modalidades, a combinação de MVAΔE3L-OX40L, MVAΔC7L-OX40L, MVAΔC7L-hFlt3L-OX40L, MVAΔC7LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, VACVΔC7L-OX40L, VACVΔC7L-hFlt3L-OX40L, VACVΔE5R, VACV-TK$^-$-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L, VACVΔB2R, VACVE3LΔ83NΔB2R, VACVΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83NΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12-ΔB2R, MYXVΔM31R, MYXVΔM31R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM63R, MYXVΔM64R, MVAΔWR199, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔWR199, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12ΔC11R, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12ΔC11R-hIL-15/IL-15α, VACVΔE5R-IL-15/IL-15Rα, VACVΔE5R-IL-15/IL-15Rα-OX40L, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-

12ΔB2RΔWR199ΔWR200, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200-hIL-15/IL-15Rα, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200ΔC11R, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200-hIL-15/IL-15RαΔC11R, MYXVΔM63RΔM64R, MYXVΔM62R, MYXVΔM62RΔM63RΔM64R, MYXVΔM31R, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R, MYXVΔM63RΔM64R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-IL-15/IL-15Rα, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-anti-CTLA-4, e/ou MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-IL-15/IL-15Rα-anti-CTLA-4 com um ou mais medicamentos anticâncer ainda combinado ou separadamente, sequencialmente ou simultaneamente (ou seja, simultaneamente) administrado com um ou mais agentes de bloqueio de ponto de verificação imunológico e/ou um ou mais estimuladores do sistema imunológico. Em algumas modalidades, a combinação de MVAΔE3L-OX40L, MVAΔC7L-OX40L, MVAΔC7L-hFlt3L-OX40L, MVAΔC7LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, VACVΔC7L-OX40L, VACVΔC7L-hFlt3L-OX40L, VACVΔE5R, VACV-TK$^-$-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L, VACVΔB2R, VACVE3LΔ83NΔB2R, VACVΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83NΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12-ΔB2R, MYXVΔM31R, MYXVΔM31R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM63R, MYXVΔM64R, MVAΔWR199, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔWR199, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12ΔC11R, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12ΔC11R-hIL-15/IL-15α, VACVΔE5R-IL-15/IL-15Rα, VACVΔE5R-IL-15/IL-

15Rα-OX40L, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200-hIL-15/IL-15Rα, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200ΔC11R, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200-hIL-15/IL-15RαΔC11R, MYXVΔM63RΔM64R, MYXVΔM62R, MYXVΔM62RΔM63RΔM64R, MYXVΔM31R, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R, MYXVΔM63RΔM64R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-IL-15/IL-15Rα, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-anti-CTLA-4, e/ou MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-IL-15/IL-15Rα-anti-CTLA-4 com o um ou mais medicamentos anti câncer e um ou mais agentes de bloqueio de ponto de verificação imunológico e/ou um ou mais estimuladores do sistema imunológico resulta em um efeito sinérgico em relação ao tratamento de tumores sólidos.

[0524] Em algumas modalidades, a combinação de MVAΔE3L-OX40L, MVAΔC7L-OX40L, MVAΔC7L-hFlt3L-OX40L, MVAΔC7LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, VACVΔC7L-OX40L, VACVΔC7L-hFlt3L-OX40L, VACVΔE5R, VACV-TK$^-$-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L, VACVΔB2R, VACVE3LΔ83NΔB2R, VACVΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83NΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12-ΔB2R, MYXVΔM31R, MYXVΔM31R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM63R, MYXVΔM64R, MVAΔWR199, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔWR199, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12ΔC11R, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-

12ΔC11R-hIL-15/IL-15α, VACVΔE5R-IL-15/IL-15Rα, VACVΔE5R-IL-15/IL-15Rα-OX40L, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200-hIL-15/IL-15Rα, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200ΔC11R, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200-hIL-15/IL-15RαΔC11R, MYXVΔM63RΔM64R, MYXVΔM62R, MYXVΔM62RΔM63RΔM64R, MYXVΔM31R, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R, MYXVΔM63RΔM64R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-IL-15/IL-15Rα, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-anti-CTLA-4, e/ou MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-IL-15/IL-15Rα-anti-CTLA-4 com um ou mais medicamentos anticâncer ainda combinado ou separadamente, sequencialmente ou simultaneamente (ou seja, simultaneamente) administrado com um ou mais agentes de bloqueio de ponto de verificação imunológico e/ou um ou mais estimuladores do sistema imunológico, conforme descrito na **Seção XVI A**, e/ou medicamentos imunomoduladores descritos na **Seção XVI C**. Em algumas modalidades, a combinação de MVAΔE3L-OX40L, MVAΔC7L-OX40L, MVAΔC7L-hFlt3L-OX40L, MVAΔC7LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, VACVΔC7L-OX40L, VACVΔC7L-hFlt3L-OX40L, VACVΔE5R, VACV-TK$^-$-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L, VACVΔB2R, VACVE3LΔ83NΔB2R, VACVΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83NΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12-ΔB2R, MYXVΔM31R, MYXVΔM31R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM63R,

MYXVΔM64R, MVAΔWR199, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔWR199, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12ΔC11R, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12ΔC11R-hIL-15/IL-15α, VACVΔE5R-IL-15/IL-15Rα, VACVΔE5R-IL-15/IL-15Rα-OX40L, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200-hIL-15/IL-15Rα, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200ΔC11R, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200-hIL-15/IL-15RαΔC11R, MYXVΔM63RΔM64R, MYXVΔM62R, MYXVΔM62RΔM63RΔM64R, MYXVΔM31R, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R, MYXVΔM63RΔM64R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-IL-15/IL-15Rα, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-anti-CTLA-4, e/ou MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-IL-15/IL-15Rα-anti-CTLA-4 com o um ou mais medicamentos anticâncer, um ou mais agentes bloqueadores do ponto de verificação imunológico ou estimuladores do sistema imunológico e/ou medicamentos imunomoduladores, resulta em um efeito sinérgico em relação ao tratamento de tumores sólidos.

C. Medicamentos imunomoduladores

[0525] Fingolimode (FTY720) é uma medicamento imunomodulador oralmente ativo usado para tratar a esclerose múltipla. O fingolimode atua como um modulador do receptor de esfingosina-1-fosfato que bloqueia a saída de linfócitos dos nódulos linfáticos.

[0526] Em algumas modalidades, MVAΔE3L-OX40L, MVAΔC7L-OX40L, MVAΔC7L-hFlt3L-OX40L, MVAΔC7LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-

ΔC11R, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, VACVΔC7L-OX40L, VACVΔC7L-hFlt3L-OX40L, VACVΔE5R, VACV-TK$^-$-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L, VACVΔB2R, VACVE3LΔ83NΔB2R, VACVΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83NΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12-ΔB2R, MYXVΔM31R, MYXVΔM31R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM63R, MYXVΔM64R, MVAΔWR199, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔWR199, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12ΔC11R, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12ΔC11R-hIL-15/IL-15α, VACVΔE5R-IL-15/IL-15Rα, VACVΔE5R-IL-15/IL-15Rα-OX40L, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200-hIL-15/IL-15Rα, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200ΔC11R, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200-hIL-15/IL-15RαΔC11R, MYXVΔM63RΔM64R, MYXVΔM62R, MYXVΔM62RΔM63RΔM64R, MYXVΔM31R, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R, MYXVΔM63RΔM64R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-IL-15/IL-15Rα, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-anti-CTLA-4, e/ou MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-IL-15/IL-15Rα-anti-CTLA-4 é combinado ou separadamente, sequencialmente ou simultaneamente (ou seja, simultaneamente) administrado com FTY720.

[0527] Em algumas modalidades, a combinação de MVAΔE3L-OX40L, MVAΔC7L-OX40L, MVAΔC7L-hFlt3L-OX40L, MVAΔC7LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, VACVΔC7L-

OX40L, VACVΔC7L-hFlt3L-OX40L, VACVΔE5R, VACV-TK$^-$-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L, VACVΔB2R, VACVE3LΔ83NΔB2R, VACVΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83NΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12-ΔB2R, MYXVΔM31R, MYXVΔM31R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM63R, MYXVΔM64R, MVAΔWR199, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔWR199, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12ΔC11R, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12ΔC11R-hIL-15/IL-15α, VACVΔE5R-IL-15/IL-15Rα, VACVΔE5R-IL-15/IL-15Rα-OX40L, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200-hIL-15/IL-15Rα, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200ΔC11R, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200-hIL-15/IL-15RαΔC11R, MYXVΔM63RΔM64R, MYXVΔM62R, MYXVΔM62RΔM63RΔM64R, MYXVΔM31R, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R, MYXVΔM63RΔM64R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-IL-15/IL-15Rα, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-anti-CTLA-4, e/ou MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-IL-15/IL-15Rα-anti-CTLA-4 com FTY720 ainda combinado ou separadamente, sequencialmente ou simultaneamente (ou seja, simultaneamente) administrado com um ou mais agentes de bloqueio de ponto de verificação imunológico e/ou um ou mais estimuladores do sistema imunológico, conforme descrito na **Seção XVI A**, e/ou medicamentos anticâncer descritos na **Seção XVI B**. Em algumas modalidades, a combinação de MVAΔE3L-OX40L, MVAΔC7L-OX40L, MVAΔC7L-hFlt3L-OX40L, MVAΔC7LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-

OX40L, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, VACVΔC7L-OX40L, VACVΔC7L-hFlt3L-OX40L, VACVΔE5R, VACV-TK$^-$-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L, VACVΔB2R, VACVE3LΔ83NΔB2R, VACVΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83NΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12-ΔB2R, MYXVΔM31R, MYXVΔM31R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM63R, MYXVΔM64R, MVAΔWR199, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔWR199, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12ΔC11R, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12ΔC11R-hIL-15/IL-15α, VACVΔE5R-IL-15/IL-15Rα, VACVΔE5R-IL-15/IL-15Rα-OX40L, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200-hIL-15/IL-15Rα, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200ΔC11R, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200-hIL-15/IL-15RαΔC11R, MYXVΔM63RΔM64R, MYXVΔM62R, MYXVΔM62RΔM63RΔM64R, MYXVΔM31R, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R, MYXVΔM63RΔM64R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-IL-15/IL-15Rα, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-anti-CTLA-4, e/ou MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-IL-15/IL-15Rα-anti-CTLA-4 com o FTY720, um ou mais agentes bloqueadores do ponto de verificação imunológico ou estimuladores do sistema imunológico e/ou medicamentos anticâncer, resulta em um efeito sinérgico em relação ao tratamento de tumores sólidos.

XVII Kits Compreendendo MVAΔE3L-OX40L, MVAΔC7L-OX40L, MVAΔC7L-hFlt3L-OX40L, MVAΔC7LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, VACVΔC7L- OX40L, VACVΔC7L-hFlt3L-OX40L, VACVΔE5R, VACV-TK--anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L, VACVΔB2R, VACVE3LΔ83NΔB2R, VACVΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83NΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12-ΔB2R, MYXVΔM31R, MYXVΔM31R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM63R, MYXVΔM64R, MVAΔWR199, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L- ΔWR199, MVA∆E3L∆E5R-hFlt3L-mOX40L∆WR199-hIL-12, MVA∆E3L∆E5R-hFlt3L-mOX40L∆WR199-hIL-12∆C11R, MVA∆E3L∆E5R-hFlt3L-mO1940 12∆C11R-hIL-15/IL-15α, VACVΔE5R-IL-15/IL-15Rα, VACVΔE5R-IL-15/IL-15Rα-OX40L, VACV∆E3L83N-∆TK-anti-huCTLA-4-∆E5R- hFlt3L-hOX40L-hIL-12∆B2R∆WR199ΔWR200, VACV∆E3L83N-∆TK-anti-huCTLA-4-∆E5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12∆B2R∆WR199ΔWR200-hIL-15/15/IL E3L83N-∆TK-anti-huCTLA-4-∆E5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12∆B2R∆WR199∆WR200∆C11R, VACV∆E3L83N-∆TK- anti-huCTLA-4-∆E5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12∆B2R∆WR199∆WR200-hIL-15/IL-15Rα∆C11R, MYXV∆M63R∆M64R, MYXV∆M62R, MYXV∆M62R∆M63R∆M64R, MYXVΔM31R, MYXV∆M62R∆M63R∆M64R∆M31R, MYXV∆M63R∆M64R-hFlt3L-OX40L, MYXV∆M62R∆M63R∆M64R-hFlt3L-OX40L, MYXV∆M62R∆M63R∆M64 ∆M62R∆M63R∆M64R∆M31R-hFlt3L-OX40L-IL-12, MYXV∆M62R∆M63R∆M64R∆M31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-IL-15/IL-15Rα, MYXV∆M62R∆M63R∆M64R ∆M31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-anti-CTLA-4 e MYXV∆M62R∆M63R∆M64R∆M31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-IL-15/IL-15Rα-anti-CTLA-4 modificados.

[0528] A presente divulgação fornece kits compreendendo uma ou mais composições compreendendo um ou mais dos poxvírus modificado, por exemplo**,** MVAΔE3L-OX40L, MVAΔC7L-OX40L, MVAΔC7L-hFlt3L-OX40L,

MVAΔC7LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, VACVΔC7L-OX40L, VACVΔC7L-hFlt3L-OX40L, VACVΔE5R, VACV-TK$^-$-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L, VACVΔB2R, VACVE3LΔ83NΔB2R, VACVΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83NΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12-ΔB2R, MYXVΔM31R, MYXVΔM31R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM63R, MYXVΔM64R, MVAΔWR199, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔWR199, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12ΔC11R, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12ΔC11R-hIL-15/IL-15α, VACVΔE5R-IL-15/IL-15Rα, VACVΔE5R-IL-15/IL-15Rα-OX40L, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200-hIL-15/IL-15Rα, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200ΔC11R, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200-hIL-15/IL-15RαΔC11R, MYXVΔM63RΔM64R, MYXVΔM62R, MYXVΔM62RΔM63RΔM64R, MYXVΔM31R, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R, MYXVΔM63RΔM64R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-IL-15/IL-15Rα, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-anti-CTLA-4, e/ou MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-IL-15/IL-15Rα-anti-CTLA-4) descrito neste documento junto com as instruções para a administração dos poxvírus manipulados a um indivíduo a ser tratado. As instruções podem indicar um regime de dosagem para administrar a composição ou composições conforme fornecido abaixo.

[0529] Em algumas modalidades, o kit também pode compreender uma composição adicional que compreende um ou mais agentes de bloqueio de ponto de verificação imunológico e/ou um ou mais estimuladores do sistema imunológico para administração conjunta com o poxvírus manipulado, por exemplo, composição de MVAΔE3L-OX40L, MVAΔC7L-OX40L, MVAΔC7L-hFlt3L-OX40L, MVAΔC7LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, VACVΔC7L-OX40L, VACVΔC7L-hFlt3L-OX40L, VACVΔE5R, VACV-TK$^-$-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L, VACVΔB2R, VACVE3LΔ83NΔB2R, VACVΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83NΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12-ΔB2R, MYXVΔM31R, MYXVΔM31R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM63R, MYXVΔM64R, MVAΔWR199, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔWR199, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12ΔC11R, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12ΔC11R-hIL-15/IL-15α, VACVΔE5R-IL-15/IL-15Rα, VACVΔE5R-IL-15/IL-15Rα-OX40L, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200-hIL-15/IL-15Rα, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200ΔC11R, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200-hIL-15/IL-15RαΔC11R, MYXVΔM63RΔM64R, MYXVΔM62R, MYXVΔM62RΔM63RΔM64R, MYXVΔM31R, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R, MYXVΔM63RΔM64R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-IL-15/IL-15Rα, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-anti-CTLA-4, e/ou

MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-IL-15/IL-15Rα-anti-CTLA-4.

[0463] Em algumas modalidades, o kit também pode compreender uma composição adicional que compreende um ou mais medicamentos anticâncer para administração conjunta com o poxvírus manipulado, por exemplo, composição de MVAΔE3L-OX40L, MVAΔC7L-OX40L, MVAΔC7L-hFlt3L-OX40L, MVAΔC7LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, VACVΔC7L-OX40L, VACVΔC7L-hFlt3L-OX40L, VACVΔE5R, VACV-TK$^-$-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L, VACVΔB2R, VACVE3LΔ83NΔB2R, VACVΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83NΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12-ΔB2R, MYXVΔM31R, MYXVΔM31R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM63R, MYXVΔM64R, MVAΔWR199, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔWR199, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12ΔC11R, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12ΔC11R-hIL-15/IL-15α, VACVΔE5R-IL-15/IL-15Rα, VACVΔE5R-IL-15/IL-15Rα-OX40L, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200-hIL-15/IL-15Rα, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200ΔC11R, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200-hIL-15/IL-15RαΔC11R, MYXVΔM63RΔM64R, MYXVΔM62R, MYXVΔM62RΔM63RΔM64R, MYXVΔM31R, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R, MYXVΔM63RΔM64R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-IL-15/IL-15Rα,

MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-anti-CTLA-4, e/ou MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-IL-15/IL-15Rα-anti-CTLA-4.

[0531] Em algumas modalidades, o kit também pode compreender uma composição adicional que compreende um medicamento imunomodulador para administração conjunta com o poxvírus manipulado, por exemplo, composição de MVAΔE3L-OX40L, MVAΔC7L-OX40L, MVAΔC7L-hFlt3L-OX40L, MVAΔC7LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, VACVΔC7L-OX40L, VACVΔC7L-hFlt3L-OX40L, VACVΔE5R, VACV-TK$^-$-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L, VACVΔB2R, VACVE3LΔ83NΔB2R, VACVΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83NΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12-ΔB2R, MYXVΔM31R, MYXVΔM31R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM63R, MYXVΔM64R, MVAΔWR199, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔWR199, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12ΔC11R, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12ΔC11R-hIL-15/IL-15α, VACVΔE5R-IL-15/IL-15Rα, VACVΔE5R-IL-15/IL-15Rα-OX40L, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200-hIL-15/IL-15Rα, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200ΔC11R, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200-hIL-15/IL-15RαΔC11R, MYXVΔM63RΔM64R, MYXVΔM62R, MYXVΔM62RΔM63RΔM64R, MYXVΔM31R, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R, MYXVΔM63RΔM64R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12,

MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-IL-15/IL-15Rα, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-anti-CTLA-4, e/ou MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-IL-15/IL-15Rα-anti-CTLA-4.

[0532] Em algumas modalidades, o kit também pode compreender uma composição adicional que compreende um ou mais agentes de bloqueio de ponto de verificação imunológico e/ou um ou mais estimuladores do sistema imunológico, e um ou mais medicamentos anticâncer para administração conjunta com o poxvírus manipulado, por exemplo, composição de MVAΔE3L-OX40L, MVAΔC7L-OX40L, MVAΔC7L-hFlt3L-OX40L, MVAΔC7LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, VACVΔC7L-OX40L, VACVΔC7L-hFlt3L-OX40L, VACVΔE5R, VACV-TK$^-$-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L, VACVΔB2R, VACVE3LΔ83NΔB2R, VACVΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83NΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12-ΔB2R, MYXVΔM31R, MYXVΔM31R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM63R, MYXVΔM64R, MVAΔWR199, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔWR199, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12ΔC11R, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12ΔC11R-hIL-15/IL-15α, VACVΔE5R-IL-15/IL-15Rα, VACVΔE5R-IL-15/IL-15Rα-OX40L, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200-hIL-15/IL-15Rα, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200ΔC11R, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200-hIL-15/IL-15RαΔC11R, MYXVΔM63RΔM64R, MYXVΔM62R, MYXVΔM62RΔM63RΔM64R, MYXVΔM31R, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R, MYXVΔM63RΔM64R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64R-hFlt3L-OX40L,

MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-IL-15/IL-15Rα, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-anti-CTLA-4, e/ou MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-IL-15/IL-15Rα-anti-CTLA-4.

[0533] Em algumas modalidades, o kit também pode compreender uma composição adicional que compreende qualquer combinação de um ou mais agentes de bloqueio de ponto de verificação imunológico e/ou um ou mais estimuladores do sistema imunológico, um ou mais medicamentos anti câncer, e um medicamento imunomodulador para administração conjunta com o poxvírus manipulado, por exemplo, composição de MVAΔE3L-OX40L, MVAΔC7L-OX40L, MVAΔC7L-hFlt3L-OX40L, MVAΔC7LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, VACVΔC7L-OX40L, VACVΔC7L-hFlt3L-OX40L, VACVΔE5R, VACV-TK$^-$-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L, VACVΔB2R, VACVE3LΔ83NΔB2R, VACVΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83NΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12-ΔB2R, MYXVΔM31R, MYXVΔM31R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM63R, MYXVΔM64R, MVAΔWR199, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔWR199, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12ΔC11R, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12ΔC11R-hIL-15/IL-15α, VACVΔE5R-IL-15/IL-15Rα, VACVΔE5R-IL-15/IL-15Rα-OX40L, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200-hIL-15/IL-15Rα, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200ΔC11R, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200-hIL-15/IL-15RαΔC11R, MYXVΔM63RΔM64R,

MYXVΔM62R, MYXVΔM62RΔM63RΔM64R, MYXVΔM31R, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R, MYXVΔM63RΔM64R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-IL-15/IL-15Rα, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-anti-CTLA-4, e/ou MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-IL-15/IL-15Rα-anti-CTLA-4.

XVIII. Quantidade eficaz e Dosagem de MVAΔE3L-OX40L, MVAΔC7L-OX40L, MVAΔC7L-hFlt3L-OX40L, MVAΔC7LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, VACVΔC7L- OX40L, VACVΔC7L-hFlt3L-OX40L, VACVΔE5R, VACV-TK--anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L, VACVΔB2R, VACVE3LΔ83NΔB2R, VACVΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83NΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L- OX40L-IL-12, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12-ΔB2R, MYXVΔM31R, MYXVΔM31R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM63R, MYXVΔM64R, MVAΔWR199, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L- ΔWR199, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12ΔC11R, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mO1940 12ΔC11R-hIL-15/IL-15α, VACVΔE5R-IL-15/IL-15Rα, VACVΔE5R-IL-15/IL-15Rα-OX40L, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R- hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200-hIL-15/15/IL E3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200ΔC11R, VACVΔE3L83N-ΔTK- anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200-hIL-15/IL-15RαΔC11R, MYXVΔM63RΔM64R, MYXVΔM62R, MYXVΔM62RΔM63RΔM64R, MYXVΔM31R, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R, MYXVΔM63RΔM64R-

hFlt3L-OX40L, MYXV∆M62R∆M63R∆M64R-hFlt3L-OX40L, MYXV∆M62R∆M63R∆M64 ∆M62R∆M63R∆M64R∆M31R-hFlt3L-OX40L-IL-12, MYXV∆M62R∆M63R∆M64R∆M31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-IL-15/IL-15Rα, MYXV∆M62R∆M63R∆M64R ∆M31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-anti-CTLA-4 e MYXV∆M62R∆M63R∆M64R∆M31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-IL-15/IL-15Rα-anti-CTLA-4.

[0534] Em geral, o indivíduo recebe uma dosagem deMVAΔE3L-OX40L, MVAΔC7L-OX40L, MVAΔC7L-hFlt3L-OX40L, MVAΔC7LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, VACVΔC7L-OX40L, VACVΔC7L-hFlt3L-OX40L, VACVΔE5R, VACV-TK$^-$-anti-CTLA-4-∆E5R-hFlt3L-OX40L, VACVΔB2R, VACVE3LΔ83NΔB2R, VACVΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83NΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12-ΔB2R, MYXVΔM31R, MYXV∆M31R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM63R, MYXVΔM64R, MVAΔWR199, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔWR199, MVA∆E3L∆E5R-hFlt3L-mOX40L∆WR199-hIL-12, MVA∆E3L∆E5R-hFlt3L-mOX40L∆WR199-hIL-12∆C11R, MVA∆E3L∆E5R-hFlt3L-mOX40L∆WR199-hIL-12∆C11R-hIL-15/IL-15α, VACVΔE5R-IL-15/IL-15Rα, VACVΔE5R-IL-15/IL-15Rα-OX40L, VACV∆E3L83N-∆TK-anti-huCTLA-4-∆E5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12∆B2R∆WR199ΔWR200, VACV∆E3L83N-∆TK-anti-huCTLA-4-∆E5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12∆B2R∆WR199ΔWR200-hIL-15/IL-15Rα, VACV∆E3L83N-∆TK-anti-huCTLA-4-∆E5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12∆B2R∆WR199ΔWR200∆C11R, VACV∆E3L83N-∆TK-anti-huCTLA-4-∆E5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12∆B2R∆WR199ΔWR200-hIL-15/IL-15Rα∆C11R, MYXV∆M63R∆M64R, MYXV∆M62R, MYXV∆M62R∆M63R∆M64R, MYXVΔM31R, MYXV∆M62R∆M63R∆M64R∆M31R, MYXV∆M63R∆M64R-hFlt3L-OX40L, MYXV∆M62R∆M63R∆M64R-hFlt3L-OX40L, MYXV∆M62R∆M63R∆M64R∆M31R-hFlt3L-OX40L, MYXV∆M62R∆M63R∆M64R∆M31R-hFlt3L-OX40L-IL-12,

MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-IL-15/IL-15Rα, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-anti-CTLA-4, e/ou MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-IL-15/IL-15Rα-anti-CTLA-4 na faixa de cerca de 106 a cerca de 1010 unidades formadoras de placas (pfu), embora uma dose mais baixa ou mais alta possa ser administrada. Em algumas modalidades, a dosagem varia de cerca de 10^2 a cerca de 10^{10} pfu. Em algumas modalidades, a dosagem varia de cerca de 10^3 a cerca de 10^{10} pfu. Em algumas modalidades, a dosagem varia de cerca de 10^4 a cerca de 10^{10} pfu. Em algumas modalidades, a dosagem varia de cerca de 10^5 a cerca de 10^{10} pfu. Em algumas modalidades, a dosagem varia de cerca de 10^6 a cerca de 10^{10} pfu. Em algumas modalidades, a dosagem varia de cerca de 10^7 a cerca de 10^{10} pfu. Em algumas modalidades, a dosagem varia de cerca de 10^8 a cerca de 10^{10} pfu. Em algumas modalidades, a dosagem varia de cerca de 10^9 a cerca de 10^{10} pfu. Em algumas modalidades, a dosagem varia de cerca de 10^7 a cerca de 10^9 pfu. A equivalência de pfu para partículas de vírus pode diferir de acordo com o método de titulação de pfu específico usado. Geralmente, um pfu é igual a cerca de 5 a 100 partículas de vírus e 0,69 pfu é cerca de 1 TCID50. Uma quantidade terapeuticamente eficaz de MVAΔE3L-OX40L, MVAΔC7L-OX40L, MVAΔC7L-hFlt3L-OX40L, MVAΔC7LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, VACVΔC7L- OX40L, VACVΔC7L-hFlt3L-OX40L, VACVΔE5R, VACV-TK--anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L, VACVΔB2R, VACVE3LΔ83NΔB2R, VACVΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83NΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L- OX40L-IL-12, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12-ΔB2R, MYXVΔM31R, MYXVΔM31R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM63R, MYXVΔM64R, MVAΔWR199, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L- ΔWR199, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12ΔC11R, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mO1940 12ΔC11R-hIL-15/IL-15α, VACVΔE5R-IL-15/IL-

15Rα, VACVΔE5R-IL-15/IL-15Rα-OX40L, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R- hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200-hIL-15/15/IL E3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200ΔC11R, VACVΔE3L83N-ΔTK- anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200-hIL-15/IL-15RαΔC11R, MYXVΔM63RΔM64R, MYXVΔM62R, MYXVΔM62RΔM63RΔM64R, MYXVΔM31R, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R, MYXVΔM63RΔM64R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64 ΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-IL-15/IL-15Rα, MYXVΔM62RΔM63RΔM64R ΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-anti-CTLA-4 e MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-IL-15/IL-15Rα-anti-CTLA-4 pode ser administrada em um oi mais doses divididas por um período de tempo prescrito e com uma frequência de administração prescrita.

[0535]Por exemplo, como é evidente para aqueles versados na técnica, uma quantidade terapeuticamente eficaz de MVAΔE3L-OX40L, MVAΔC7L-OX40L, MVAΔC7L-hFlt3L-OX40L, MVAΔC7LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, VACVΔC7L-OX40L, VACVΔC7L-hFlt3L-OX40L, VACVΔE5R, VACV-TK$^-$-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L, VACVΔB2R, VACVE3LΔ83NΔB2R, VACVΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83NΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12-ΔB2R, MYXVΔM31R, MYXVΔM31R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM63R, MYXVΔM64R, MVAΔWR199, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔWR199, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12ΔC11R, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12ΔC11R-hIL-15/IL-15α, VACVΔE5R-IL-15/IL-15Rα, VACVΔE5R-IL-15/IL-15Rα-OX40L, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-

12ΔB2RΔWR199ΔWR200, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200-hIL-15/IL-15Rα, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200ΔC11R, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200-hIL-15/IL-15RαΔC11R, MYXVΔM63RΔM64R, MYXVΔM62R, MYXVΔM62RΔM63RΔM64R, MYXVΔM31R, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R, MYXVΔM63RΔM64R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-IL-15/IL-15Rα, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-anti-CTLA-4, e/ou MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-IL-15/IL-15Rα-anti-CTLA-4 de acordo com a presente divulgação pode variar de acordo com fatores como o estado da doença, idade, sexo, peso e condição geral do sujeito, e a capacidade de MVAΔE3L-OX40L, MVAΔC7L-OX40L, MVAΔC7L-hFlt3L-OX40L, MVAΔC7LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, VACVΔC7L-OX40L, VACVΔC7L-hFlt3L-OX40L, VACVΔE5R, VACV-TK$^-$-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L, VACVΔB2R, VACVE3LΔ83NΔB2R, VACVΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83NΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12-ΔB2R, MYXVΔM31R, MYXVΔM31R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM63R, MYXVΔM64R, MVAΔWR199, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔWR199, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12ΔC11R, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12ΔC11R-hIL-15/IL-15α, VACVΔE5R-IL-15/IL-15Rα, VACVΔE5R-IL-15/IL-15Rα-OX40L, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-

hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200-hIL-15/IL-15Rα, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200ΔC11R, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200-hIL-15/IL-15RαΔC11R, MYXVΔM63RΔM64R, MYXVΔM62R, MYXVΔM62RΔM63RΔM64R, MYXVΔM31R, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R, MYXVΔM63RΔM64R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-IL-15/IL-15Rα, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-anti-CTLA-4, e/ou MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-IL-15/IL-15Rα-anti-CTLA-4 para eliciar uma resposta imunológica desejada no indivíduo específico (a resposta do indivíduo à terapia). Ao administrar MVAΔE3L-OX40L, MVAΔC7L-OX40L, MVAΔC7L-hFlt3L-OX40L, MVAΔC7LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, VACVΔC7L-OX40L, VACVΔC7L-hFlt3L-OX40L, VACVΔE5R, VACV-TK$^-$-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L, VACVΔB2R, VACVE3LΔ83NΔB2R, VACVΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83NΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12-ΔB2R, MYXVΔM31R, MYXVΔM31R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM63R, MYXVΔM64R, MVAΔWR199, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔWR199, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12ΔC11R, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12ΔC11R-hIL-15/IL-15α, VACVΔE5R-IL-15/IL-15Rα, VACVΔE5R-IL-15/IL-15Rα-OX40L, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200-hIL-15/IL-15Rα, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200ΔC11R,

VACV∆E3L83N-∆TK-anti-huCTLA-4-∆E5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12∆B2R∆WR199∆WR200-hIL-15/IL-15Rα∆C11R, MYXV∆M63R∆M64R, MYXV∆M62R, MYXV∆M62R∆M63R∆M64R, MYXV∆M31R, MYXV∆M62R∆M63R∆M64R∆M31R, MYXV∆M63R∆M64R-hFlt3L-OX40L, MYXV∆M62R∆M63R∆M64R-hFlt3L-OX40L, MYXV∆M62R∆M63R∆M64R∆M31R-hFlt3L-OX40L, MYXV∆M62R∆M63R∆M64R∆M31R-hFlt3L-OX40L-IL-12, MYXV∆M62R∆M63R∆M64R∆M31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-IL-15/IL-15Rα, MYXV∆M62R∆M63R∆M64R∆M31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-anti-CTLA-4, e/ou MYXV∆M62R∆M63R∆M64R∆M31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-IL-15/IL-15Rα-anti-CTLA-4 para um indivíduo, a dosagem também irá variar dependendo de fatores como a condição médica geral, história médica anterior, tipo e progressão da doença, carga do tumor, a presença ou ausência de infiltração de células imunológicas no tumor e similares.

[0536] Em algumas modalidades, pode ser vantajoso formular composições da presente divulgação na forma de unidade de dosagem para facilidade de administração e uniformidade de dosagem. "Forma de unidade de dosagem, conforme usado neste documento" refere-se a unidades fisicamente discretas adequadas como dosagens unitárias para os indivíduos mamíferos a serem tratados; cada unidade contendo uma quantidade predeterminada de material ativo calculada para produzir o efeito terapêutico desejado em associação com o veículo farmaceuticamente ou veterinário aceitável necessário.

XIX. <u>Administração ou regime terapêutico de MVAΔE3L-OX40L, MVAΔC7L-OX40L, MVAΔC7L-hFlt3L-OX40L, MVAΔC7LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, VACVΔC7L- OX40L, VACVΔC7L-hFlt3L-OX40L, VACVΔE5R, VACV-TK--anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L, VACVΔB2R, VACVE3LΔ83NΔB2R, VACVΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83NΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-</u>

CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L- OX40L-IL-12, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12-ΔB2R, MYXVΔM31R, MYXVΔM31R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM63R, MYXVΔM64R, MVAΔWR199, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L- ΔWR199, MVA∆E3L∆E5R-hFlt3L-mOX40L∆WR199-hIL-12, MVA∆E3L∆E5R-hFlt3L-mOX40L∆WR199-hIL-12∆C11R, MVA∆E3L∆E5R-hFlt3L-mO1940 12∆C11R-hIL-15/IL-15α, VACVΔE5R-IL-15/IL-15Rα, VACVΔE5R-IL-15/IL-15Rα-OX40L, VACV∆E3L83N-∆TK-anti-huCTLA-4-∆E5R- hFlt3L-hOX40L-hIL-12∆B2R∆WR199ΔWR200, VACV∆E3L83N-∆TK-anti-huCTLA-4-∆E5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12∆B2R∆WR199ΔWR200-hIL-15/15/IL E3L83N-∆TK-anti-huCTLA-4-∆E5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12∆B2R∆WR199∆WR200∆C11R, VACV∆E3L83N-∆TK- anti-huCTLA-4-∆E5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12∆B2R∆WR199∆WR200-hIL-15/IL-15Rα∆C11R, MYXV∆M63R∆M64R, MYXV∆M62R, MYXV∆M62R∆M63R∆M64R, MYXVΔM31R, MYXV∆M62R∆M63R∆M64R∆M31R, MYXV∆M63R∆M64R-hFlt3L-OX40L, MYXV∆M62R∆M63R∆M64R-hFlt3L-OX40L, MYXV∆M62R∆M63R∆M64 ∆M62R∆M63R∆M64R∆M31R-hFlt3L-OX40L-IL-12, MYXV∆M62R∆M63R∆M64R∆M31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-IL-15/IL-15Rα, MYXV∆M62R∆M63R∆M64R ∆M31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-anti-CTLA-4 e MYXV∆M62R∆M63R∆M64R∆M31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-IL-15/IL-15Rα-anti-CTLA-4.

[0537] As composições farmacêuticas são tipicamente formuladas para serem compatíveis com a via de administração pretendida. Administração de MVAΔE3L-OX40L, MVAΔC7L-OX40L, MVAΔC7L-hFlt3L-OX40L, MVAΔC7LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, VACVΔC7L- OX40L, VACVΔC7L-hFlt3L-OX40L, VACVΔE5R, VACV-TK--anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L, VACVΔB2R, VACVE3LΔ83NΔB2R, VACVΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83NΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L- OX40L-IL-12, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12-ΔB2R, MYXVΔM31R,

MYXVΔM31R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM63R, MYXVΔM64R, MVAΔWR199, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L- ΔWR199, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12ΔC11R, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mO1940 12ΔC11R-hIL-15/IL-15α, VACVΔE5R-IL-15/IL-15Rα, VACVΔE5R-IL-15/IL-15Rα-OX40L, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R- hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200-hIL-15/15/IL E3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200ΔC11R, VACVΔE3L83N-ΔTK- anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200-hIL-15/IL-15RαΔC11R, MYXVΔM63RΔM64R, MYXVΔM62R, MYXVΔM62RΔM63RΔM64R, MYXVΔM31R, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R, MYXVΔM63RΔM64R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64 ΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-IL-15/IL-15Rα, MYXVΔM62RΔM63RΔM64R ΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-anti-CTLA-4 e MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-IL-15/IL-15Rα-anti-CTLA-4 pode ser alcançado usando mais de uma via. Exemplos de vias de administração incluem, mas não estão limitados a parenteral (*por exemplo*, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, intradérmica, subcutânea), intratumoral, intratecal, intranasal, sistêmica, transdérmica, iontoforética, intradérmica, intraocular ou administração tópica. Em algumas modalidades, MVAΔE3L-OX40L, MVAΔC7L-OX40L, MVAΔC7L-hFlt3L-OX40L, MVAΔC7LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, VACVΔC7L- OX40L, VACVΔC7L-hFlt3L-OX40L, VACVΔE5R, VACV-TK--anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L, VACVΔB2R, VACVE3LΔ83NΔB2R, VACVΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83NΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L- OX40L-IL-12, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12-ΔB2R, MYXVΔM31R,

MYXVΔM31R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM63R, MYXVΔM64R, MVAΔWR199, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L- ΔWR199, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12ΔC11R, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mO1940 12ΔC11R-hIL-15/IL-15α, VACVΔE5R-IL-15/IL-15Rα, VACVΔE5R-IL-15/IL-15Rα-OX40L, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R- hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200-hIL-15/15/IL E3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200ΔC11R, VACVΔE3L83N-ΔTK- anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200-hIL-15/IL-15RαΔC11R, MYXVΔM63RΔM64R, MYXVΔM62R, MYXVΔM62RΔM63RΔM64R, MYXVΔM31R, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R, MYXVΔM63RΔM64R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64 ΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-IL-15/IL-15Rα, MYXVΔM62RΔM63RΔM64R ΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-anti-CTLA-4 e MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-IL-15/IL-15Rα-anti-CTLA-4 é administrado diretamente no tumor, por exemplo, por injeção intratumoral, em que uma reação local direta é desejada. Além disso, as vias de administração de MVAΔE3L-OX40L, MVAΔC7L-OX40L, MVAΔC7L-hFlt3L-OX40L, MVAΔC7LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, VACVΔC7L-OX40L, VACVΔC7L-hFlt3L-OX40L, VACVΔE5R, VACV-TK$^-$-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L, VACVΔB2R, VACVE3LΔ83NΔB2R, VACVΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83NΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12-ΔB2R, MYXVΔM31R, MYXVΔM31R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM63R, MYXVΔM64R, MVAΔWR199, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔWR199, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-

mOX40LΔWR199-hIL-12ΔC11R, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12ΔC11R-hIL-15/IL-15α, VACVΔE5R-IL-15/IL-15Rα, VACVΔE5R-IL-15/IL-15Rα-OX40L, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200-hIL-15/IL-15Rα, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200ΔC11R, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200-hIL-15/IL-15RαΔC11R, MYXVΔM63RΔM64R, MYXVΔM62R, MYXVΔM62RΔM63RΔM64R, MYXVΔM31R, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R, MYXVΔM63RΔM64R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-IL-15/IL-15Rα, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-anti-CTLA-4, e/ou MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-IL-15/IL-15Rα-anti-CTLA-4MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-IL-15/IL-15Rα-anti-CTLA-4 pode variar, por exemplo, a primeira administração usando uma injeção intratumoral e a administração subsequente por meio de uma injeção intravenosa ou qualquer combinação das mesmas. Uma quantidade terapeuticamente eficaz de MVAΔE3L-OX40L, MVAΔC7L-OX40L, MVAΔC7L-hFlt3L-OX40L, MVAΔC7LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, VACVΔC7L- OX40L, VACVΔC7L-hFlt3L-OX40L, VACVΔE5R, VACV-TK--anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L, VACVΔB2R, VACVE3LΔ83NΔB2R, VACVΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83NΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12-ΔB2R, MYXVΔM31R, MYXVΔM31R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM63R, MYXVΔM64R, MVAΔWR199, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L- ΔWR199,

MVA∆E3L∆E5R-hFlt3L-mOX40L∆WR199-hIL-12, MVA∆E3L∆E5R-hFlt3L-mOX40L∆WR199-hIL-12∆C11R, MVA∆E3L∆E5R-hFlt3L-mO1940 12∆C11R-hIL-15/IL-15α, VACVΔE5R-IL-15/IL-15Rα, VACVΔE5R-IL-15/IL-15Rα-OX40L, VACV∆E3L83N-∆TK-anti-huCTLA-4-∆E5R- hFlt3L-hOX40L-hIL-12∆B2R∆WR199ΔWR200, VACV∆E3L83N-∆TK-anti-huCTLA-4-∆E5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12∆B2R∆WR199ΔWR200-hIL-15/15/IL E3L83N-∆TK-anti-huCTLA-4-∆E5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12∆B2R∆WR199ΔWR200∆C11R, VACV∆E3L83N-∆TK- anti-huCTLA-4-∆E5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12∆B2R∆WR199ΔWR200-hIL-15/IL-15Rα∆C11R, MYXV∆M63R∆M64R, MYXV∆M62R, MYXV∆M62R∆M63R∆M64R, MYXVΔM31R, MYXV∆M62R∆M63R∆M64R∆M31R, MYXV∆M63R∆M64R-hFlt3L-OX40L, MYXV∆M62R∆M63R∆M64R-hFlt3L-OX40L, MYXV∆M62R∆M63R∆M64 ∆M62R∆M63R∆M64R∆M31R-hFlt3L-OX40L-IL-12, MYXV∆M62R∆M63R∆M64R∆M31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-IL-15/IL-15Rα, MYXV∆M62R∆M63R∆M64R ∆M31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-anti-CTLA-4 e MYXV∆M62R∆M63R∆M64R∆M31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-IL-15/IL-15Rα-anti-CTLA-4 a injeção pode ser administrada por um período de tempo prescrito e com uma frequência de administração prescrita. Em certas modalidades, MVAΔE3L-OX40L, MVAΔC7L-OX40L, MVAΔC7L-hFlt3L-OX40L, MVAΔC7LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, VACVΔC7L- OX40L, VACVΔC7L-hFlt3L-OX40L, VACVΔE5R, VACV-TK--anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L, VACVΔB2R, VACVE3LΔ83NΔB2R, VACVΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83NΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L- OX40L-IL-12, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12-ΔB2R, MYXVΔM31R, MYXVΔM31R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM63R, MYXVΔM64R, MVAΔWR199, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L- ΔWR199, MVA∆E3L∆E5R-hFlt3L-mOX40L∆WR199-hIL-12, MVA∆E3L∆E5R-hFlt3L-mOX40L∆WR199-hIL-12∆C11R, MVA∆E3L∆E5R-hFlt3L-mO1940 12∆C11R-hIL-15/IL-15α, VACVΔE5R-IL-15/IL-

15Rα, VACVΔE5R-IL-15/IL-15Rα-OX40L, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R- hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200-hIL-15/15/IL E3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200ΔC11R, VACVΔE3L83N-ΔTK- anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200-hIL-15/IL-15RαΔC11R, MYXVΔM63RΔM64R, MYXVΔM62R, MYXVΔM62RΔM63RΔM64R, MYXVΔM31R, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R, MYXVΔM63RΔM64R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64 ΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-IL-15/IL-15Rα, MYXVΔM62RΔM63RΔM64R ΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-anti-CTLA-4 e MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-IL-15/IL-15Rα-anti-CTLA-4 pode ser alcançado usando mais de uma via. Por exemplo, o poxvírus recombinante da presente tecnologia pode ser administrado em um ambiente neoadjuvante (pré-operatório) ou adjuvante (pós-operatório) para indivíduos infligidos com tumores primários volumosos. Prevê-se que tal regime terapêutico otimizado induzirá uma resposta imunológica contra o tumor e reduzirá a carga do tumor em um indivíduo antes ou após a terapia primária, como a cirurgia. Além disso, MVAΔE3L-OX40L, MVAΔC7L-OX40L, MVAΔC7L-hFlt3L-OX40L, MVAΔC7LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, VACVΔC7L- OX40L, VACVΔC7L-hFlt3L-OX40L, VACVΔE5R, VACV-TK--anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L, VACVΔB2R, VACVE3LΔ83NΔB2R, VACVΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83NΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12-ΔB2R, MYXVΔM31R, MYXVΔM31R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM63R, MYXVΔM64R, MVAΔWR199, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L- ΔWR199, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-

mOX40LΔWR199-hIL-12ΔC11R, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mO1940 12ΔC11R-hIL-15/IL-15α, VACVΔE5R-IL-15/IL-15Rα, VACVΔE5R-IL-15/IL-15Rα-OX40L, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R- hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200-hIL-15/15/IL E3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200ΔC11R, VACVΔE3L83N-ΔTK- anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200-hIL-15/IL-15RαΔC11R, MYXVΔM63RΔM64R, MYXVΔM62R, MYXVΔM62RΔM63RΔM64R, MYXVΔM31R, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R, MYXVΔM63RΔM64R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64 ΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-IL-15/IL-15Rα, MYXVΔM62RΔM63RΔM64R ΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-anti-CTLA-4 e MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-IL-15/IL-15Rα-anti-CTLA-4 pode ser administrado em conjunto com outros tratamentos terapêuticos, como quimioterapia ou radiação.

[04648] Em certas modalidades, o MVAΔE3L-OX40L, MVAΔC7L-OX40L, MVAΔC7L-hFlt3L-OX40L, MVAΔC7LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L- OX40L-ΔC11R, VACVΔC7L-OX40L, VACVΔC7L-hFlt3L-OX40L, VACVΔE5R, VACV-TK--anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L, VACVΔB2R, VACVE3LΔ83NΔB2R, VACVΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83NΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA- 4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12-ΔB2R, MYXVΔM31R, MYXVΔM31R-hFΔMlt3L-OX40L63, MYXVΔM31R, MYXVΔM31M-hFΔMlt3LR-OX40L63, MYXVΔM31R-hFΔMlt3R-OX40L63, MYXVΔM31R63 MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔWR199, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12ΔC11R3F3R, MVAΔE3 mOX40LΔWR199-hIL-12ΔC11R-hIL-15/IL-15α,

VACVΔE5R-IL-15/IL-15Rα, VACVΔE5R-IL-15/IL-15Rα-OX40L, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA -4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ILΔ-15200/-1500 IL-15Rα, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR19 9ΔWR200ΔC11R, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200-hIL-15/IL-15RαΔC11R, MYXVΔM63RΔ M64R, MYXVΔM62R, MYXVΔM62RΔM63RΔM64R, MYXVΔM31R, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R, MYXVΔM63RΔM64R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64R M62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12 15/IL-15Rα, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-anti-CTLA-4 e/ou MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12 O vírus -IL-15/IL-15Rα-anti-CTLA-4 é administrado pelo menos uma vez por semana ou mensalmente, mas pode ser administrado com mais frequência se necessário, como duas vezes por semana por várias semanas, meses, anos ou mesmo indefinidamente por tanto tempo à medida que os benefícios persistem. Administrações mais frequentes são contempladas se toleradas e se resultarem em benefícios sustentados ou aumentados. Os benefícios dos presentes métodos incluem, mas não estão limitados aos seguintes: redução do número de células de cancêr, redução do tamanho do tumor, erradicação do tumor, inibição da infiltração de células de cancêr em órgãos periféricos, inibição ou estabilização ou erradicação do crescimento metastático, inibição ou estabilização do crescimento do tumor e estabilização ou melhoria da qualidade de vida. Além disso, os benefícios podem incluir a indução de uma resposta imunológica contra o tumor, ativação de células $CD4^+$ T efetoras, um aumento de células $CD8^+$ T efetoras ou redução de células $CD4^+$ reguladoras. Por exemplo, no contexto do melanoma, um benefício pode ser a ausência de recorrências ou metástases em um, dois, três, quatro, cinco ou mais anos após

o diagnóstico inicial de melanoma. Avaliações similares podem ser feitas para câncer de cólon e outros tumores sólidos.

[0538]Em certas outras modalidades, a massa de tumor ou células de tumor são tratadas com MVAΔE3L-OX40L, MVAΔC7L-OX40L, MVAΔC7L-hFlt3L-OX40L, MVAΔC7LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, VACVΔC7L- OX40L, VACVΔC7L-hFlt3L-OX40L, VACVΔE5R, VACV-TK--anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L, VACVΔB2R, VACVE3LΔ83NΔB2R, VACVΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83NΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12-ΔB2R, MYXVΔM31R, MYXVΔM31R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM63R, MYXVΔM64R, MVAΔWR199, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L- ΔWR199, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12ΔC11R, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mO1940 12ΔC11R-hIL-15/IL-15α, VACVΔE5R-IL-15/IL-15Rα, VACVΔE5R-IL-15/IL-15Rα-OX40L, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R- hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200-hIL-15/15/IL E3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200ΔC11R, VACVΔE3L83N-ΔTK- anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200-hIL-15/IL-15RαΔC11R, MYXVΔM63RΔM64R, MYXVΔM62R, MYXVΔM62RΔM63RΔM64R, MYXVΔM31R, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R, MYXVΔM63RΔM64R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64 ΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-IL-15/IL-15Rα, MYXVΔM62RΔM63RΔM64R ΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-anti-CTLA-4 e MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-IL-15/IL-15Rα-anti-CTLA-4 *in vivo*, *ex vivo*, ou *in vitro*.

XX Vetores

[0540] Em algumas modalidades, um vetor baseado em plasmídeo pCB é usado para inserir um gene específico de interesse (SG), como OX40L (murino ou humano), sob o controle do promotor sintético inicial e tardio de vaccinia (PsE/L). A metodologia para a construção do vetor foi descrita (*consulte M. Puhlmann, C. K. Brown, M. Gnant, J. Huang, S. K. Libutti, H. R. Alexander, D. L. Bartlett, Vaccinia as a vector for tumor-directed gene therapy:* Biodistribution of a thymidine kinase-deleted mutant *Cancer Gene Therapy* 7(1):66–73 (2000)). Um gene de xantina-guanina fosforibosil transferase (gpt) sob o controle do promotor de vaccinia P7.5 é usado como um marcador selecionável. Uma sequência de ácido nucleico do vetor pCB-mOX40L-gpt ilustrativa é apresentada na SEQ ID NO: 3. Em algumas modalidades, um vetor baseado em plasmídeo pUC57 é usado para inserir um gene específico de interesse (SG), como OX40L (murino ou humano), sob o controle do promotor sintético inicial e tardio de vaccinia (PsE/L). Em algumas modalidades, um vetor baseado em plasmídeo pMA é usado para inserir um gene específico de interesse (SG), como OX40L (murino ou humano), sob o controle do promotor sintético inicial e tardio de vaccinia (PsE/L). Um gene mCherry sob o controle do promotor vaccinia P7.5 é usado como um marcador selecionável. Uma sequência de ácido nucleico do vetor pUC57-hOX40L-mCherry ilustrativa é apresentada na SEQ ID NO: 5. Sequências de ácido nucleico de vetores ilustrativos adicionais da presente tecnologia são mostradas nas **Tabelas 2-5**.

[0541] Em algumas modalidades, esses cassetes de expressão são flanqueados por uma sequência parcial do gene TK em cada lado (TK-L, TK-R). A recombinação homóloga que ocorre no locus TK do DNA de plasmídeo e MVAΔE3L, MVAΔC7L, MVAΔE5R, VACVΔC7L, VACVΔE5R ou MYXVΔM31R resulta na inserção de OX40L e cassetes de expressão de marcador selecionável nos cassetes de expressão MVAΔE3LE5R ou MYXVΔM31R. C7L, MVAΔE5R, VACVΔC7L, VACVΔE5R, ou MYXVΔM31R DNA genômico TK locus para gerar MVAΔE3L-TK(-)-OX40L, MVAΔC7L-TK(-)-OX40L, MVAΔE5R-

TK(-)-OX40L, VACVΔC7L-TK(-)-OX40L, VACVΔE5R-TK(-)-OX40L, ou MYXVΔM31R-TK(-)-OX40L. Adicionalmente ou alternativamente, loci adequados diferentes do locus TK dentro do vírus podem ser usados. A recombinação homóloga que ocorre em um locus de gene viral adequado do DNA de plasmídeo e MVA, MVA∆E3L, MVA∆C7L, MVAΔE5R, VACV, VACVΔC7L, VACVΔE5R, MYXV ou MYXVΔM31R resultados de DNA genômico na inserção de um ou mais genes específicos de interesse (*por exemplo*, OX40L, hFlt3L, anti-CTLA-4, *etc.*) e/ou cassetes de expressão de marcadores selecionáveis no gene viral de DNA genômico MVA, MVA∆E3L, MVA∆C7L, MVAΔE5R, VACVΔC7L, VACVΔE5R, MYXV ou MYXVΔM31R locus para gerar poxvírus recombinantes, tais como aqueles descritos neste documento.

[0542] Em algumas modalidades, a posição 18.407 a 18.859 da sequência genômica MVA (SEQ ID NO: 1) é substituída por uma sequência de ácido nucleico heteróloga que compreende uma ou mais estruturas de leitura aberta que codificam para um marcador selecionável, como gpt ou mCherry, e um gene de interesse (SG), como OX40L. Em algumas modalidades, a posição 75.560 a 76.093 da sequência genômica MVA (SEQ ID NO: 1) é substituída por uma sequência de ácido nucleico heteróloga que compreende uma ou mais estruturas de leitura aberta que codificam para um marcador selecionável, como gpt ou mCherry, e um gene de interesse (SG), como OX40L. Em algumas modalidades, a posição 15.716 a 16.168 da sequência genômica VACV (SEQ ID NO: 2) é substituída por uma sequência de ácido nucleico heteróloga que compreende uma ou mais estruturas de leitura aberta que codificam para um marcador selecionável, como gpt ou mCherry, e um gene de interesse (SG), como OX40L. Em algumas modalidades, a posição 75.798 a 75.868 da sequência genômica MVA (SEQ ID NO: 1) é substituída por uma sequência de ácido nucleico heteróloga que compreende uma ou mais estruturas de leitura aberta que codificam para um marcador selecionável, como gpt ou mCherry, e um gene de interesse (SG), como OX40L. Em

algumas modalidades, a posição 80.962 a 81.032 da sequência genômica VACV (SEQ ID NO: 2) é substituída por uma sequência de ácido nucleico heteróloga que compreende uma ou mais estruturas de leitura aberta que codificam para um marcador selecionável, como gpt ou mCherry, e um gene de interesse (SG), como OX40L. Os vírus recombinantes são enriquecidos por seleção e purificados em placa por 4-5 rodadas até que os vírus recombinantes apropriados sejam obtidos.

[0543] Similarmente, em algumas modalidades, um vetor à base de plasmídeo pUC57 é usado para inserir um gene específico de interesse (SG), como hFlt3L, no esqueleto do genoma viral MVA ou VACV. GFP pode ser usado como um marcador selecionável. Uma sequência de ácido nucleico do vetor pUC57-hFlt3L-GFP ilustrativa é apresentada na SEQ ID NO: 4. Em algumas modalidades, esses cassetes de expressão são flanqueados por uma sequência parcial do gene C7 em cada lado. Adicionalmente ou alternativamente, loci adequados diferentes do locus C7 dentro do vírus podem ser usados. A recombinação homóloga que ocorre no locus C7 do DNA de plasmídeo e DNA genômico de MVA∆E3L, MVAΔE5R, MVA, VACV, VACVΔC7L, VACVΔE5R, MYXV, ou MYXVΔM31R resulta na inserção de hFlt3L e cassetes de expressão de marcadores selecionáveis em locus C7 de DNA genômico de MVA∆E3 MVAΔE5R, MVA, VACV, VACVΔC7L, VACVΔE5R, MYXV ou MYXVΔM31R.

[0544] Em algumas modalidades, a posição 18.407 a 18.859 da sequência genômica MVA (SEQ ID NO: 1) é substituída por uma sequência de ácido nucleico heteróloga que compreende uma ou mais estruturas de leitura aberta que codificam para um marcador selecionável, como GFP, e um gene de interesse (SG), como hFlt3L. Em algumas modalidades, a posição 75.560 a 76.093 da sequência genômica MVA (SEQ ID NO: 1) é substituída por uma sequência de ácido nucleico heteróloga que compreende uma ou mais estruturas de leitura aberta que codificam para um marcador selecionável, como gpt ou mCherry, e um gene de interesse (SG), como hFlt3L. Em algumas

modalidades, a posição 15.716 a 16.168 da sequência genômica VACV (SEQ ID NO: 2) é substituída por uma sequência de ácido nucleico heteróloga que compreende uma ou mais estruturas de leitura aberta que codificam para um marcador selecionável, como GFP, e um gene de interesse (SG), como hFlt3L. Em algumas modalidades, a posição 80.962 a 81.032 da sequência genômica VACV (SEQ ID NO: 2) é substituída por uma sequência de ácido nucleico heteróloga que compreende uma ou mais estruturas de leitura aberta que codificam para um marcador selecionável, como GFP, e um gene de interesse (SG), como hFlt3L. Os vírus recombinantes são enriquecidos por seleção e purificados em placa por 4-5 rodadas até que os vírus recombinantes apropriados sejam obtidos.

[0545] Em algumas modalidades, a posição 38.432 a 39.385 da sequência genômica MVA (SEQ ID NO: 1) é substituída por uma sequência de ácido nucleico heteróloga que compreende uma ou mais estruturas de leitura aberta que codificam para um marcador selecionável, como mCherry, e/ou um gene de interesse (SG), como hFlt3L e/ou OX40L. Os vírus recombinantes são enriquecidos por seleção e purificados em placa por 4-5 rodadas até que os vírus recombinantes apropriados sejam obtidos.

[0546] Em algumas modalidades, a posição 49.236 a 50.261 da sequência genômica VACV (SEQ ID NO: 2) é substituída por uma sequência de ácido nucleico heteróloga que compreende uma ou mais estruturas de leitura aberta que codificam para um marcador selecionável, como mCherry, e/ou um gene de interesse (SG), como hFlt3L e/ou OX40L. Os vírus recombinantes são enriquecidos por seleção e purificados em placa por 4-5 rodadas até que os vírus recombinantes apropriados sejam obtidos.

[0547]Em algumas modalidades, um vetor pCB-OX40L-gpt ou um vetor pUC57-OX40L-mCherry ou um vetor pUC57-OX40L-mCherry e um vetor pUC57-hFlt3L-GFP são usados para inserir OX40L no locus TK e hFlt3L no Locus C7 para gerar MVA∆C7L-hFlt3L-TK(-)-OX40L ou VACV∆C7L-hFlt3L-TK(-)-OX40L.

[0548]Será apreciado que qualquer outro vetor de expressão adequado para integração no genoma de MVA, VACV ou MYXV poderia ser usado, bem como promotores alternativos, elementos reguladores, marcadores selecionáveis, locais de clivagem e/ou regiões de inserção não essenciais de MVA, VACV ou MYXV. Em algumas modalidades, o marcador selecionável é uma proteína repórter, em que a proteína repórter é uma proteína bioluminescente, uma proteína fluorescente ou uma proteína quimioluminescente. Em algumas modalidades, a proteína repórter é a proteína fluorescente verde (GFP). Em algumas modalidades, o marcador selecionável é o gene da xantina-guanina fosforibosil transferase (gpt). Em algumas modalidades, o marcador selecionável é um gene mCherry. MVA, VAVC e MYXV codificam muitos genes imunomoduladores nas extremidades do genoma linear, incluindo C11, K3, F1, F2, F4, F6, F8, F9, F11, F14.5, J2, A46, E3L, B18R (WR200), E5R, K7R, C12L, B8R, B14R, N1L, C11R, K1L, C16, M1L, N2L e WR199 (ou seus ortólogos). Esses genes (ou seus ortólogos) podem ser deletados para potencializar as propriedades de ativação imunológica do vírus e permitir a inserção de transgenes.

XXI. <u>Administração das cepas de poxvírus modificadas da present tecnologia como um adjuvante para um indivíduo para tratar o câncer</u>

A. <u>Composições</u>

Adjuvantes de vacina contra o câncer de imunização de ativação

[0549]Recentes descobertas de neoantígenos de câncer geraram um interesse renovado na vacinação contra o câncer e na combinação da vacinação contra o câncer com o bloqueio do ponto de verificação imunológico para aumentar os efeitos da vacinação. O desenvolvimento de adjuvantes vacinais eficazes que podem maximizar as respostas imunológicas antitumorais é fundamental para o sucesso das vacinas contra o câncer.

[0550] As vacinas contra o câncer compreendem antígenos do câncer e adjuvantes imunológicos. Os antígenos de câncer geralmente incluem

antígenos de diferenciação tumoral, antígenos de testículo de câncer, neoantígenos e antígenos virais no caso de tumores associados à infecção por vírus oncogênicos. Os antígeno de câncer podem ser fornecidos na forma de células de tumor irradiadas, células dendríticas (DCs) carregadas com lisados ou peptídeos de células de tumor, DNA ou RNA que codifica o antígeno, bem como vírus oncolítico com transgene (s) que codifica o (s) antígeno (s) de câncer. As células dendríticas (DCs) são células apresentadoras de antígenos profissionais que são importantes para a preparação de células T nativas para gerar respostas de células T específicas para o antígeno. Adjuvantes imunológicos são agentes que promovem a captação de antígenos por DCs e/ou maturação e ativação de DCs. Vários adjuvantes imunológicos, incluindo agonistas do receptor similares a toll (TLR), poli (I:C) (agonista TLR3), CpG (agonista TLR9), Imiquimod (agonista TLR7), bem como agonistas STING, mostraram melhorar a eficácia da vacina em modelos pré-clínicos e ambientes clínicos.

Cepas de Poxvírus modificadas da presente tecnologia como Terapia Adjuvante

[0551] A divulgação da presente tecnologia se refere ao uso das cepas de poxvírus modificadas descritas neste documento (por exemplo, composição de MVAΔE3L-OX40L, MVAΔC7L-OX40L, MVAΔC7L-hFlt3L-OX40L, MVAΔC7LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, VACVΔC7L-OX40L, VACVΔC7L-hFlt3L-OX40L, VACVΔE5R, VACV-TK$^-$-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L, VACVΔB2R, VACVE3LΔ83NΔB2R, VACVΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83NΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12-ΔB2R, MYXVΔM31R, MYXVΔM31R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM63R, MYXVΔM64R, MVAΔWR199, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔWR199, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-

mOX40LΔWR199-hIL-12ΔC11R, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12ΔC11R-hIL-15/IL-15α, VACVΔE5R-IL-15/IL-15Rα, VACVΔE5R-IL-15/IL-15Rα-OX40L, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200-hIL-15/IL-15Rα, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200ΔC11R, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200-hIL-15/IL-15RαΔC11R, MYXVΔM63RΔM64R, MYXVΔM62R, MYXVΔM62RΔM63RΔM64R, MYXVΔM31R, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R, MYXVΔM63RΔM64R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-IL-15/IL-15Rα, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-anti-CTLA-4, e/ou MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-IL-15/IL-15Rα-anti-CTLA-4 como adjuvantes de vacina. Em algumas modalidades, a divulgação da presente tecnologia se refere ao uso de MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-OX40L como um adjuvante de vacina. Em algumas modalidades, a divulgação da presente tecnologia se refere ao uso de MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-OX40L em combinação com vacínia inativada por calor (Heat-iMVA, Heat-iMVAΔE5R) como um adjuvante de vacina. Heat-iMVA mostrou induzir IFN tipo I em DCs convencionais (cDCs) por meio da via dependente de cGAS/STING e também induz IFN tipo I em DCs plasmocitoides (pDCs) *por meio* do mecanismo dependente de TLR7/MyD88. Além disso, a injeção intratumoral de Heat-iMVA erradica os tumores injetados e leva à geração de imunidade antitumoral sistêmica como monoterapia ou em combinação com bloqueio de ponto de verificação imunológico (ICB).

Antígenos Alvo

[0552] As composições e métodos divulgados neste documento não se destinam a ser limitados pela escolha do antígeno ou neoantígeno. Embora numerosos exemplos de antígenos e neoantígenos sejam fornecidos, o versado na técnica pode facilmente utilizar o adjuvante divulgado neste documento com um antígeno ou neoantígeno de escolha. Antígenos alvo exemplares e não limitativos que podem ser usados em regimes terapêuticos da presente tecnologia incluem antígenos de diferenciação de tumor, antígenos de testículo de câncer, neoantígenos, antígenos virais no caso de tumores associados à infecção por vírus oncogênicos, GPA33, HER2/neu, GD2, MAGE-1, MAGE-3, BAGE, GAGE-1, GAGE-2, MUM-1, CDK4, N-acetilglucosaminiltransferase, p15, gp75, beta-catenina, ErbB2, antígeno de câncer 125 (CA-125), antígeno carcinoembrionário (CEA), RAGE, MART (antígeno de melanoma), MUC-1, MUC-2, MUC-3, MUC-4, MUC-5ac, MUC-16, MUC-17, tirosinase, proteínas relacionadas à tirosinase 1 e 2, Pmel 17 (gp100), sequência de íntron V GnT-V (sequência de íntron V de N-acetilglucoaminiltransferase V), câncer de próstata psm, PRAME (antígeno de melanoma), β-catenina, EBNA (antígeno nuclear do vírus Epstein-Barr) 1-6, p53, kras, proteína de resistência pulmonar (LRP) Bcl-2, antígeno específico da próstata (PSA), Ki-67, CEACAM6, antígeno específico do cólon-p (CSAp), NY-ESO-1, vírus do papiloma humano E6 e E7, e qualquer combinação dos mesmos. Em algumas modalidades, o antígeno compreende um neoantígeno selecionado a partir do grupo que consiste em M27 (REGVELCPGNKYEMRRHGTTHSLVIHD) (SEQ ID NO: 17), M30 (PSKPSFQEFVDWENVSPELNSTDQPFL) (SEQ ID NO: 18), M48 (SHCHWNDLAVIPAGVVHNWDFEPRKVS) (SEQ ID NO: 19), e as combinações dos mesmos. O antígeno alvo também pode ser um fragmento ou polipeptídeo de fusão compreendendo uma porção imunologicamente ativa dos antígenos listados acima.

Bloqueio de ponto de verificação imunológico (ICB)

[0553] Em algumas modalidades, as composições imunogênicas da presente tecnologia compreendem ainda um ou mais agentes de bloqueio de ponto de verificação imunológico. Os anticorpos de bloqueio de ponto de verificação imunológico (ICB) têm estado na vanguarda da imunoterapia e foram aceitos como um dos pilares das opções de gerenciamento do câncer, incluindo cirurgia, radiação e quimioterapia. Uma vez que os pontos de verificação imunológicos foram implicados na regulação negativa da imunidade antitumoral, os agentes e anticorpos direcionados às proteínas do ponto de verificação imunológico ou seus ligantes (CTLA-4, PD-1 ou PD-L1) foram bem-sucedidos na desinibição de células T antitumorais, levando a proliferação e sobrevivência de células T ativadas. Isso levou à aprovação do FDA de agentes de bloqueio de múltiplos pontos de verificação imunológico (ICB) para pacientes com cânceres avançados de vários tipos histológicos, incluindo melanoma, câncer de pulmão de células não pequenas, carcinoma de células renais, linfoma de Hodgkin, câncer de cabeça e pescoço, carcinoma urotelial, carcinoma de células de Merkel, adenocarcinoma gástrico PD-L1^{+}, bem como deficiência de reparo de incompatibilidade e tumores sólidos metastáticos elevados de instabilidade de microssatélites (MSI).

[0554] Exemplos não limitativos de agentes de bloqueio de ponto de verificação imunológico incluem agentes ou anticorpos que modulam a atividade de uma ou mais proteínas de ponto de verificação, incluindo anticorpo anti-PD-1, anticorpo anti-PD-L1, anticorpo anti-CTLA-4, ipilimumabe, nivolumabe, pidilizumabe, lambrolizumabe, pembrolizumabe, atezolizumabe, avelumabe, durvalumabe, MPDL3280A, BMS-936559, MEDI-4736, MSB 00107180, LAG-3, TIM3, B7-H3, B7-H4, TIGIT, AMP-224, MDX-1105, arelumabe, tremelimumabe, IMP321, MGA271, BMS-986016, lirilumabe, urelumabe, PF-05082566, IPH2101, MEDI-6469, CP-870.893, mogamulizumabe, varlilumabe, galiximabe, AMP-514, AUNP 12, Indoximode,

NLG-919, INCB024360, CD80, DLBCL ICOS, PDR001 e qualquer combinação dos mesmos.

Composições e preparações farmacêuticas da presente tecnologia

[0555] São divulgadas neste documento composições farmacêuticas que compreendem MVAΔE3L-OX40L, MVAΔC7L-OX40L, MVAΔC7L-hFlt3L-OX40L, MVAΔC7LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, VACVΔC7L-OX40L, VACVΔC7L-hFlt3L-OX40L, VACVΔE5R, VACV-TK$^-$-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L, VACVΔB2R, VACVE3LΔ83NΔB2R, VACVΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83NΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12-ΔB2R, MYXVΔM31R, MYXVΔM31R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM63R, MYXVΔM64R, MVAΔWR199, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔWR199, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12ΔC11R, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12ΔC11R-hIL-15/IL-15α, VACVΔE5R-IL-15/IL-15Rα, VACVΔE5R-IL-15/IL-15Rα-OX40L, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200-hIL-15/IL-15Rα, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200ΔC11R, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200-hIL-15/IL-15RαΔC11R, MYXVΔM63RΔM64R, MYXVΔM62R, MYXVΔM62RΔM63RΔM64R, MYXVΔM31R, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R, MYXVΔM63RΔM64R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-IL-15/IL-15Rα, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-anti-CTLA-4, e/ou

MYXV∆M62R∆M63R∆M64R∆M31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-IL-15/IL-15Rα-anti-CTLA-4 que pode conter um veículo ou diluente, que pode ser um solvente ou meio de dispersão contendo, por exemplo, água, solução salina, tampão Tris, poliol (por exemplo, glicerol, propilenoglicol e polietilenoglicol líquido e similares), misturas adequadas destes e óleos vegetais Em algumas modalidades, as composições farmacêuticas compreendem um antígeno e MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-OX40L e Heat-iMVA como adjuvantes. A fluidez adequada pode ser mantida, por exemplo, pelo uso de um revestimento como a lecitina, pela manutenção do tamanho de partícula necessário no caso de dispersão e pelo uso de surfactantes. A prevenção da ação de microrganismos pode ser realizada por vários agentes antibacterianos e antifúngicos e conservantes, por exemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal e similares. Em algumas modalidades, agentes isotônicos, por exemplo, açúcares ou cloreto de sódio, e agentes tamponantes estão incluídos. A absorção prolongada das composições injetáveis pode ser conseguida pelo uso nas composições de agentes que retardam a absorção, por exemplo, monoestearato de alumínio e gelatina ou moléculas veículos. Outros excipientes podem incluir agentes molhantes ou emulsionantes. Em geral, excipientes adequados para preparações injetáveis podem ser incluídos como aparente para aqueles versados na técnica.

[0556] Composições e preparações farmacêuticas que compreendem um antígeno e MVAΔE3L-OX40L, MVAΔC7L-OX40L, MVAΔC7L-hFlt3L-OX40L, MVAΔC7LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, VACVΔC7L-OX40L, VACVΔC7L-hFlt3L-OX40L, VACVΔE5R, VACV-TK$^-$-anti-CTLA-4-∆E5R-hFlt3L-OX40L, VACVΔB2R, VACVE3LΔ83NΔB2R, VACVΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83NΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12-ΔB2R, MYXVΔM31R, MYXV∆M31R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM63R,

MYXVΔM64R, MVAΔWR199, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔWR199, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12ΔC11R, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12ΔC11R-hIL-15/IL-15α, VACVΔE5R-IL-15/IL-15Rα, VACVΔE5R-IL-15/IL-15Rα-OX40L, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200-hIL-15/IL-15Rα, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200ΔC11R, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200-hIL-15/IL-15RαΔC11R, MYXVΔM63RΔM64R, MYXVΔM62R, MYXVΔM62RΔM63RΔM64R, MYXVΔM31R, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R, MYXVΔM63RΔM64R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-IL-15/IL-15Rα, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-anti-CTLA-4, e/ou MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-IL-15/IL-15Rα-anti-CTLA-4 pode ser fabricado por meio de processos convencionais de mistura, dissolução, granulação, emulsificação, encapsulação, aprisionamento ou liofilização. As composições farmacêuticas podem ser formuladas de maneira convencional usando um ou mais veículos, diluentes, excipientes ou auxiliares fisiologicamente aceitáveis que facilitam a formulação de preparações de adequadas para uso *in vitro*, *in vivo* ou *ex vivo*. As composições podem ser combinadas com um ou mais agentes biologicamente ativos adicionais (por exemplo, administração paralela de GM-CSF) e podem ser formuladas com um veículo, diluente ou excipiente farmaceuticamente aceitável para gerar composições farmacêuticas (incluindo biológicas) ou veterinárias da presente divulgação adequadas para administração parenteral ou -.

[0557] Muitos tipos de formulação são possíveis como é apreciado por aqueles versados na técnica. O tipo particular escolhido depende da via de administração escolhida, como é bem reconhecido na técnica. Por exemplo, as formulações sistêmicas serão geralmente projetadas para administração por injeção, *por exemplo*, intravenosa, bem como aquelas modificadas para administração intratumoral. Em algumas modalidades, a formulação sistêmica ou intratumoral é estéril.

[0558] As soluções injetáveis estéreis são preparadas por incorporação de uma antígeno e MVAΔE3L-OX40L, MVAΔC7L-OX40L, MVAΔC7L-hFlt3L-OX40L, MVAΔC7LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, VACVΔC7L-OX40L, VACVΔC7L-hFlt3L-OX40L, VACVΔE5R, VACV-TK$^-$-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L, VACVΔB2R, VACVE3LΔ83NΔB2R, VACVΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83NΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12-ΔB2R, MYXVΔM31R, MYXVΔM31R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM63R, MYXVΔM64R, MVAΔWR199, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔWR199, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12ΔC11R, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12ΔC11R-hIL-15/IL-15α, VACVΔE5R-IL-15/IL-15Rα, VACVΔE5R-IL-15/IL-15Rα-OX40L, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200-hIL-15/IL-15Rα, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200ΔC11R, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200-hIL-15/IL-15RαΔC11R, MYXVΔM63RΔM64R, MYXVΔM62R, MYXVΔM62RΔM63RΔM64R, MYXVΔM31R, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R, MYXVΔM63RΔM64R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64R-hFlt3L-OX40L,

MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-IL-15/IL-15Rα, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-anti-CTLA-4, e/ou MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-IL-15/IL-15Rα-anti-CTLA-4 na quantidade necessária do solvente apropriado com vários outros ingredientes enumerados neste documento, conforme necessário, seguido por meios de esterilização adequados. Geralmente, as dispersões são preparadas incorporando os vários ingredientes ativos esterilizados em um veículo estéril que contém o meio de dispersão básico e os outros ingredientes necessários daqueles enumerados acima. No caso de pós estéreis para a preparação de soluções injetáveis estéreis, os métodos de preparação preferenciais são técnicas de secagem a vácuo e de liofilização, que produzem um pó do vírus mais qualquer ingrediente adicional desejado de uma solução previamente esterilizada por filtração.

[0559] Em algumas modalidades, um antígeno e MVAΔE3L-OX40L, MVAΔC7L-OX40L, MVAΔC7L-hFlt3L-OX40L, MVAΔC7LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, VACVΔC7L-OX40L, VACVΔC7L-hFlt3L-OX40L, VACVΔE5R, VACV-TK$^-$-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L, VACVΔB2R, VACVE3LΔ83NΔB2R, VACVΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83NΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12-ΔB2R, MYXVΔM31R, MYXVΔM31R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM63R, MYXVΔM64R, MVAΔWR199, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔWR199, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12ΔC11R, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12ΔC11R-hIL-15/IL-15α, VACVΔE5R-IL-15/IL-15Rα, VACVΔE5R-IL-15/IL-15Rα-OX40L, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-

hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200-hIL-15/IL-15Rα, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200ΔC11R, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200-hIL-15/IL-15RαΔC11R, MYXVΔM63RΔM64R, MYXVΔM62R, MYXVΔM62RΔM63RΔM64R, MYXVΔM31R, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R, MYXVΔM63RΔM64R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-IL-15/IL-15Rα, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-anti-CTLA-4, e/ou MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-IL-15/IL-15Rα-anti-CTLA-4 as composições da presente divulgação podem ser formuladas em soluções aquosas ou em soluções ou tampões fisiologicamente compatíveis, como solução de Hanks, solução de Ringer, soluções de manitol ou tampão salino fisiológico.. Em certas modalidades, qualquer um dos antígenos e composições de Heat-iMVA ou Heat-iMVAΔE5R podem conter agentes formuladores, tais como agentes de suspensão, estabilização, penetração ou dispersão, tampões, lioprotetores ou conservantes, tais como polietilenoglicol, polissorbato 80, 1-dodecilhexa-hidro- 2H-azepin-2-ona (laurocapran), ácido oleico, citrato de sódio, Tris HCl, dextrose, propilenoglicol, manitol, polissorbato polietilenossorbitano monolaurato (Tween®-20), miristato isopropílico, álcool benzílico, álcool isopropílico, etanol sacarose, sacarose e outros geralmente conhecidos na técnica podem ser usados em qualquer uma das composições da presente divulgação.

[0560] Em algumas modalidades, as composições da presente tecnologia podem ser armazenadas a -80°C. Para a preparação de vacinas, *por exemplo*, 10^2-10^8 ou 10^2-10^9 partículas virais podem ser liofilizadas, por exemplo, em 100 mL de solução salina tamponada com fosfato (PBS) na presença de peptona a 2% e 1 % albumina humana em uma ampola, de

preferência uma ampola de vidro. Alternativamente, as preparações injetáveis podem ser produzidas por liofilização em etapas do vírus recombinante em uma formulação. Esta formulação pode conter aditivos adicionais, como manitol, dextrano, açúcar, glicina, lactose ou polivinilpirrolidona ou outros aditivos, como antioxidantes ou gás inerte, estabilizadores ou proteínas recombinantes (*por exemplo*, albumina de soro humano) adequados para administração *in vivo.* A ampola de vidro é então selada e pode ser armazenada entre 4°C e a temperatura ambiente por vários meses. Em algumas modalidades, a ampola é armazenada a temperaturas abaixo de -20 °C.

[0561] Para terapia, o liofilizado pode ser dissolvido em uma solução aquosa, como soro fisiológico ou tampão Tris, e administrado por via sistêmica sistemicamente ou intratumoral. O modo de administração, a dose e o número de administrações podem ser otimizados por aqueles versados na técnica.

[0562] As composições farmacêuticas compreendendo um antígeno e MVAΔE3L-OX40L, MVAΔC7L-OX40L, MVAΔC7L-hFlt3L-OX40L, MVAΔC7LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, VACVΔC7L-OX40L, VACVΔC7L-hFlt3L-OX40L, VACVΔE5R, VACV-TK^{-}-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L, VACVΔB2R, VACVE3LΔ83NΔB2R, VACVΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83NΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12-ΔB2R, MYXVΔM31R, MYXVΔM31R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM63R, MYXVΔM64R, MVAΔWR199, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔWR199, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12ΔC11R, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12ΔC11R-hIL-15/IL-15α, VACVΔE5R-IL-15/IL-15Rα, VACVΔE5R-IL-15/IL-15Rα-OX40L, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-

hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200-hIL-15/IL-15Rα, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200ΔC11R, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200-hIL-15/IL-15RαΔC11R, MYXVΔM63RΔM64R, MYXVΔM62R, MYXVΔM62RΔM63RΔM64R, MYXVΔM31R, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R, MYXVΔM63RΔM64R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-IL-15/IL-15Rα, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-anti-CTLA-4, e/ou MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-IL-15/IL-15Rα-anti-CTLA-4 como um adjuvante de acordo com a presente divulgação pode compreender um adjuvante adicional incluindo sais de alumínio, tais como hidróxido de alumínio ou fosfato de alumínio, Quil A, peptidoglicanos da parede celular bacteriana, partículas semelhantes a vírus, polissacarídeos, receptores similares a toll, nano esferas, etc.

Vacinas

[0563] Em algumas modalidades, a composição compreendendo MVAΔE3L-OX40L, MVAΔC7L-OX40L, MVAΔC7L-hFlt3L-OX40L, MVAΔC7LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, VACVΔC7L-OX40L, VACVΔC7L-hFlt3L-OX40L, VACVΔE5R, VACV-TK$^-$-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L, VACVΔB2R, VACVE3LΔ83NΔB2R, VACVΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83NΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12-ΔB2R, MYXVΔM31R, MYXVΔM31R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM63R, MYXVΔM64R, MVAΔWR199, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔWR199, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12ΔC11R,

MVA∆E3L∆E5R-hFlt3L-mOX40L∆WR199-hIL-12∆C11R-hIL-15/IL-15α, VACVΔE5R-IL-15/IL-15Rα, VACVΔE5R-IL-15/IL-15Rα-OX40L, VACV∆E3L83N-∆TK-anti-huCTLA-4-∆E5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12∆B2R∆WR199ΔWR200, VACV∆E3L83N-∆TK-anti-huCTLA-4-∆E5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12∆B2R∆WR199ΔWR200-hIL-15/IL-15Rα, VACV∆E3L83N-∆TK-anti-huCTLA-4-∆E5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12∆B2R∆WR199∆WR200∆C11R, VACV∆E3L83N-∆TK-anti-huCTLA-4-∆E5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12∆B2R∆WR199∆WR200-hIL-15/IL-15Rα∆C11R, MYXV∆M63R∆M64R, MYXV∆M62R, MYXV∆M62R∆M63R∆M64R, MYXVΔM31R, MYXV∆M62R∆M63R∆M64R∆M31R, MYXV∆M63R∆M64R-hFlt3L-OX40L, MYXV∆M62R∆M63R∆M64R-hFlt3L-OX40L, MYXV∆M62R∆M63R∆M64R∆M31R-hFlt3L-OX40L, MYXV∆M62R∆M63R∆M64R∆M31R-hFlt3L-OX40L-IL-12, MYXV∆M62R∆M63R∆M64R∆M31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-IL-15/IL-15Rα, MYXV∆M62R∆M63R∆M64R∆M31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-anti-CTLA-4, e/ou MYXV∆M62R∆M63R∆M64R∆M31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-IL-15/IL-15Rα-anti-CTLA-4 e/ou adjuvante e/ou Heat-iMVAΔE5R e um ou mais antígenos são formulados na vacina. Em algumas modalidades, as composições compreendem MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-OX40L como um adjuvante. Em algumas modalidades, as composições compreendem MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-OX40L e Heat-iMVA como adjuvantes. Em algumas modalidades, as vacinas são vacinas de células inteiras contendo antígeno tumoral (*por exemplo*, uma vacina de células inteiras irradiada). Em algumas modalidades, as vacinas são administradas a um indivíduo para desencadear uma resposta imunológica contra os antígenos formulados com ela.

Administração ou regime terapêutico de MVAΔE3L-OX40L, MVAΔC7L-OX40L, MVAΔC7L-hFlt3L-OX40L, MVAΔC7LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, VACVΔC7L- OX40L, VACVΔC7L-hFlt3L-OX40L, VACVΔE5R, VACV-TK--anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-

OX40L, VACVΔB2R, VACVE3LΔ83NΔB2R, VACVΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83NΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12-ΔB2R, MYXVΔM31R, MYXVΔM31R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM63R, MYXVΔM64R, MVAΔWR199, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L- ΔWR199, MVA∆E3L∆E5R-hFlt3L-mOX40L∆WR199-hIL-12, MVA∆E3L∆E5R-hFlt3L-mOX40L∆WR199-hIL-12∆C11R, MVA∆E3L∆E5R-hFlt3L-mO1940 12∆C11R-hIL-15/IL-15α, VACVΔE5R-IL-15/IL-15Rα, VACVΔE5R-IL-15/IL-15Rα-OX40L, VACV∆E3L83N-∆TK-anti-huCTLA-4-∆E5R- hFlt3L-hOX40L-hIL-12∆B2R∆WR199ΔWR200, VACV∆E3L83N-∆TK-anti-huCTLA-4-∆E5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12∆B2R∆WR199ΔWR200-hIL-15/15/IL E3L83N-∆TK-anti-huCTLA-4-∆E5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12∆B2R∆WR199∆WR200∆C11R, VACV∆E3L83N-∆TK- anti-huCTLA-4-∆E5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12∆B2R∆WR199∆WR200-hIL-15/IL-15Rα∆C11R, MYXV∆M63R∆M64R, MYXV∆M62R, MYXV∆M62R∆M63R∆M64R, MYXVΔM31R, MYXV∆M62R∆M63R∆M64R∆M31R, MYXV∆M63R∆M64R-hFlt3L-OX40L, MYXV∆M62R∆M63R∆M64R-hFlt3L-OX40L, MYXV∆M62R∆M63R∆M64 ∆M62R∆M63R∆M64R∆M31R-hFlt3L-OX40L-IL-12, MYXV∆M62R∆M63R∆M64R∆M31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-IL-15/IL-15Rα, MYXV∆M62R∆M63R∆M64R ∆M31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-anti-CTLA-4 e MYXV∆M62R∆M63R∆M64R∆M31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-IL-15/IL-15Rα-anti-CTLA-4 e/ou Heat-40L como um adjuvante imunológico de vacina contra câncer.

[0564] Em geral, o indivíduo recebe uma dosagem deMVAΔE3L-OX40L, MVAΔC7L-OX40L, MVAΔC7L-hFlt3L-OX40L, MVAΔC7LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, VACVΔC7L-OX40L, VACVΔC7L-hFlt3L-OX40L, VACVΔE5R, VACV-TK$^-$-anti-CTLA-4-∆E5R-hFlt3L-OX40L, VACVΔB2R, VACVE3LΔ83NΔB2R, VACVΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83NΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-

OX40L-IL-12, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12-ΔB2R, MYXVΔM31R, MYXVΔM31R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM63R, MYXVΔM64R, MVAΔWR199, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔWR199, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12ΔC11R, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12ΔC11R-hIL-15/IL-15α, VACVΔE5R-IL-15/IL-15Rα, VACVΔE5R-IL-15/IL-15Rα-OX40L, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200-hIL-15/IL-15Rα, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200ΔC11R, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200-hIL-15/IL-15RαΔC11R, MYXVΔM63RΔM64R, MYXVΔM62R, MYXVΔM62RΔM63RΔM64R, MYXVΔM31R, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R, MYXVΔM63RΔM64R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-IL-15/IL-15Rα, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-anti-CTLA-4, e/ou MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-IL-15/IL-15Rα-anti-CTLA-4 na faixa de cerca de 10^6 a cerca de 10^{10} unidades formadoras de placas (pfu), embora uma dose mais baixa ou mais alta possa ser administrada. Em algumas modalidades, a dosagem varia de cerca de 10^2 a cerca de 10^{10} pfu. Em algumas modalidades, a dosagem varia de cerca de 10^3 a cerca de 10^{10} pfu. Em algumas modalidades, a dosagem varia de cerca de 10^4 a cerca de 10^{10} pfu. Em algumas modalidades, a dosagem varia de cerca de 10^5 a cerca de 10^{10} pfu. Em algumas modalidades, a dosagem varia de cerca de 10^6 a cerca de 10^{10} pfu. Em algumas modalidades, a dosagem varia de cerca de 10^7 a cerca de 10^{10} pfu. Em algumas modalidades, a dosagem varia de cerca de 10^8 a cerca de 10^{10} pfu. Em algumas modalidades, a

dosagem varia de cerca de 10^9 a cerca de 10^{10} pfu. Em algumas modalidades, a dosagem varia de cerca de 10^7 a cerca de 10^9 pfu. A equivalência de pfu para partículas de vírus pode diferir de acordo com o método de titulação de pfu específico usado. Geralmente, um pfu é igual a cerca de 5 a 100 partículas de vírus e 0,69 pfu é cerca de 1 TCID50. Uma quantidade terapeuticamente eficaz de MVAΔE3L-OX40L, MVAΔC7L-OX40L, MVAΔC7L-hFlt3L-OX40L, MVAΔC7LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, VACVΔC7L-OX40L, VACVΔC7L-hFlt3L-OX40L, VACVΔE5R, VACV-TK--anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L, VACVΔB2R, VACVE3LΔ83NΔB2R, VACVΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83NΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L- OX40L-IL-12, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12-ΔB2R, MYXVΔM31R, MYXVΔM31R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM63R, MYXVΔM64R, MVAΔWR199, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L- ΔWR199, MVA∆E3L∆E5R-hFlt3L-mOX40L∆WR199-hIL-12, MVA∆E3L∆E5R-hFlt3L-mOX40L∆WR199-hIL-12∆C11R, MVA∆E3L∆E5R-hFlt3L-mO1940 12∆C11R-hIL-15/IL-15α, VACVΔE5R-IL-15/IL-15Rα, VACVΔE5R-IL-15/IL-15Rα-OX40L, VACV∆E3L83N-∆TK-anti-huCTLA-4-∆E5R- hFlt3L-hOX40L-hIL-12∆B2R∆WR199ΔWR200, VACV∆E3L83N-∆TK-anti-huCTLA-4-∆E5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12∆B2R∆WR199ΔWR200-hIL-15/15/IL E3L83N-∆TK-anti-huCTLA-4-∆E5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12∆B2R∆WR199∆WR200∆C11R, VACV∆E3L83N-∆TK- anti-huCTLA-4-∆E5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12∆B2R∆WR199∆WR200-hIL-15/IL-15Rα∆C11R, MYXV∆M63R∆M64R, MYXV∆M62R, MYXV∆M62R∆M63R∆M64R, MYXVΔM31R, MYXV∆M62R∆M63R∆M64R∆M31R, MYXV∆M63R∆M64R-hFlt3L-OX40L, MYXV∆M62R∆M63R∆M64R-hFlt3L-OX40L, MYXV∆M62R∆M63R∆M64 ∆M62R∆M63R∆M64R∆M31R-hFlt3L-OX40L-IL-12, MYXV∆M62R∆M63R∆M64R∆M31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-IL-15/IL-15Rα, MYXV∆M62R∆M63R∆M64R ∆M31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-anti-CTLA-4 e MYXV∆M62R∆M63R∆M64R∆M31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-IL-15/IL-15Rα-anti-

CTLA-4 pode ser administrada em um oi mais doses divididas por um período de tempo prescrito e com uma frequência de administração prescrita.

[0565] Por exemplo, como é evidente para os versados na técnica, uma quantidade terapeuticamente eficaz de MVAΔE3L-OX40L, MVAΔC7L-OX40L, MVAΔC7L-hFlt3L-OX40L, MVAΔC7LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, VACVΔC7L-OX40L, VACVΔC7L-hFlt3L-OX40L, VACVΔE5R, VACV-TK$^-$-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L, VACVΔB2R, VACVE3LΔ83NΔB2R, VACVΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83NΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12-ΔB2R, MYXVΔM31R, MYXVΔM31R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM63R, MYXVΔM64R, MVAΔWR199, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔWR199, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12ΔC11R, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12ΔC11R-hIL-15/IL-15α, VACVΔE5R-IL-15/IL-15Rα, VACVΔE5R-IL-15/IL-15Rα-OX40L, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200-hIL-15/IL-15Rα, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200ΔC11R, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200-hIL-15/IL-15RαΔC11R, MYXVΔM63RΔM64R, MYXVΔM62R, MYXVΔM62RΔM63RΔM64R, MYXVΔM31R, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R, MYXVΔM63RΔM64R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-IL-15/IL-15Rα, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-anti-CTLA-4, e/ou MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-IL-15/IL-15Rα-anti-

CTLA-4, e/ou Heat-iMVAΔE5R como um adjuvante de acordo com a presente divulgação pode variar de acordo com fatores como o estado da doença, idade, sexo, peso e condição geral do indivíduo a capacidade de MVAΔE3L-OX40L, MVAΔC7L-OX40L, MVAΔC7L-hFlt3L-OX40L, MVAΔC7LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, VACVΔC7L-OX40L, VACVΔC7L-hFlt3L-OX40L, VACVΔE5R, VACV-TK$^-$-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L, VACVΔB2R, VACVE3LΔ83NΔB2R, VACVΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83NΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12-ΔB2R, MYXVΔM31R, MYXVΔM31R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM63R, MYXVΔM64R, MVAΔWR199, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔWR199, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12ΔC11R, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12ΔC11R-hIL-15/IL-15α, VACVΔE5R-IL-15/IL-15Rα, VACVΔE5R-IL-15/IL-15Rα-OX40L, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200-hIL-15/IL-15Rα, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200ΔC11R, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200-hIL-15/IL-15RαΔC11R, MYXVΔM63RΔM64R, MYXVΔM62R, MYXVΔM62RΔM63RΔM64R, MYXVΔM31R, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R, MYXVΔM63RΔM64R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-IL-15/IL-15Rα, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-anti-CTLA-4, e/ou MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-IL-15/IL-15Rα-anti-CTLA-4, e/ou Heat-iMVAΔE5R para eliciar uma resposta imunológica desejada

no indivíduo específico (a resposta do indivíduo à terapia). Ao administrar MVAΔE3L-OX40L, MVAΔC7L-OX40L, MVAΔC7L-hFlt3L-OX40L, MVAΔC7LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, VACVΔC7L-OX40L, VACVΔC7L-hFlt3L-OX40L, VACVΔE5R, VACV-TK^{-}-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L, VACVΔB2R, VACVE3LΔ83NΔB2R, VACVΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83NΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12-ΔB2R, MYXVΔM31R, MYXVΔM31R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM63R, MYXVΔM64R, MVAΔWR199, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔWR199, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12ΔC11R, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12ΔC11R-hIL-15/IL-15α, VACVΔE5R-IL-15/IL-15Rα, VACVΔE5R-IL-15/IL-15Rα-OX40L, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200-hIL-15/IL-15Rα, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200ΔC11R, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200-hIL-15/IL-15RαΔC11R, MYXVΔM63RΔM64R, MYXVΔM62R, MYXVΔM62RΔM63RΔM64R, MYXVΔM31R, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R, MYXVΔM63RΔM64R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-IL-15/IL-15Rα, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-anti-CTLA-4, e/ou MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-IL-15/IL-15Rα-anti-CTLA-4 para um indivíduo, a dosagem também irá variar dependendo de fatores como a condição médica geral, história médica anterior, tipo e

progressão da doença, carga do tumor, a presença ou ausência de infiltração de células imunológicas no tumor e similares.

[0566] Em algumas modalidades, pode ser vantajoso formular composições da presente divulgação na forma de unidade de dosagem para facilidade de administração e uniformidade de dosagem. "Forma de unidade de dosagem, conforme usado neste documento" refere-se a unidades fisicamente discretas adequadas como dosagens unitárias para os indivíduos mamíferos a serem tratados; cada unidade contendo uma quantidade predeterminada de material ativo calculada para produzir o efeito terapêutico desejado em associação com o veículo farmaceuticamente ou veterinário aceitável necessário.

Administração ou regime terapêutico de MVAΔE3L-OX40L, MVAΔC7L-OX40L, MVAΔC7L-hFlt3L-OX40L, MVAΔC7LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, VACVΔC7L- OX40L, VACVΔC7L-hFlt3L-OX40L, VACVΔE5R, VACV-TK--anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L, VACVΔB2R, VACVE3LΔ83NΔB2R, VACVΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83NΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12-ΔB2R, MYXVΔM31R, MYXVΔM31R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM63R, MYXVΔM64R, MVAΔWR199, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L- ΔWR199, MVA∆E3L∆E5R-hFlt3L-mOX40L∆WR199-hIL-12, MVA∆E3L∆E5R-hFlt3L-mOX40L∆WR199-hIL-12∆C11R, MVA∆E3L∆E5R-hFlt3L-mO1940 12∆C11R-hIL-15/IL-15α, VACVΔE5R-IL-15/IL-15Rα, VACVΔE5R-IL-15/IL-15Rα-OX40L, VACV∆E3L83N-∆TK-anti-huCTLA-4-∆E5R- hFlt3L-hOX40L-hIL-12∆B2R∆WR199ΔWR200, VACV∆E3L83N-∆TK-anti-huCTLA-4-∆E5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12∆B2R∆WR199ΔWR200-hIL-15/15/IL E3L83N-∆TK-anti-huCTLA-4-∆E5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12∆B2R∆WR199∆WR200∆C11R, VACV∆E3L83N-∆TK- anti-huCTLA-4-∆E5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12∆B2R∆WR199∆WR200-hIL-15/IL-15Rα∆C11R, MYXV∆M63R∆M64R, MYXV∆M62R,

MYXV∆M62R∆M63R∆M64R, MYXVΔM31R, MYXV∆M62R∆M63R∆M64R∆M31R, MYXV∆M63R∆M64R-hFlt3L-OX40L, MYXV∆M62R∆M63R∆M64R-hFlt3L-OX40L, MYXV∆M62R∆M63R∆M64 ∆M62R∆M63R∆M64R∆M31R-hFlt3L-OX40L-IL-12, MYXV∆M62R∆M63R∆M64R∆M31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-IL-15/IL-15Rα, MYXV∆M62R∆M63R∆M64R ∆M31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-anti-CTLA-4 e MYXV∆M62R∆M63R∆M64R∆M31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-IL-15/IL-15Rα-anti-CTLA-4 e/ou Heat-iMVAΔE5R 40L como um adjuvante imunológico de vacina contra câncer.

[0567] As composições farmacêuticas são tipicamente formuladas para serem compatíveis com a via de administração pretendida. A administração de MVAΔE3L-OX40L, MVAΔC7L-OX40L, MVAΔC7L-hFlt3L-OX40L, MVAΔC7LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, VACVΔC7L-OX40L, VACVΔC7L-hFlt3L-OX40L, VACVΔE5R, VACV-TK$^-$-anti-CTLA-4-∆E5R-hFlt3L-OX40L, VACVΔB2R, VACVE3LΔ83NΔB2R, VACVΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83NΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12-ΔB2R, MYXVΔM31R, MYXV∆M31R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM63R, MYXVΔM64R, MVAΔWR199, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔWR199, MVA∆E3L∆E5R-hFlt3L-mOX40L∆WR199-hIL-12, MVA∆E3L∆E5R-hFlt3L-mOX40L∆WR199-hIL-12∆C11R, MVA∆E3L∆E5R-hFlt3L-mOX40L∆WR199-hIL-12∆C11R-hIL-15/IL-15α, VACVΔE5R-IL-15/IL-15Rα, VACVΔE5R-IL-15/IL-15Rα-OX40L, VACV∆E3L83N-∆TK-anti-huCTLA-4-∆E5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12∆B2R∆WR199ΔWR200, VACV∆E3L83N-∆TK-anti-huCTLA-4-∆E5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12∆B2R∆WR199ΔWR200-hIL-15/IL-15Rα, VACV∆E3L83N-∆TK-anti-huCTLA-4-∆E5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12∆B2R∆WR199ΔWR200∆C11R, VACV∆E3L83N-∆TK-anti-huCTLA-4-∆E5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12∆B2R∆WR199ΔWR200-hIL-15/IL-15Rα∆C11R, MYXV∆M63R∆M64R,

MYXVΔM62R, MYXVΔM62RΔM63RΔM64R, MYXVΔM31R, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R, MYXVΔM63RΔM64R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-IL-15/IL-15Rα, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-anti-CTLA-4, e/ou MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-IL-15/IL-15Rα-anti-CTLA-4, e/ou Heat-iMVAΔE5R como um adjuvante em uma composição imunogênica (*por exemplo*, vacina) pode ser alcançado usando mais de uma via. Exemplos de vias de administração incluem, mas não estão limitados a parenteral (*por exemplo*, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, intradérmica, subcutânea), intratumoral, intratecal, intranasal, sistêmica, transdérmica, iontoforética, intradérmica, intraocular ou administração tópica. Em algumas modalidades, MVAΔE3L-OX40L, MVAΔC7L-OX40L, MVAΔC7L-hFlt3L-OX40L, MVAΔC7LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, VACVΔC7L- OX40L, VACVΔC7L-hFlt3L-OX40L, VACVΔE5R, VACV-TK--anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L, VACVΔB2R, VACVE3LΔ83NΔB2R, VACVΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83NΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12-ΔB2R, MYXVΔM31R, MYXVΔM31R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM63R, MYXVΔM64R, MVAΔWR199, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L- ΔWR199, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12ΔC11R, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mO1940 12ΔC11R-hIL-15/IL-15α, VACVΔE5R-IL-15/IL-15Rα, VACVΔE5R-IL-15/IL-15Rα-OX40L, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R- hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200-hIL-15/15/IL E3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-

4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200ΔC11R, VACVΔE3L83N-ΔTK- anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200-hIL-15/IL-15RαΔC11R, MYXVΔM63RΔM64R, MYXVΔM62R, MYXVΔM62RΔM63RΔM64R, MYXVΔM31R, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R, MYXVΔM63RΔM64R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64 ΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-IL-15/IL-15Rα, MYXVΔM62RΔM63RΔM64R ΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-anti-CTLA-4 e MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-IL-15/IL-15Rα-anti-CTLA-4 e/ou Heat-iMVAΔE5R como um adjuvante é administrado diretamente no tumor, por exemplo, por injeção intratumoral, em que uma reação local direta é desejada. Em algumas modalidades, MVAΔE3L-OX40L, MVAΔC7L-OX40L, MVAΔC7L-hFlt3L-OX40L, MVAΔC7LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, VACVΔC7L- OX40L, VACVΔC7L-hFlt3L-OX40L, VACVΔE5R, VACV-TK--anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L, VACVΔB2R, VACVE3LΔ83NΔB2R, VACVΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83NΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12-ΔB2R, MYXVΔM31R, MYXVΔM31R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM63R, MYXVΔM64R, MVAΔWR199, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L- ΔWR199, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12ΔC11R, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mO1940 12ΔC11R-hIL-15/IL-15α, VACVΔE5R-IL-15/IL-15Rα, VACVΔE5R-IL-15/IL-15Rα-OX40L, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R- hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200-hIL-15/15/IL E3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200ΔC11R, VACVΔE3L83N-ΔTK- anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200-hIL-

15/IL-15RαΔC11R, MYXVΔM63RΔM64R, MYXVΔM62R, MYXVΔM62RΔM63RΔM64R, MYXVΔM31R, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R, MYXVΔM63RΔM64R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64 ΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-IL-15/IL-15Rα, MYXVΔM62RΔM63RΔM64R ΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-anti-CTLA-4 e MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-IL-15/IL-15Rα-anti-CTLA-4 e/ou Heat-iMVAΔE5R como um adjuvante é é administrado perifericamente em relação aos leitos tumorais. Além disso, as vias de administração podem variar, *por exemplo*, a primeira administração usando uma injeção intratumoral e a administração subsequente *por meio de* uma injeção intravenosa ou qualquer combinação das mesmas. Uma quantidade terapeuticamente eficaz de MVAΔE3L-OX40L, MVAΔC7L-OX40L, MVAΔC7L-hFlt3L-OX40L, MVAΔC7LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, VACVΔC7L- OX40L, VACVΔC7L-hFlt3L-OX40L, VACVΔE5R, VACV-TK--anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L, VACVΔB2R, VACVE3LΔ83NΔB2R, VACVΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83NΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12-ΔB2R, MYXVΔM31R, MYXVΔM31R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM63R, MYXVΔM64R, MVAΔWR199, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L- ΔWR199, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12ΔC11R, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mO1940 12ΔC11R-hIL-15/IL-15α, VACVΔE5R-IL-15/IL-15Rα, VACVΔE5R-IL-15/IL-15Rα-OX40L, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R- hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200-hIL-15/15/IL E3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200ΔC11R, VACVΔE3L83N-

ΔTK- anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200-hIL-15/IL-15RαΔC11R, MYXVΔM63RΔM64R, MYXVΔM62R, MYXVΔM62RΔM63RΔM64R, MYXVΔM31R, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R, MYXVΔM63RΔM64R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64 ΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-IL-15/IL-15Rα, MYXVΔM62RΔM63RΔM64R ΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-anti-CTLA-4 e MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-IL-15/IL-15Rα-anti-CTLA-4 e/ou Heat-iMVAΔE5R como um adjuvante em uma injeção de vacina contra o câncer pode ser administrado por um período de tempo prescrito e em uma frequência de administração prescrita. Em certas modalidades, as composições farmacêuticas da presente tecnologia podem ser usadas em conjunto com outros tratamentos terapêuticos, como quimioterapia ou radiação. Em algumas modalidades, as composições farmacêuticas da presente tecnologia compreendendo uma quantidade terapeuticamente eficaz de MVAΔE3L-OX40L, MVAΔC7L-OX40L, MVAΔC7L-hFlt3L-OX40L, MVAΔC7LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, VACVΔC7L- OX40L, VACVΔC7L-hFlt3L-OX40L, VACVΔE5R, VACV-TK--anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L, VACVΔB2R, VACVE3LΔ83NΔB2R, VACVΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83NΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L- OX40L-IL-12, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12-ΔB2R, MYXVΔM31R, MYXVΔM31R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM63R, MYXVΔM64R, MVAΔWR199, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L- ΔWR199, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12ΔC11R, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mO1940 12ΔC11R-hIL-15/IL-15α, VACVΔE5R-IL-15/IL-15Rα, VACVΔE5R-IL-15/IL-15Rα-OX40L, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R- hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200, VACVΔE3L83N-ΔTK-

anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200-hIL-15/15/IL E3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200ΔC11R, VACVΔE3L83N-ΔTK- anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200-hIL-15/IL-15RαΔC11R, MYXVΔM63RΔM64R, MYXVΔM62R, MYXVΔM62RΔM63RΔM64R, MYXVΔM31R, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R, MYXVΔM63RΔM64R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64 ΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-IL-15/IL-15Rα, MYXVΔM62RΔM63RΔM64R ΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-anti-CTLA-4 e MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-IL-15/IL-15Rα-anti-CTLA-4 e/ou Heat-iMVAΔE5R como um adjuvante pode ser usado em conjunto com a terapia de bloqueio de ponto de verificação imunológico.

[0568] Em certas modalidades, a composição farmacêutica que compreende um antígeno eMVAΔE3L-OX40L, MVAΔC7L-OX40L, MVAΔC7L-hFlt3L-OX40L, MVAΔC7LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, VACVΔC7L-OX40L, VACVΔC7L-hFlt3L-OX40L, VACVΔE5R, VACV-TK$^-$-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L, VACVΔB2R, VACVE3LΔ83NΔB2R, VACVΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83NΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12-ΔB2R, MYXVΔM31R, MYXVΔM31R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM63R, MYXVΔM64R, MVAΔWR199, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔWR199, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12ΔC11R, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12ΔC11R-hIL-15/IL-15α, VACVΔE5R-IL-15/IL-15Rα, VACVΔE5R-IL-15/IL-15Rα-OX40L, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200-hIL-15/IL-15Rα, VACVΔE3L83N-ΔTK-

anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200ΔC11R, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200-hIL-15/IL-15RαΔC11R, MYXVΔM63RΔM64R, MYXVΔM62R, MYXVΔM62RΔM63RΔM64R, MYXVΔM31R, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R, MYXVΔM63RΔM64R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-IL-15/IL-15Rα, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-anti-CTLA-4, e/ou MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-IL-15/IL-15Rα-anti-CTLA-4, e/ou Heat-iMVAΔE5R como adjuvante, é administrado pelo menos uma vez por semana ou mensalmente, mas pode ser administrado com mais frequência se necessário, como duas vezes por semana durante várias semanas, meses, anos ou mesmo indefinidamente enquanto os benefícios persistirem. Administrações mais frequentes são contempladas se toleradas e se resultarem em benefícios sustentados ou aumentados. Os benefícios dos presentes métodos incluem, mas não estão limitados aos seguintes: redução do número de células de cancêr, redução do tamanho do tumor (*por exemplo*, volume do tumor), erradicação do tumor, inibição da infiltração de células de cancêr em órgãos periféricos, inibição ou estabilização ou erradicação do crescimento metastático, inibição ou estabilização do crescimento do tumor e estabilização ou melhoria da qualidade de vida. Além disso, os benefícios podem incluir a indução de uma resposta imunológica contra o tumor, aumento de células IFN-γ^+CD8^+ T, aumento de células IFN-γ^+CD4^+ T, ativação de células $CD4^+$ T efetoras, aumento de células $CD8^+$ T efetoras, ou redução de células $CD4^+$ reguladoras. Por exemplo, no contexto do melanoma, um benefício pode ser a ausência de recorrências ou metástases em um, dois, três, quatro, cinco ou mais anos após o diagnóstico inicial de melanoma.

Avaliações similares podem ser feitas para câncer de cólon e outros tumores sólidos.

B. Métodos

[0569] Em um aspecto, a presente divulgação fornece um método para o tratamento de tumor sólido aumentando uma resposta imunológica em um indivíduo em necessidade, o método compreendendo a administração ao sujeito de uma composição imunogênica compreendendo um ou mais antígenos e um adjuvante compreendendo MVAΔE3L-OX40L, MVAΔC7L-OX40L, MVAΔC7L-hFlt3L-OX40L, MVAΔC7LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, VACVΔC7L-OX40L, VACVΔC7L-hFlt3L-OX40L, VACVΔE5R, VACV-TK$^-$-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L, VACVΔB2R, VACVE3LΔ83NΔB2R, VACVΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83NΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12-ΔB2R, MYXVΔM31R, MYXVΔM31R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM63R, MYXVΔM64R, MVAΔWR199, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔWR199, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12ΔC11R, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12ΔC11R-hIL-15/IL-15α, VACVΔE5R-IL-15/IL-15Rα, VACVΔE5R-IL-15/IL-15Rα-OX40L, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200-hIL-15/IL-15Rα, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200ΔC11R, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200-hIL-15/IL-15RαΔC11R, MYXVΔM63RΔM64R, MYXVΔM62R, MYXVΔM62RΔM63RΔM64R, MYXVΔM31R, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R, MYXVΔM63RΔM64R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L,

MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-IL-15/IL-15Rα, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-anti-CTLA-4, e/ou MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-IL-15/IL-15Rα-anti-CTLA-4, e/ou Heat-iMVAΔE5R, tratando assim o tumor, aumentando a resposta imunológica. Em algumas modalidades, o adjuvante compreende MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-OX40L. Em algumas modalidades, o adjuvante compreende MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-OX40L e Heat-iMVA.

[0570] Em algumas modalidades, a divulgação fornece métodos que compreendem a administração da composição imunogênica compreendendo um ou mais antígenos e MVAΔE3L-OX40L, MVAΔC7L-OX40L, MVAΔC7L-hFlt3L-OX40L, MVAΔC7LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, VACVΔC7L-OX40L, VACVΔC7L-hFlt3L-OX40L, VACVΔE5R, VACV-TK$^-$-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L, VACVΔB2R, VACVE3LΔ83NΔB2R, VACVΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83NΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12-ΔB2R, MYXVΔM31R, MYXVΔM31R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM63R, MYXVΔM64R, MVAΔWR199, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔWR199, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12ΔC11R, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12ΔC11R-hIL-15/IL-15α, VACVΔE5R-IL-15/IL-15Rα, VACVΔE5R-IL-15/IL-15Rα-OX40L, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200-hIL-15/IL-15Rα, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200ΔC11R, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200-hIL-15/IL-15RαΔC11R, MYXVΔM63RΔM64R, MYXVΔM62R, MYXVΔM62RΔM63RΔM64R, MYXVΔM31R,

MYXV∆M62R∆M63R∆M64R∆M31R, MYXV∆M63R∆M64R-hFlt3L-OX40L, MYXV∆M62R∆M63R∆M64R-hFlt3L-OX40L, MYXV∆M62R∆M63R∆M64R∆M31R-hFlt3L-OX40L, MYXV∆M62R∆M63R∆M64R∆M31R-hFlt3L-OX40L-IL-12, MYXV∆M62R∆M63R∆M64R∆M31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-IL-15/IL-15Rα, MYXV∆M62R∆M63R∆M64R∆M31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-anti-CTLA-4, e/ou MYXV∆M62R∆M63R∆M64R∆M31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-IL-15/IL-15Rα-anti-CTLA-4, e/ou Heat-iMVAΔE5R como um adjuvante para um indivíduo a fim de induzir uma resposta imunológica contra os antígenos.

[0571] Em algumas modalidades dos métodos divulgados neste documento, a etapa de administração compreende a administração da composição imunogênica em doses múltiplas.

[0572] Em algumas modalidades o método compreende ainda administrar ao indivíduo um agente de bloqueio de ponto de verificação imunológico selecionados a partir do grupo que consiste em anticorpo anti-PD-1, anticorpo anti-PD-L1, anticorpo anti-CTLA-4, ipilimumabe, nivolumabe, pidilizumabe, lambrolizumabe, pembrolizumabe, atezolizumabe, avelumabe, durvalumabe, MPDL3280A, BMS-936559, MEDI-4736, MSB 00107180, LAG-3, TIM3, B7-H3, B7-H4, TIGIT, AMP-224, MDX-1105, arelumabe, tremelimumabe, IMP321, MGA271, BMS-986016, lirilumabe, urelumabe, PF-05082566, IPH2101, MEDI-6469, CP-870.893, mogamulizumabe, varlilumabe, galiximabe, AMP-514, AUNP 12, Indoximode, NLG-919, INCB024360, CD80, DLBCL ICOS, PDR001 e qualquer combinação dos mesmos; e/ou Em algumas modalidades a composição imunogênica é administrada ao indivíduo separadamente, sequencialmente ou simultaneamente com a administração do agente de bloqueio do ponto de verificação imunológico.

C. Kits

[0573] Em algumas modalidades, kits são fornecidos. Em algumas modalidades, o kit inclui um recipiente e uma porção separada de cada um dentre: (a) um antígeno e (b) um adjuvante compreendendo MVAΔE3L-OX40L,

MVAΔC7L-OX40L, MVAΔC7L-hFlt3L-OX40L, MVAΔC7LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, VACVΔC7L-OX40L, VACVΔC7L-hFlt3L-OX40L, VACVΔE5R, VACV-TK$^-$-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L, VACVΔB2R, VACVE3LΔ83NΔB2R, VACVΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83NΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12-ΔB2R, MYXVΔM31R, MYXVΔM31R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM63R, MYXVΔM64R, MVAΔWR199, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔWR199, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12ΔC11R, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12ΔC11R-hIL-15/IL-15α, VACVΔE5R-IL-15/IL-15Rα, VACVΔE5R-IL-15/IL-15Rα-OX40L, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200-hIL-15/IL-15Rα, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200ΔC11R, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200-hIL-15/IL-15RαΔC11R, MYXVΔM63RΔM64R, MYXVΔM62R, MYXVΔM62RΔM63RΔM64R, MYXVΔM31R, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R, MYXVΔM63RΔM64R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-IL-15/IL-15Rα, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-anti-CTLA-4, e/ou MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-IL-15/IL-15Rα-anti-CTLA-4, e/ou Heat-iMVAΔE5R. Em algumas modalidades, o adjuvante compreende MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-OX40L. Em algumas modalidades, o adjuvante compreende MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-OX40L e Heat-iMVA.

EXEMPLOS EXPERIMENTAIS

[0574] A presente tecnologia é ainda ilustrada pelos exemplos a seguir, que não devem ser interpretados como limitativos de qualquer forma.

Materiais e métodos gerais

[0575] *Vírus e linhas de células.* O vírus MVA foi gentilmente fornecido por Gerd Sutter (Universidade de Munique) e propagado em células BHK-21 (célula de rim de hamster bebê, ATCC CCL-10). O MVA está disponível comercialmente e/ou publicamente. O vírus MVA∆E3L foi gentilmente cedido por Gerd Sutter (Universidade de Munique) e propagado em células BHK-21. O método de geração de vírus MVA∆E3L foi descrito (*Hornemann et al., 2003*). Os vírus foram purificados por meio de de uma tecido de sacarose a 36%. O Heat-iMVA é gerado incubando o vírus MVA purificado a 55˚C durante 1 hora. Os BHK-21 foram cultivados em *Eagle's Minimal Essential Medium (Eagle's MEM*, pode ser adquirido na Life Technologies, Cat # 11095-080) contendo FBS a 10%, de aminoácidos não essenciais a 0,1 mM (NEAA) e gentamicina a 50 mg/mL. A linha de células de melanoma murino B16-F10 foi originalmente obtida de I. Fidler (MD Anderson Cancer Center). As células B16-F10 foram mantidas em meio RPMI 1640 suplementado com FBS a 10%, de penicilina a 100 Unidades/mL, estreptomicina a 100 µg/mL, NEAA 0,1 mM, L-glutamina 2 mM, piruvato de sódio 1 mM e tampão HEPES 10 mM. Todas as células foram cultivadas a 37˚C numa incubadora de CO_2 a 5%. As células de melanoma humano SK-MEL-28 foram cultivadas em meio RPMI 1640 completo. Para cultura de células dendríticas derivadas de monócitos humanos, RPMI 1640 completo foi suplementado com 10 mM de Hepes, 1% de penicilina/estreptomicina (Media Lab, MSKCC, New York, NY), 50 µM de 2-ME (GibcoBRL Life Technologies, Carlsbad, CA), 1% de L-glutamina (GibcoBRL) e soro humano normal inativado pelo calor (1% ou 10%, v/v conforme especificado para um experimento particular; Gemini Bio-Products, West Sacramento, CA). Citocinas humanas estéreis, recombinantes, endotoxinas, pirogênicas, micoplasma e veículos

foram utilizadas para gerar moDCs de sangue imaturos e maduros. Todos os meios e reagentes eram isentos de endotoxinas. Todas as células foram cultivadas a 37°C em uma incubadora de 5% de CO2.

[0576] *Camundongos.* Camundongos C57BL/6J fêmeas entre 6 e 10 semanas de idade foram adquiridos no Jackson Laboratory e foram usados para experimentos *in vivo.* Esses camundongos foram mantidos na instalação de animais no Sloan Kettering Institute. Todos os procedimentos foram realizados em estrita conformidade com as recomendações do Guia para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório do National Institute of Health. O protocolo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Sloan-Kettering Cancer Institute.

[0577] *Geração de vírus MVA∆E3L-TK(-)-mOX40L recombinante*. As células BHK21 foram passadas para uma placa de 6 cavidades. No dia seguinte, as células foram infectadas com MVA∆E3L na multiplicidade de infecção (MOI) de 0,5. Após 1-2h, as células foram transfectadas com 0,75 µg de construto pCB-mOX40L-gpt com 2 µL de lipofectamina 2000. Após 2 dias, as células foram coletadas e congeladas/descongeladas três vezes. Para selecionar MVA∆E3L-mOX40L puro, os vírus recombinantes foram selecionados por meio de cultura adicional em meio de seleção gpt incluindo MPA, xantina e hipoxantina, e purificados em placa após 4-6 rodadas de seleção. A análise de PCR foi realizada para verificar se MVA∆E3L-TK(-)-mOX40L carece de parte do gene TK e com inserção de mOX40L.

[0578] *Verificação por PCR do vírus recombinante MVA∆E3L-mOX40L.* As reações de PCR foram utilizadas para verificar a pureza do vírus recombinante MVA∆E3L-TK(-)mOX40L. As sequências de iniciadores utilizadas para as reações de PCR são: TK-F4. 5’-TTGTCATCATGAACGGCGGA-3’ (SEQ ID NO: 11), TK-R4: 5’-TCCTTCGTTTGCCATACGCT-3’ (SEQ ID NO: 12), OX40L-F: 5’-CGTTGTAAGCGGCATCAAGG-3’ (SEQ ID NO: 13), OX40L-R: 5’-AAGGCCAGTGAAGCGACTAC-3’ (SEQ ID NO: 14).

[0579] *Análise FACS da expressão de mOX40L e hFlt3L.* Células de melanoma murino B16-F10 ($1x10^6$) ou células SK-MEL-28 foram infectadas com MVAΔE3L, MVAΔE3L-TK(-)-mOX40L, MVAΔC7L, MVAΔC7L-hFlt3L, ou MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L a um MOI de 10. As células foram coletadas 24h após a infecção e coradas com OX40L anti-murino conjugado com PE ou anticorpo anti-hFlt3L antes da análise de FACS.

[0580] *Implantação de tumor e injeção intratumoral com vírus para avaliação de linfócitos infiltrantes de tumor por análise de citometria de fluxo.* Um modelo de implantação de tumor bilateral foi usado nesta tecnologia. As células de melanoma B16-F10 foram implantadas por via intradermica na pele raspada nos flancos direito ($5x10^5$ células) e esquerdo ($2,5x10^5$ células) de um camundongo C57BL/6J. Após 7 dias pós implantação, os tumores maiores no flanco direito (cerca de 3 mm ou maior de diâmetro) foram injetados duas vezes por semana com vírus recombinantes ou PBS quando os camundongos estavam sob anestesia. Dois ou três dias após a segunda injeção, os tumores foram coletados e pesados. Eles foram então picados antes da incubação com Liberase (1,67 Wünsch U/ml) e DNase (0,2 mg/ml) em meio RPMI sem soro por 30 minutos a 37°C. As suspensões de células foram geradas por trituração por meio de de um filtro de náilon de 70 µm e depois lavadas com o meio RPMI completo. As células foram processadas para marcação de superfície com anticorpos anti-CD3, CD45, CD4 e CD8, e também para coloração de Granzyme B intracelular. As células vivas são distinguidas das células mortas usando o corante fixável eFluor506 (eBioscience, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Elas foram ainda permeabilizadas usando o kit de permeabilização (eBioscience, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) e corados para Granzyme B. Os dados foram adquiridos usando o citômetro de fluxo LSRII (Becton-Dickinson Biosciences, Franklin Lakes, NJ). Os dados foram analisados com software FlowJo (*FlowJo, Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ*).

[0581] *Ensaio ELISPOT de IFN-γ*. As células de melanoma B16-F10 foram implantadas intradermicamente nos flancos direito ($5x10^5$ células) e esquerdo ($2,5x10^5$ células) de camundongos C57B/6J. Sete dias após a implantação do tumor, os tumores nos flancos direitos foram injetados com PBS ou vírus recombinantes. As injeções foram repetidas uma vez, 3 dias depois. Dois ou três dias após a segunda injeção, os baços foram coletados de camundongos tratados com vírus diferentes e foram triturados em uma peneira de 70 µm (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Os glóbulos vermelhos foram lisados usando ACK Lysis Buffer (Life Technologies, Carlsbad, CA) e as células foram ressuspensas em meio RPMI completo. As células $CD8^+$ T foram purificadas usando MicroBeads CD8α (Ly-2) da Miltenyi Biotechnology. O ensaio de enzyme-linked immunospot (ELISPOT) foi realizado para medir as atividade de células IFN-γ^+ $CD8^+$ T específicas do tumor de acordo com o protocolo do fabricante (Becton-Dickinson Biosciences, Franklin Lakes, NJ). As células $CD8^+$ T foram misturadas com células B16 irradiadas na razão de 1: 1 (250.000 células cada) em meio RPMI, e a placa ELISPOT foi incubada a 37°C por 16 horas antes da coloração.

[0582] *Geração de vírus MVA∆C7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L recombinante*. A recombinação em duas etapas foi usada para gerar este vírus. A primeira etapa é gerar MVA∆C7L-hFlt3L. O vetor pUC57 foi construído para inserir um cassete de expressão no locus C7L de MVA, que inclui o gene hFlt3L sob o promotor inicial e tardio sintético viral de vaccinia (PsE/L) e GFP sob o controle do promotor P7.5 de vaccinia usado como marcador de seleção. Este cassete de expressão foi flanqueado pela sequência parcial de C8L e C6R no lado esquerdo e direito do gene C7L. As células BHK21 foram infectadas com MVA a uma multiplicidade de infecção (MOI) de 0,5) durante 1h e, em seguida, foram transfectadas com os DNAs de plasmídeo descritos acima. As células infectadas foram coletadas em 48h. Os vírus recombinantes foram selecionados por seleção em série de focos $GFP^{+.}$ A análise de PCR foi realizada para verificar que MVA∆C7L-hFlt3L não possui o gene C7L e com

inserção de hFlt3L. A segunda etapa para gerar MVA∆C7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L. O plasmídeo pCB contendo o gene mOX40L de ódon otimizado sob o controle de vaccinia PsE/L, bem como o *gene de xantina-guanina fosforibosil transferase de E. coli* (gpt) sob o controle do promotor P7.5 de vaccinia flanqueado pelo gene da timidina quinase (TK) em ambos os lados foi construído. As células BHK21 foram infectadas com MVA∆C7L-hFlt3L a uma multiplicidade de infecção (MOI) de 0,5) durante 1h e, em seguida, foram transfectadas com os DNAs de plasmídeo descritos acima. As células infectadas foram coletadas em 48h. Os vírus recombinantes foram selecionados por meio de cultura adicional em meio de seleção gpt incluindo MPA, xantina e hipoxantina, e purificados por placa. A análise de PCR foi realizada para verificar que MVA∆C7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L carece do gene C7L e parte do gene TK, mas com inserção de hFlt3L e mOX40L. MVA∆C7L-hFlt3L-TK(-) também foi construído com plasmídeo pCB contendo o gene gpt sob o controle do promotor P7.5 de vaccinia flanqueado pelo gene TK em ambos os lados. A análise de PCR foi realizada para verificar que MVA∆C7L-hFlt3L-TK(-) carece do gene C7L e parte do gene TK, mas com inserção de hFlt3L.

[0583] *Modelo de implantação tumoral bilateral e injeção intratumoral com MVA∆C7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L recombinante na presença ou ausência de bloqueio do ponto de verificação imunológico*. Resumidamente, células de melanoma B16-F10 foram implantadas intradermicamente nos flancos esquerdo e direito de camundongos C57BL/6 ($5x10^5$ no flanco direito e $1x10^5$ no flanco esquerdo). 9 dias após a implantação do tumor, os tumores maiores no flanco direito foram injetados por via intratumoral com $2x10^7$ pfu de MVA∆C7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L. Os camundongos também foram tratados com administração intraperitoneal de anticorpos de bloqueio do ponto de verificação imunológico, incluindo anti-CTLA-4 (100 µg por camundongo por injeção) ou anti-PD-L1 (250 µg por camundongo por injeção) duas vezes por semana. Os tamanhos dos tumores foram medidos e os tumores foram

injetados repetidamente duas vezes por semana. A sobrevivência dos camundongos foi monitorada. Os volumes dos tumores foram calculados de acordo com a seguinte fórmula: l (comprimento)xw (largura)xh (altura)/2. Os camundongos foram sacrificados por sinais de sofrimento ou quando o diâmetro do tumor atingiu 10 mm.

[0584] *Implantação de tumor intradérmico unilateral e injeção intratumoral com vírus* MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L *recombinante na presença ou ausência de bloqueio de ponto de verificação imunológico para o tratamento de grandes tumores estabelecidos.* O melanoma B16-F10 ($5x10^5$ células) foi implantado por via intradérmica na pele raspada no flanco direito de camundongos WT C57BL/6J. Após 9 dias pós implantação, quando os tumores tiverem 5 mm de diâmetro, eles serão injetados com MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L ($5x10^7$ pfu) ou PBS quando os camundongos estiverem sob anestesia. Os vírus foram injetados duas vezes por semana. Os camundongos também foram tratados com administração intraperitoneal de anticorpos de bloqueio do ponto de verificação imunológico, incluindo anti-CTLA-4 (100 µg por camundongo por injeção), anti-PD-1 (250 µg por camundongo por injeção) ou anti-PD-L1 (250 µg por rato por injeção) duas vezes por semana. Os volumes dos tumores foram calculados de acordo com a seguinte fórmula: l (comprimento)xw (largura)xh (altura)/2. A sobrevivência dos camundongos foi monitorada. Os camundongos foram sacrificados por sinais de sofrimento ou quando o diâmetro do tumor atingiu 10 mm.

[0585] *Preparação de fibroblastos de embrião de galinha (CEFs) primários.* Dia 9-11 dias de embriões de galinha de ovos SPF (Charles River, Cat # 10100326) foram usados. Os embriões foram picados espremendo-se por meio de de uma seringa de 10 cc em um tubo estéril de 50mL-EP. Após digestão com 2,5% de tripsina/EDTA a 37˚C por 5 min, as suspensões de células foram filtradas por meio de de um filtro de nylon de 70 µM. As suspensões de células foram sedimentadas, ressuspensas em meio MEM

completo e depois cultivadas em frascos T-75 até que a camada de células se tornasse confluente.

[0586] *Crescimento em várias etapas em fibroblastos de embrião de galinha (CEFs) primários.* $5x10^5$ células de CEF foram semeadas em uma placa de 6 cavidades e foram cultivadas durante a noite. As células foram infectadas com MVA, MVAΔC7L-hFlt3L, MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L, ou MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-hOX40L a um MOI de 0,05 por uma hora. O inóculo foi removido e as células foram lavadas com PBS uma vez e incubadas com meio fresco. As células foram coletadas 1, 24, 48 e 72h após a infecção. Após três ciclos de congelamento e descongelamento, as amostras foram sonicadas e os títulos do vírus foram determinados por diluição em série e infecção de células BHK21. Microscópio confocal foi usado para visualizar foci GFP^+ para contagem.

[0587] *Geração de células dendríticas derivadas de monócitos humanos.* Toda a coleta e uso de espécimes humanos obedeceu aos protocolos revisados e aprovados pelo Comitê de Revisão Institucional e Privacidade do Memorial Hospital, MSKCC. Plaquetas de dose dupla (Buffy coats) foram obtidos de doadores saudáveis no New York Blood Center e células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) separadas por centrifugação padrão em Ficoll-Paque PLUS (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suécia). PBMCs aderentes a plástico de cultura de tecidos compreendiam os precursores de moDCs, que foram cultivados em soro humano RPMI 1640-1% completo suplementado com GM-CSF (1000 IU/ml) e IL-4 (500 IU/ml). Meio fresco e citocinas foram reabastecidos a cada 48h. MoDCs imaturos (dia 6) foram infectados com Heat-iMVA, MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-), ou MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-hOX40L a um MOI de 1, ou tratados com poli I: C a 10 µg/ml. As células foram coletadas 24 horas após o tratamento e coradas com anticorpo anti-hOX40L conjugado com PE antes das análises FACS.

[0588] *Ensaio Dual Luciferase Reporter.* As atividades da luciferase foram medidas usando o ensaio de sistema Dual Luciferase Reporter de acordo com as instruções do fabricante (Promega). Resumidamente, os plasmídeos de expressão incluindo um construto repórter de luciferase de firefly, uma *construção repórter de luciferase Renilla*, bem como outras construções de expressão foram transfectadas em células HEK293T. CGAS murino (50 ng) e hSTING (10 ng) foram usados em dosagens subótimas com o propósito de identificar inibidores. Os plasmídeos transfectados contendo genes virais foram usados a 200 ng. O repórter luciferase IFNB-firefly e o plasmídeo de controle pRL-TK foram usados a 50 ng e 10 ng, respectivamente. 24 horas após a transfecção, as células foram recoletadas e lisadas. 20 µL de lisados de células foram incubados com 50 µL de LARII para medir a atividade da luciferase firefly e, em seguida, foram incubados com 50 µL de reagente Stop & Glo para medir a atividade da luciferase de *Renilla.* A atividade relativa da luciferase foi expressa como unidades arbitrárias normalizando a atividade da luciferase firefly sob o promotor IFNB ou ISRE para a atividade da luciferase da Renilla de um plasmídeo de controle pRL-TK. A indução dobrada foi calculada dividindo a atividade relativa da luciferase sob uma determinada condição de teste por aquela sob a condição de fundo.

[0589] *Geração de retrovírus expressando vaccinia E5, K7, B14, B18.* As células HEK293T foram passadas para uma placa de 6 cavidades. No dia seguinte, as células foram transfectadas com três plasmídeos: VSVG (1 µg); gag/pol (2 µg); e PQCXIP-E5, K7, B14, B18 (2 µg), com 10 µl de lipofectamina 2000. Após 2 dias, os sobrenadantes celulares foram coletados e filtrados por meio de de um filtro de 0,45 µm e armazenados a -80°C.

[0590] *Geração da linha celular RAW264.7 que expressa de forma estável vaccinia FLAG marcada com E5, K7, B14 ou B18.* As células RAW264.7 foram passadas para uma placa de 6 cavidades. No dia seguinte, as células foram infectadas com retrovírus que expressam E5, K7, B14 ou B18 em MOI 5. Após 2 dias, o meio de cultura foi substituído por meio DMEM fresco

contendo 5 μg/ml de puromicina. Após uma semana, as células de sobrevivência são as células que expressam de forma estável E5, K7, B14 ou B18 marcadas com FLAG. A expressão de E5, K7, B14 ou B18 marcado com FLAG foi verificada por análise de Western blot usando anticorpo anti-FLAG.

[0591] *Isolamento de RNA e PCR quantitativo em tempo real.* O RNA foi extraído de lisados de células inteiras com um kit RNeasy Mini (Qiagen) e foi transcrito reversamente com um kit de síntese de cDNA First Strand (Fermentas). A PCR quantitativa em tempo real foi realizada em triplicata com SYBR Green PCR Mater Mix (Life Technologies) e Applied Biosystems 7500 Real-time PCR Instrument (Life Technologies) usando iniciadores específicos para genes. A expressão relativa foi normalizada para os níveis de gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH).

[0592] *Reagentes.* As fontes comerciais de reagentes foram as seguintes: o anticorpo anti-hFlt3L foi adquirido da Thermo Fisher e o anticorpo secundário para anti-hFlt3L (cabra anti-camundongo conjugado com PE) foi da BD Biosciences. O mOX40L conjugado com PE e o anticorpo anti-hOX40L conjugado com PE foram adquiridos na Biosciences e R & D, respectivamente. Os anticorpos anti-CD3, -CD45, -CD8 e -Granzyme B foram adquiridos em eBioscience (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). As micropérolas de CD8α eram de Miltenyi Biotechnology (Somerville, MA). O kit de ensaio ELISPOT foi adquirido na Becton-Dickinson Biosciences (Franklin Lakes, NJ). Anti-CTLA4 terapêutico (clone 9H10 e 9D9), anti-PD1 (clone RMP1-14), anti-PD-L1 (clone 10F.9G2) foram adquiridos na BioXcell; Os anticorpos usados para citometria de fluxo foram adquiridos na eBioscience (CD45.2 Alexa Fluor 700, CD3 PE-Cy7, CD4 APC-efluor780, CD8 PerCP-efluor710), Invitrogen (CD4 QDot 605, Granzyme B PE-Texas Red, Granzyme B APC).

[0593] *Estatísticas*. *O teste t* de Student não pareado bicaudal foi usado para comparações de dois grupos nos estudos. Os dados de sobrevivência foram analisados por teste de log-rank (Mantel-Cox). Os valores

de p considerados significativos são indicados nas figuras a seguir: *, P <0,05; **, P <0,01; ***, P <0,001; ****, P <0,0001.

[0594] *Geração de linhas de células nocaute B2M, MDA5, STING*. As células B16-F10 foram transfectadas com 800 ng de plasmídeo de expressão Cas9 (obtido de Church lab por meio de da Addgene) e 800 ng de cada plasmídeo de expressão de gRNA usando o reagente Lipofectamine 3000 (Thermo Scientific). As células foram cultivadas por pelo menos 2 dias após a transfecção. O sucesso dos construtos CRISPR foi então testado. No caso de STING e MDA5 CRISPR, os exóns direcionados foram amplificados por PCR do genoma com iniciadores específicos e, em seguida, digeridos com 2 unidades de endonuclease T7 (obtida de new England biolabs) por 90 minutos. Após a digestão, a eletroforese em gel de agarose foi realizada para determinar se T7 clivou os amplicons de PCR, indicando CRISPR bem-sucedido. Após a confirmação da eficácia do gRNA, as células individuais foram semeadas em placas de 96 cavidades e expandidas em isolados clonais. Após a expansão, os isolados clonais foram selecionados usando outra rodada de amplificação por PCR e digestão de T7. A análise de Western Blot subsequente confirmou a perda de proteínas-alvo (STING ou MDA5). No caso de Beta 2 Microglobulina (B2M) CRISPR, a análise FACS foi usada para verificar o CRISPR bem-sucedido antes da classificação das células deficientes em B2M em placas de 96 cavidades e expandidas em isolados clonais.

[0595] *Tecidos tumorais humanos de pacientes com Doença de Paget Extramamária (EMPD)*. Os tecidos tumorais humanos foram obtidos de pacientes com doença de Paget extramamária (EMPD) inscritos no protocolo clínico aprovado pelo IRB 06-107 no Memorial Sloan Kettering Cancer Center. A biópsia por punção de 3-4 mm foi realizada pelo médico na clínica. Os tecidos tumorais foram transportados para o laboratório em meio RPMI em gelo. Assim que chegaram ao laboratório, foram cortados em pequenos pedaços com um bisturi e infectados com MVAΔE5R-hFlt3L-hOX40L a um MOI de 10. 48h após a infecção, os tecidos foram digeridos com colagenase D a

37˚C por 45 min. Em seguida, eles foram filtrados e corados com anticorpos de superfície para CD3, CD4 e CD8. Em seguida, foram permeabilizados e corados com anticorpos para Granzyme B e Foxp3.

Exemplo 1: Geração de MVAΔE3L recombinante com uma deleção de TK que expressa OX40L murino.

[0596] Este exemplo descreve a geração de um vírus vaccinia MVAΔE3L recombinante compreendendo uma deleção de TK que expressa OX40L murino (mOX40L). A **FIG. 1** mostra o diagrama esquemático de um cassete de expressão projetado para expressar mOX40L usando o promotor inicial e tardio sintético viral de vaccinia (PsE/L). Um plasmídeo contendo um gene mOX40L com códon otimizado sob o controle da vaccinia PsE/L, bem como o *gene da xantina-guanina fosforibosil transferase (gpt) de E. coli,* sob o controle do promotor P7.5 da vaccinia flanqueado pelo gene de timidina quinase (TK) em ambos os lados foi construído usando tecnologia de vírus recombinante padrão por meio de de recombinação homóloga no locus TK entre o DNA do plasmídeo pCB e o DNA genômico viral (**FIG. 1**). As células BHK21 foram infectadas com MVAΔE3L a uma multiplicidade de infecção (MOI) de 0,5) durante 1h e, em seguida, foram transfectadas com os DNAs de plasmídeo descritos acima. As células infectadas foram coletadas em 48 h. Os vírus recombinantes foram selecionados por meio de cultura adicional em meio de seleção gpt incluindo MPA, xantina e hipoxantina, e purificados por placa. A análise de PCR foi realizada para verificar se MVAΔE3L-TK(-)-mOX40L carece de parte do gene TK e com inserção de mOX40L (**FIG. 2A**). A expressão de mOX40L em células B16-F10 infectadas com o vírus MVAΔE3L-TK(-)-mOX40L foi determinada por análise de FACS usando anticorpo anti-mOX40L (**FIG. 2B**). Resumidamente, as células B16-F10 foram infectadas com MVAΔE3L-TK(-)-mOX40L a um MOI de 10. 24 horas após a infecção, as células foram coradas com anticorpo anti-mOX40L conjugado com PE. A expressão de mOX40L na superfície das células infectadas foi avaliada por análise FACS. A **FIG. 2B** mostra que a maioria das células infectadas expressa mOX40L.

Exemplo 2: A injeção intratumoral de MVAΔE3L-TK(-)-mOX40L resulta em células T efetoras infiltrantes de tumor mais ativadas em tumores distantes em comparação com MVAΔE3L no modelo de implantação tumoral bilateral B16-F10.

[0597] Para avaliar se a injeção intratumoral de MVAΔE3L-TK(-)-mOX40L ou MVAΔE3L em melanomas B16-F10 leva à ativação e proliferação de células $CD8^+$ e $CD4^+$ T, um modelo de implantação tumoral bilateral foi usado. As células de melanoma B16-F10 foram implantadas por via intradermica na pele raspada nos flancos direito ($5x10^5$ células) e esquerdo ($2,5x10^5$ células) de um camundongo C57BL/6J. Após 7 dias pós implantação, os tumores maiores no flanco direito (cerca de 3 mm ou maior de diâmetro) foram injetados duas vezes por semana com PBS, MVAΔE3L, MVAΔE3L-TK(-)-mOX40L quando os camundongos estavam sob anestesia. Três dias após a segunda injeção, os tumores foram coletados e as células foram processadas para marcação de superfície com anticorpos anti-CD3, CD45, CD4 e CD8, e também para coloração de Granzyme B intracelular. Os infiltrados de células imunológicas vivas nos tumores não injetados foram analisados por FACS. Houve um aumento dramático nas células $CD8^+$ T que expressam Granzyme B nos tumores não injetados, de 18% em tumores de camundongos tratados com PBS e 17% em tumores de camundongos tratados com MVAΔE3L para 53% nos tumores de camundongos tratados com MVAΔE3L-TK(-)-mOX40L (**FIG. 3A-D**). Houve também um aumento significativo nas células $CD4^+$ T que expressam Granzyme B nos tumores não injetados após o tratamento do vírus intratumoral, de 0,6% em tumores de camundongos tratados com PBS para 4,3% em camundongos tratados com MVAΔE3L para 24% no tumores de camundongos tratados com MVAΔE3L-TK(-)-mOX40L (**FIG. 3E-H**). Estes resultados demonstram que a injeção intratumoral do MVAΔE3L-TK(-)-mOX40L recombinante é mais potente do que seu vírus parental MVAΔE3L na indução de células $CD8^+$ T citotóxicas e/ou células $CD4^+$ T em tumores não injetados.

Exemplo 3: A injeção intratumoral com MVA∆E3L-TK(-)-mOX40L leva à geração de imunidade de células CD8⁺ T antitumor sistêmicas

[0598] Para avaliar se os camundongos ganharam imunidade sistêmica de células T antitumorais contra o câncer de melanoma B16-F10 murino após o tratamento com injeção intratumoral de MVA∆E3L-TK(-)-mOX40L ou MVA∆E3L, ensaio de (ELISpot) foi usado. Células B16-F10 ($5x10^5$ e $2,5x10^5$, respectivamente) foram implantadas por via intradermica na pele raspada no flanco direito e esquerdo de camundongos C57BL/6J. Sete dias após a implantação do tumor, os tumores no flanco direito (cerca de 3 mm de diâmetro) foram injetados com PBS, MVA∆E3L ou MVA∆E3L-TK(-)-mOX40L. As injeções foram repetidas três dias depois, seguidas de eutanásia três dias após a segunda injeção. ELISpot foi realizado para avaliar a geração de células $CD8^+$ T específicas antitumorais nos baços de camundongos tratados com os vírus recombinantes. Resumidamente, células $CD8^+$ T foram isoladas de esplenócitos e $3x10^5$ células foram cultivadas com $1,5x10^5$ células B16-F10 irradiadas durante a noite a 37°C em anti-IFN-γ microcavidades de placa BD ELISpot revestidos. As células T $CD8^+$ foram estimuladas com células B16-F10 irradiadas com um γ-irradiador e secreção de IFN-γ foi detectada com um anticorpo anti-IFN-γ. A **FIG. 4A** mostra imagens representativas de pontos IFN-$γ^+$ por 300.000 células $CD8^+$ T de camundongos individuais tratados com PBS, MVA∆E3L, ou MVA∆E3L-TK(-)-mOX40L. A **FIG. 4B** mostra o número de pontos IFN-$γ^+$ por 300.000 células $CD8^+$ T de camundongo individual em cada grupo tratado com PBS, MVA∆E3L, ou MVA∆E3L-TK(-)-mOX40L. Estes resultados demonstram que a injeção intratumoral de MVA∆E3L-TK(-)-mOX40L é mais eficaz do que MVA∆E3L na geração de células $CD8^+$ T antitumorais em camundongos tratados em um modelo de implantação bilateral de melanoma B16-F10 murino. Assim, estes resultados demonstram que o MVA∆E3L-TK(-)-mOX40L recombinante da presente tecnologia são eficazes em aumentar ou

promover uma resposta imunológica no indivíduo e no aumento de células $CD8^+$ T citotóxicas dentro de um indivíduo.

Exemplo 4: Geração de MVA∆C7L recombinante com uma deleção de TK que expressa OX40L murino.

[0599] Este exemplo descreve a geração de um vírus vaccinia MVA∆C7L recombinante compreendendo uma deleção de TK que expressa OX40L murino (mOX40L). A **FIG. 5A** mostra a primeira etapa para gerar MVA∆C7L-hFlt3L. O vetor pUC57 foi construído para inserir um gene específico de interesse (SG) no locus C7L de MVA, que inclui um cassete de expressão projetado para expressar hFlt3L usando o promotor precoce e tardio sintético viral de vaccinia (PsE/L) e GFP sob o controle de o promotor vaccinia P7.5 usado como um marcador de seleção. O cassete de expressão foi flanqueado pela sequência parcial de C8L e C6R no lado esquerdo e direito do gene C7L (**FIG. 5A**). As células BHK21 foram infectadas com MVA a uma multiplicidade de infecção (MOI) de 0,5) durante 1h e, em seguida, foram transfectadas com os DNAs de plasmídeo descritos acima. As células infectadas foram coletadas em 48h. Os vírus recombinantes foram selecionados por seleção em série de focos $GFP^{+.}$ A análise de PCR foi realizada para verificar que MVA∆C7L-hFlt3L não possui o gene C7L e com inserção de hFlt3L (dados não mostrados). A **FIG. 5B** mostra a segunda etapa para gerar MVA∆C7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L. Um plasmídeo contendo o gene mOX40L de ódon otimizado sob o controle de vaccinia PsE/L, bem como o *gene de xantina-guanina fosforibosil transferase de E. coli* (gpt) sob o controle do promotor P7.5 de vaccinia flanqueado pelo gene da timidina quinase (TK) em ambos os lados foi construído. As células BHK21 foram infectadas com MVA∆C7L-hFlt3L a uma multiplicidade de infecção (MOI) de 0,5) durante 1h e, em seguida, foram transfectadas com os DNAs de plasmídeo descritos acima. As células infectadas foram coletadas em 48 h. Os vírus recombinantes foram selecionados por meio de cultura adicional em meio de seleção gpt incluindo MPA, xantina e hipoxantina, e purificados por placa. A análise de PCR foi

realizada para verificar que MVA∆C7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L carece do gene C7L e parte do gene TK, mas com inserção de hFlt3L e mOX40L. Em contraste, o genoma MVA parental contém o gene C7L e TK como esperado (**FIG. 5C**). A expressão de mOX40L em células B16-F10 murino e células SK-MEL-28 humanas infectadas com o vírus MVA∆C7L-TK(-)-mOX40L foi determinada por análise de FACS usando anticorpo anti-hFlt3L (**FIG. 6**) e anticorpo anti-mOX40L (**FIG. 7**). A maioria das células B16-F10 murinas e SK-MEL28 tinham altos níveis de expressão de mOX40L (**FIG. 7**).

Exemplo 5: A injeção intratumoral (IT) de MVA∆C7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L leva ao recrutamento de células $CD8^+$ e $CD4^+$ T ativadas para os tumores distantes não injetados no modelo de implantação de tumor bilateral B16-F10.

[0600] Para avaliar se IT de MVA∆C7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L resulta na geração de imunidade antitumoral sistêmica, um modelo de implantação de tumor bilateral B16-F10 foi usado. Resumidamente, as células de melanoma B16-F10 foram implantadas por via intradermica na pele raspada nos flancos direito ($5x10^5$ células) e esquerdo ($2,5x10^5$ células) de um camundongo C57BL/6J. Após 7 dias pós implantação, os tumores maiores no flanco direito foram injetados duas vezes por semana com PBS, MVA∆C7L, MVA∆C7L-hFlt3L, ou MVA∆C7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L a um MOI de $2x10^7$ pfu, ou com uma quantidade equivalente de Heat-inativado MVA∆C7L-hFlt3L (Heat-iMVA∆C7L-hFlt3L). Dois dias após a segunda injeção, os tumores foram coletados e as células foram processadas para marcação de superfície com anticorpos anti-CD3, CD45, CD4 e CD8, e também para coloração de Granzyme B intracelular. Os infiltrados de células imunológicas vivas nos tumores não injetados foram analisados por FACS. IT de MVA∆C7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L resultou no maior número de células $CD8^+$ T totais por grama de tumor, bem como células Granzyme B^+ $CD8^+$ T totais por grama de tumor nos tumores não injetados em comparação com os outros grupos de tratamento (**FIGs. 8A-8C**). Notavelmente, IT de MVA∆C7L-hFlt3L-TK(-)-

mOX40L resultou no maior número de células $CD4^+$ T totais por grama de tumor, bem como células Granzyme B^+ $CD4^+$ T totais por grama de tumor nos tumores não injetados em comparação com os outros grupos de tratamento (**FIGs. 9A-9C**). Estes resultados demonstram que IT de MVA∆C7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L é mais eficaz do que seu vírus parental MVA∆C7L ou MVA∆C7L-hFlt3L na indução de células $CD8^+$ e $CD4^+$ T citotóxicas em tumores não injetados. Além disso, este MVA recombinante modificado é mais potente do que o MVA∆C7L-hFlt3L inativado na indução de respostas de células $CD8^+$ e $CD4^+$ T antitumorais.

Exemplo 6: A injeção de IT de MVA∆C7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L leva à imunidade sistêmica antitumoral de células $CD8^+$ T mais forte em comparação com MVA∆C7L.

[0601] ELISpot foi realizado para avaliar a geração de células $CD8^+$ T específicas antitumorais nos baços de camundongos tratados com os vírus recombinantes, conforme descrito no Exemplo 5. Resumidamente, células $CD8^+$ T foram isoladas de esplenócitos e $3x10^5$ células foram cultivadas com $1,5x10^5$ células B16-F10 irradiadas durante a noite a 37°C em anti-IFN-γ microcavidades de placa BD ELISpot revestidos. As células T $CD8^+$ foram estimuladas com células B16-F10 irradiadas com um γ-irradiador e secreção de IFN-γ foi detectada com um anticorpo anti-IFN-γ. A **FIG. 10A** mostra imagens representativas de pontos IFN-γ^+ por 300.000 células $CD8^+$ T de camundongos individuais tratados com PBS, MVA∆C7L, MVA∆C7L-hFlt3L, MVA∆C7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L, ou Heat-iMVA∆C7L A **FIG. 10A** mostra o número de pontos IFN-γ^+ por 300.000 células $CD8^+$ T de camundongos individuais em cada grupo tratados com PBS, MVA∆C7L, MVA∆C7L-hFlt3L, MVA∆C7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L, ou Heat-iMVA∆C7L Estes resultados demonstram que a injeção IT de MVA∆C7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L é mais eficaz do que MVA∆C7L na geração de células $CD8^+$ T antitumorais em camundongos tratados em um modelo de implantação bilateral de melanoma B16-F10 murino.

Exemplo 7: A injeção IT de MVA∆C7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L é eficaz na erradicação ou no retardo do crescimento tumoral de tumores injetados e não injetados e no prolongamento da sobrevivência de camundongos.

[0602] Para testar se a administração IT de MVA∆C7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L gera efeitos antitumorais, um modelo de implantação de tumor B16-F10 murino bilateral foi usado. Resumidamente, células de melanoma B16-F10 foram implantadas intradermicamente nos flancos esquerdo e direito de camundongos C57B/6 ($5x10^5$ no flanco direito e $1x10^5$ no flanco esquerdo). Nove dias após a implantação do tumor, MVA∆C7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L ($2x10^7$ PFU) foi administrado nos tumores maiores no flanco direito duas vezes por semana, com injeção intraperitoneal (IP) concomitante, de qualquer um dos anti- Anticorpo CTLA-4 (clone 9D9, 100 µg por camundongo) ou anti-PD-L1 (250 µg por camundongo) ou controle de isotipo. Os tamanhos dos tumores foram medidos duas vezes por semana e a sobrevivência dos camundongos foi monitorada (**FIG. 11A**). Os volumes de tumores injetados e não injetados de camundongos individuais são mostrados na **FIG. 11B** e **FIG. 11C**. Os volumes de tumores injetados e não injetados no Dia 0, 7 e 11 são mostrados na **FIG. 11D** e **FIG. 11E**. Em camundongos tratados com PBS, os tumores cresceram rapidamente, o que resultou em morte precoce com uma sobrevida média de 7 dias (**FIGs. 11F** e **11G**). A injeção intratumoral de MVA∆C7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L resultou em crescimento tumoral retardado e sobrevida melhorada em comparação com PBS, com uma extensão da sobrevida média para 14 dias (**FIGs. 11F** e **11G**). O melanoma B16-F10 é um tumor muito agressivo. Os inventores esperaram intencionalmente 9 dias após a implantação do tumor antes de iniciar o tratamento.

Exemplo 8: A combinação da injeção IT de MVA∆C7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L com a administração sistêmica do bloqueio do ponto de verificação imunológico gera respostas antitumorais sinérgicas.

[0603] A combinação com administração IT de MVA∆C7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L e administração sistêmica de anti-CTLA-4 ou anti-PD-L1 teve eficácia antitumoral superior em comparação com o vírus IT sozinho. Os volumes médios de tumor de ambos os tumores injetados e não injetados foram menores no grupo IT de MVA∆C7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L mais anti-PD-L1, seguido por IT de MVA∆C7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L mais grupo anti-CTLA-4, quando comparado com o vírus IT sozinho ou tratamento simulado de PBS (**FIGs. 11B-11E**). A sobrevida média dos camundongos foi estendida para 21 dias no grupo IT de MVA∆C7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L mais anti-CTLA-4, e para 26,5 dias no grupo IT de MVA∆C7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L mais anti-PD-L1 (**FIGs. 11F** e **11G**). Este resultado demonstra que os efeitos antitumorais induzidos por IT de MVA∆C7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L podem ser aumentados na presença de bloqueio de ponto de verificação imunológico em um modelo de tumor murino bilateral. Neste modelo de tumor B16-F10, o anticorpo de bloqueio do ponto de verificação imunológico sozinho não é eficaz, o que foi demonstrado por muitos laboratórios, incluindo os laboratórios dos inventores.

Exemplo 9: A combinação da injeção IT de MVA∆C7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L com a administração sistêmica do bloqueio do ponto de verificação imunológico é mais eficaz do que o vírus IT sozinho na redução e erradicação do grande melanoma B16-F10 já estabelecido.

[0604] Para testar se a combinação com administração IT de MVA∆C7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L e administração sistêmica de anti-CTLA-4, anti-PD-1 ou anti-PD-L1 teve eficácia antitumoral superior em comparação com o vírus IT sozinho contra o grande melanoma B16-F10 estabelecido, $5x10^5$ células foram implantadas por via intradermica nos flancos direitos de camundongos C57B/6. Nove dias após a implantação do tumor, quando os tumores tinham 5 mm de diâmetro, eles foram tratados com IT de PBS,

MVA∆C7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L sozinho, MVA∆C7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L mais IP anti-CTLA-4, MVA∆C7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L mais IP anti-PD-1 ou MVA∆C7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L mais IP anti-PD-L1 duas vezes por semana. Os volumes do tumor foram medidos e a sobrevivência dos camundongos foi monitorada. Embora IT de MVA∆C7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L sozinha tenha alguns efeitos antitumorais, a combinação de vírus IT com anti-PD-1 teve os melhores efeitos sinérgicos, seguido pelas combinações de vírus IT mais anti-PD -L1 e vírus IT mais anti-CTLA-4.

Exemplo 10: Geração de MVA∆C7L-hFlt3 recombinante com uma deleção de TK que expressa OX40L humano.

[0605] Este exemplo descreve a geração de um vírus vaccinia MVA∆C7L-hFlt3L recombinante compreendendo uma deleção de TK que expressa OX40L humano (hOX40L). A **FIG. 13A** mostra a primeira etapa para gerar MVA∆C7L-hFlt3L, que foi descrito no Exemplo 4. A **FIG. 13B** mostra a segunda etapa para gerar MVA∆C7L-hFlt3L-TK(-)-hOX40L. Um plasmídeo contendo o gene OX40L humano sob o controle do PsE/L vaccinia, bem como do mCherry sob o controle de vaccinia, o promotor P7.5 flanqueado pelo gene da timidina quinase (TK) em ambos os lados foi construído. As células BHK21 foram infectadas com MVA∆C7L-hFlt3L a uma multiplicidade de infecção (MOI) de 0,5) durante 1h e, em seguida, foram transfectadas com os DNAs de plasmídeo descritos acima. As células infectadas foram coletadas em 48h. Os vírus recombinantes foram selecionados por meio de da escolha de foci mCherry e purificados por placa. A análise de PCR foi realizada para verificar que MVA∆C7L-hFlt3L-TK(-)-hOX40L carece do gene C7L e parte do gene TK, mas com inserção de hFlt3L e hOX40L (dados não mostrados). A inserção também foi sequenciada para verificar a precisão das sequências.

Exemplo 11: Os vírus recombinantes MVA∆C7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L e MVA∆C7L-hFlt3L-TK(-)-hOX40L replicam-se eficientemente em fibroblastos de embrião de galinha.

[0606] O MVA é comumente fabricado em fibroblastos de embrião de galinha (CEFs). Para testar se os vírus MVA recombinantes, MVA∆C7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L e MVA∆C7L-hFlt3L-TK(-)-hOX40L replicam em CEFs, foi realizado um ensaio de replicação em várias etapas. 5x10 ^{5} células de CEF foram semeadas em uma placa de 6 cavidades e foram cultivadas durante a noite. As células foram infectadas com MVA, MVA∆C7L-hFlt3L, MVA∆C7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L, ou MVA∆C7L-hFlt3L-TK(-)-hOX40L a um MOI de 0,05 por uma hora. O inóculo foi removido e as células foram lavadas com PBS uma vez e incubadas com meio fresco. As células foram coletadas 1, 24, 48 e 72h após a infecção. Os títulos virais foram determinados em células BHK21. A **FIG. 14A** mostra os títulos virais de MVA, MVA, MVA∆C7L-hFlt3L, MVA∆C7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L, ou MVA∆C7L-hFlt3L-TK(-)-hOX40L ao longo do tempo após a infecção em CEFs. Todos os vírus se replicam de forma eficiente em CEFs, com aumento dos títulos de mais de 1.000 a 10.000 vezes (**FIG. 14B)**. Os vírus MVA recombinantes têm ligeira redução dos títulos virais em comparação com o MVA parental (**FIG. 14A** e **14B**).

Exemplo 12: Os vírus recombinantes MVA∆C7L-hFlt3L-TK(-)-hOX40L expressam a proteína hOX40L na superfície das células infectadas.

[0607] A análise FACS foi usada para determinar a expressão de hOX40L na superfície das células infectadas. Resumidamente, as células BHK21 foram infectadas com MVA∆C7L-hFlt3L ou MVA∆C7L-TK(-)-hOX40L a um MOI de 10. 24 horas após a infecção, as células foram coradas com anticorpo anti-hOX40L conjugado com PE. A expressão de hOX40L na superfície das células infectadas foi avaliada por análise FACS. A **FIG. 15A** mostra os níveis de expressão de GFP e hOX40L em células BHK21 infectadas.

[0608] Para testar se MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-hOX40L pode infectar DCs derivadas de monócitos humanos (mo-DCs), células mononucleares de sangue periférico humano (PBMCs) aderentes foram cultivadas na presença de GM-CSF e IL-4 humanos por 5 dias. No dia 6 as células foram tratadas com poli I: C a 10 μg/mL ou infectados com Heat-iMVA, MVAΔC7L-TK (-) ou MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-hOX40L em MOI de 1 24 horas após a infecção, as células foram coletadas e coradas com anticorpo anti-hOX40L conjugado com PE antes das análises FACS. Em comparação com as células B16-F10 murinas, as mo-DCs humanas expressam hOX40L na linha de base. O tratamento com Poly I: C leva a um aumento modesto da expressão de hOX40L na superfície celular. A infecção com Heat-iMVA reduz a expressão de hOX40L. A infecção por MVAΔC7L-hFlt3L e MVAΔC7L-TK(-)-hOX40L de mo-DCs resultou em células GFP+, cerca de 50% e 75%, respectivamente. Apenas a infecção por MVAΔC7L-TK(-)-hOX40L levou ao aumento da expressão de hOX40L em mo-DCs infectadas (**FIG. 15B**). Estes resultados indicam que MVAΔC7L-TK(-)-hOX40L pode infectar efetivamente mo-DCs humanas e expressar hOX40L na superfície de células infectadas. Isso pode ser potencialmente importante para interagir com as células T por meio da interação OX40L-OX40, bem como promover a sobrevivência e a proliferação de células $CD8^+$ e $CD4^+$ T ativadas e específicas para o antígeno.

Exemplo 13: Os vírus recombinantes MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-hOX40L expressam mRNA de hOX40L em níveis elevados em células infectadas.

[0609] A análise quantitativa de RT-PCR foi usada para avaliar o nível de expressão do mRNA de hOX40L em células de melanoma BHK21 e B16-F10 infectadas. Resumidamente, células de melanoma BHK21 e B16-F10 foram infectadas com MVA ou MVAΔC7L-hFlt3L ou MVAΔC7L-TK(-)-hOX40L por 8 ou 16h. RNAs foram extraídos das células e a análise quantitativa de RT-PCR foi realizada para avaliar a expressão do mRNA de hOX40L. Os níveis de mRNA de Vaccinia E3L também foram avaliados. A infecção de células de

melanoma BHK21 e B16-F10 resulta na expressão de E3L e hOX40L 8 e 16h após a infecção. Os níveis de mRNA de E3L e hOX40L em 16h foram maiores do que aqueles em 8h após a infecção (**FIGS. 16A** e **16B**). No geral, a expressão de hOX40L foi maior em células BHK21 infectadas com MVA∆C7L-TK(-)-hOX40L em comparação com as células B16-F10, o que é consistente com a eficiência de replicação deste vírus em BHK21 (permissivo) e células B16-F10 (não permissivas).

Exemplo 14: Clonagem de genes precoces do vírus vaccinia em vetores de expressão

[0610] Genes precoces virais de vaccinia foram testados quanto às suas capacidades de inibir a via de detecção de DNA citosólico cGAS/STING. Para fazer isso, 72 genes precoces virais de vaccinia foram selecionados e seus estruturas de leitura abertas foram amplificadas por PCR e clonados no vetor de expressão (pcDNA3.2-DEST) usando a tecnologia de clonagem de gateway (**FIG. 17**).

Exemplo 15: Estratégia de varredura para identificar inibidores virais da via cGAS/STING.

[0611] Um sistema de ensaio de luciferase dupla foi usado para rastrear potenciais inibidores virais de vaccinia da via cGAS/STING em células HEK293T, uma linha celular de rim embrionário humano transformada com antígeno T grande de SV40 (**FIG. 18**). As células HEK293T foram transfectadas com plasmídeos que expressam IFNB-repórter de luciferase firefly, um plasmídeo de controle pRL-TK que expressa a *luciferase de Renilla*, cGAS murino, STING humano e gene inicial viral individual de vaccinia conforme indicado. CGAS murino (50 ng) e hSTING (10 ng) foram usados em dosagens subótimas com o propósito de identificar inibidores. Os plasmídeos transfectados contendo genes virais foram usados a 200 ng. O repórter luciferase IFNB-firefly e o plasmídeo de controle pRL-TK foram usados a 50 ng e 10 ng, respectivamente. Os ensaios de luciferase duplo foram realizados 24 horas após a transfecção. A atividade da luciferase relativa foi expressa como

unidades arbitrárias normalizando a atividade da luciferase do pirilampo para a atividade da luciferase do Renilla. O adenovírus E1A demonstrou inibir essa via por meio da interação com STING (Lau *et al*., *Science* (2015)) e foi usado como um controle positivo para este ensaio de varredura.

Exemplo 16: Identificação de 8 genes precoces do vírus vaccinia que têm potencial para inibir a via cGAS/STING.

[0612] Um sistema de ensaio de luciferase duplo descrito acima foi usado para rastrear inibidores virais de vaccinia da via cGAS/STING. Um total de oito genes iniciais virais da vaccinia (B18R (WR200), E5R, K7R, B14R, C11R, M1L, N2L e WR199) foram identificados como potenciais inibidores desta via. Os dados relativos a cinco destes genes precoces do vírus da vacínia (B18R (WR200), E5R, K7R, B14R e C11R) são mostrados nas **FIGs. 19A-19C**. Esses incluem alguns genes virais que têm função inibidora conhecida do sistema IFN tipo I, incluindo B18R (WR200), que codifica uma proteína de ligação a IFN tipo I (Alcami *et al*., (1995)). Os papéis de E5R, K7R, B14R e C11R na via do IFN tipo I não foram elucidados anteriormente, embora K7R, B14R e C11R tenham sido descritos como fatores de virulência da vacina (Benfield *et al*., *J. Gen. Virol*. (2013), Chen *et al*., (2008); McCoy *et al.*, (2010); Martin *et al*., (2012)). Foi relatado que o E5R é uma proteína viral precoce associada ao virossomo (Murcia-Nicolas *et al*., (1999)). Seu papel na evasão reações imunológicas nunca foi relatado.

Exemplo 17: Confirmação de que a superexpressão de B18R, E5R, K7R, C11R ou B14R regula negativamente a expressão do gene IFNB induzida pela co-transfecção de cGAS e hSTING em células HEK293-T.

[0613] Para confirmar que B18R (WR200), E5R, K7R, C11R e B14R desempenham papéis inibidores na expressão do gene IFNB induzida por cGAS/STING, as células HEK293T foram co-transfectadas com plasmídeos que expressam IFNB-firefly luciferase repórter, um plasmídeo de controle pRL-TK que expressa a *luciferase de Renilla*, cGAS murino (**FIG. 20A**), ou cGAS humano (**FIG. 20B)**, STING humano, gene inicial viral individual da vaccinia

conforme indicado, bem como E1A como controle positivo. A superexpressão dos genes B18R (WR200), E5R, K7R, C11R ou B14R resultou na redução da expressão do gene IFNB induzida por cGAS murino/STING humano (**FIG. 20A**). A superexpressão dos genes E5R, K7R, C11R, ou B14R resultou na redução da expressão do gene IFNB induzida por cGAS humano/STING humano (FIG. No entanto, a superexpressão de B18R (WR200) não consegue inibir a expressão do gene IFNB induzida por cGAS/STING humano (**FIG. 20B**). **A FIG. 20C** mostra que os genes virais B18R (WR200), E5R, K7R, C11R ou B14R marcados com FLAG foram capazes de inibir a expressão do gene IFNB induzida por cGAS murino/STING humana.

Exemplo 18: A superexpressão dos genes E5R, B14R, K7R e B18R marcados com FLAG em uma linha celular de macrófago murino estável inibe a expressão do gene IFNB induzida por infecção com MVA inativado por calor ou transfecção com DNA imunoestimulante.

[0614] Foi gerada uma linha celular estável, RAW264.7, que superexpressa os genes E5R-FLAG, B14R-FLAG, FLAG-K7R ou B18R-FLAG. Resumidamente, RAW264.7 foram transduzidos com retrovírus contendo o construto de expressão dos genes vaccinia E5R-FLAG, B14R-FLAG, FLAG-K7R ou B18R-FLAG sob o promotor CMV e marcador de seleção de puromicina. O vetor vazio com marcador de seleção de medicamentos também foi usado para gerar uma linha de células de controle. Células resistentes a medicamentos foram obtidas e usadas para as seguintes experiências. As células foram infectadas com Heat-iMVA ou transfectadas com DNA imunoestimulante (ISD) (10 µg/ml). Às 12 horas após o tratamento, as células foram coletadas. RNAs foram gerados e RT-PCR quantitativo foi realizado para avaliar a expressão do gene IFNB. A infecção com Heat-iMVA ou tratamento com ISD na linha de células de controle resultou na indução de 8 e 32 vezes do gene IFNB, respectivamente. A indução de IFNB foi significativamente reduzida em células que superexpressam E5, B14, K7 ou B18 (**FIG. 21**). Estes

resultados indicam que vaccinia E5R, B14R, K7R e B18R inibem a via de detecção de DNA citosólico e bloqueiam a indução do gene IFNB.

Exemplo 19: Geração de vírus MVAΔE5R, MVAΔK7R recombinantes ou MVAΔB14R.

[0615] Para estabelecer ainda mais o papel de E5R, K7R e B14R na modulação imunológica, a geração de vírus MVAΔE5R, MVAΔK7R e/ou MVAΔB14R será estabelecida. O vetor pE5RGFP, o vetor pK7RGFP ou o vetor pB14RGFP serão construídos para inserir um gene específico de interesse (SG) nos loci E5R, K7R ou B14R de MVA. Neste caso, GFP sob o controle do promotor vaccinia P7.5 será usado como um marcador de seleção. Células BHK21 serão infectadas com vírus MVA expressando LacZ a um MOI de 0,05 por 1h, e então serão transfectadas com o DNA de plasmídeo descrito acima. As células infectadas serão coletadas em 48h. Os vírus recombinantes serão identificados por sua fluorescência verde com a inserção de GFP nos loci E5R, K7R ou B14R. Os clones positivos serão purificados em placa 4-5 vezes. A análise de PCR será então realizada para confirmar que os vírus recombinantes MVAΔE5R, MVAΔK7R ou MVAΔB14R perderam o E5R, K7R ou B14R, respectivamente.

Exemplo 20: A infecção por MVAΔE5R, MVAΔK7R ou MVAΔB14R de cDCs induz níveis mais elevados de expressão do gene IFN tipo I do que MVA.

[0616] A infecção por MVA de células dendríticas convencionais (cDCs) mostrou induzir IFN tipo I *por meio de* um mecanismo dependente de cGAS/STING/IRF3. Para testar se E5R, K7R ou B14R desempenha um papel inibidor na indução da via de detecção de DNA citosólico, as respostas imunológicas inatas das DCs derivadas da medula óssea (BMDCs) para MVAΔE5R, MVAΔK7R e/ou MVAΔ B14R em função de MVA serão analisados. Os BMDCs serão infectados com MVAΔE5R, MVAΔK7R, MVAΔB14R ou MVA a um MOI de 10. As células serão coletadas 3h e 6h após a infecção. Os níveis de expressão do gene IFN tipo I serão determinados por análises quantitativas

de PCR. Prevê-se que a infecção por MVAΔE5R, MVAΔK7R ou MVAΔB14R induzirá níveis significativamente mais elevados de expressão do gene IFN tipo I do que MVA em cDCs 3h e 6h após a infecção. Para testar se MVAΔE5R, MVAΔK7R ou MVAΔB14R induzirá níveis mais elevados de ativação do gene IFN tipo I em células imunológicas humanas, as células THP-1 diferenciadas amplamente utilizadas serão empregadas. As células THP-1 serão infectadas com MVAΔE5R, MVAΔK7R, MVAΔB14R ou MVA em um MOI de 10 e, em seguida, serão coletadas 3 horas e 6 horas após a infecção. Prevê-se que a infecção por MVAΔE5R, MVAΔK7R ou MVAΔB14R induzirá níveis mais elevados de expressão do gene IFN tipo I do que MVA em células THP-1. Estes resultados irão indicar que E5R, K7R e/ou B14R são inibidores que antagonizam a via de detecção de DNA citosólico. Consequentemente, estes resultados mostrarão que MVAΔE5R, MVAΔK7R e/ou MVAΔB14R podem ser úteis em métodos de indução da resposta imunológica inata.

Exemplo 21: Geração de uma citocina que produz vírus vaccinia Ankara (MVA) modificado recombinante usando vírus recombinante MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-OX40L como uma estrutura para incluir deleções E5R, K7R e/ou B14R e para expressar IL-2, IL-12, IL-18, IL-15 e/ou IL-21 e seu uso em métodos para o tratamento de tumores sólidos sozinhos ou em combinação com agentes de bloqueio de ponto de verificação imunológico.

[0617] Este exemplo descreve a geração de um vírus MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-OX40L recombinante que expressa os transgenes IL-2, IL-12, IL-18, IL-15 e/ou IL-21 de dentro do gene E5R locus, o locus do gene K7R e/ou o locus do gene B14R e seu uso em métodos para o tratamento de tumores sólidos sozinhos ou em combinação com agentes de bloqueio de ponto de verificação imunológico.

[0618] O vírus recombinante será manipulado de acordo com os métodos de recombinação homóloga descritos nos exemplos anteriores. Por exemplo, os cassetes de expressão serão projetados para expressar IL-2, IL-

12, IL-18, IL-15 e/ou IL-21 usando o promotor precoce e tardio sintético viral de vaccinia (PsE/L) e GFP ou o *Gene de E. coli* xantina-guanina fosforibosil transferase (gpt) sob o controle do promotor P7.5 de vaccinia usado como um marcador de seleção. Os cassetes de expressão serão flanqueados por sequências parciais do gene no qual os cassetes serão inseridos via recombinação homóloga (*por exemplo*, o gene E5R, o gene K7R ou o gene B14R). As células BHK21 serão infectadas com o vírus vaccinia recombinante em uma multiplicidade de infecção (MOI) de 0,05 por 1 h, e então serão transfectadas com os DNAs de plasmídeo descritos acima. As células infectadas foram coletadas em 48 h. Os vírus recombinantes foram selecionados por meio de cultura adicional em meio de seleção gpt incluindo MPA, xantina e hipoxantina, e purificados por placa. A análise de PCR será realizada para verificar se o vírus MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-OX40L carece do gene E5R, o gene K7R e/ou o gene B14R, mas com IL-2, IL-12, IL-18, Inserção de IL-15 e/ou IL-21. A expressão dos transgenes em células B16-F10 murinas e células SK-MEL-28 humanas infectadas com o vírus recombinante será determinada por análise FACS usando o anticorpo apropriado. Prevê-se que a maioria das células B16-F10 e SK-MEL28 murinas expressarão o transgene.

[0619] Um modelo de implantação de tumor bilateral será usado para avaliar a eficácia antitumoral dos vírus recombinantes. Resumidamente, as células de melanoma B16-F10 foram implantadas por via intradermica na pele raspada nos flancos direito ($5x10^5$ células) e esquerdo ($1x10^5$ células) de um camundongo C57BL/6J. Após 7 a 8 dias após a implantação, os camundongos serão injetados duas vezes por semana com: (i) PBS; (ii) intraperitoneal (IP) do vírus MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-OX40L expressando transgenes IL-2, IL-12, IL-18, IL-15 e/ou IL-21 de dentro do locus do gene E5R, o locus do gene K7R e/ou o locus do gene B14R; (iii) intratumoral (IT) do vírus MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-OX40L expressando transgenes IL-2, IL-12, IL-18, IL-15 e/ou IL-21 de dentro do locus do gene E5R, o locus do gene K7R e/ou o locus do gene B14R mais; (iv) intraperitoneal (IP) e intratumoral (IT) do vírus

MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-OX40L expressando transgenes IL-2, IL-12, IL-18, IL-15 e/ou IL-21 de dentro de qualquer o locus do gene E5R, o locus do gene K7R ou o locus do gene B14R; ou (v) intratumoral (IT) do vírus MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-OX40L expressando transgenes IL-2, IL-12, IL-18, IL-15 e/ou IL-21 de dentro do locus do gene E5R, o locus do gene K7R e/ou o locus do gene B14R mais intraperitoneal (IP) do o agente de bloqueio do ponto de verificação reações imunológicas (*por exemplo*, anticorpo anti-PD-L1, anticorpo anti-PD-1, anticorpo anti-CTLA-4) quando os camundongos estão sob anestesia. Os camundongos serão monitorados quanto à sobrevivência e os tamanhos dos tumores serão medidos duas vezes por semana.

[0620] Os resultados deste exemplo irão demonstrar a eficácia antitumoral de vírus MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-OX40L expressando transgenes IL-2, IL-12, IL-18, IL-15, e/ou IL-21 a partir do locus do gene E5R, no locus do gene K7R e/ou no locus do gene B14R. Prevê-se que a administração IP e/ou IT de MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-OX40L expressando transgenes IL-2, IL-12, IL-18, IL-15 e/ou IL-21 de dentro de qualquer o locus do gene E5R, o locus do gene K7R e/ou o locus do gene B14R para camundongos com tumores sólidos irão induzir uma resposta antitumoral, reduzir o tamanho do tumor e/ou aumentar a sobrevivência. Também é antecipado que a administração combinada de vírus MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-OX40L expressando transgenes IL-2, IL-12, IL-18, IL-15 e/ou IL-21 de dentro do gene E5R locus, o locus do gene K7R e/ou o locus do gene B14R e o agente de bloqueio do ponto de verificação imunológico (*por exemplo*, anticorpo anti-PD-L1, anticorpo anti-PD-1, anticorpo anti-CTLA-4) irão induzir uma resposta antitumoral, reduzir o tamanho do tumor e/ou aumentar a sobrevida. É ainda antecipado que a administração combinada de vírus MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-OX40L expressando transgenes IL-2, IL-12, IL-18, IL-15, e/ou IL-21 de dentro do locus gene E5R, o locus do gene K7R e/ou o locus do gene B14R e o agente de bloqueio do ponto de verificação imunológico (*por exemplo*, anticorpo anti-PD-L1, anticorpo anti-PD-1, anticorpo anti-CTLA-4) produzirão efeitos sinérgicos a este respeito em

comparação com a administração de vírus MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-OX40L expressando transgenes IL-2, IL-12, IL-18, IL-15 e/ou IL-21 de dentro do locus do gene E5R, o Locus do gene K7R e/ou o locus do gene B14R ou terapia de bloqueio do ponto de verificação imunológico sozinho.

[0621] Consequentemente, este exemplo demonstra que composições da presente tecnologia compreendendo vírus MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-OX40L recombinante que expressam transgenes IL-2, IL-12, IL-18, IL-15 e/ou IL-21 de dentro do locus do gene E5R, o locus do gene K7R e/ou o locus do gene B14R sozinho ou em combinação com agentes de bloqueio de ponto de verificação imunológico são úteis em métodos para o tratamento de tumores sólidos.

Exemplo 22: Geração de vírus vaccinia recombinante com deleção de E5R, K7R ou B14R (VACVΔE5R, VACVΔK7R, ou VACVΔB14R).

[0622] O vetor PC7LGFP vai ser utilizado para inserir GFP sob o controle do promotor de vaccinia P7.5 no loci de E5R, K7R, ou B14R do vírus da vaccinia (VACV). O cassete de expressão será flanqueado pela sequência parcial das regiões de flanco E5R, K7R ou B14R em cada lado. As células BSC40 serão infectadas com o vírus vaccinia WT expressando a um MOI de 0,05 por 1h, e então serão transfectadas com o DNA de plasmídeo descrito acima. As células infectadas serão coletadas em 48h. Os vírus recombinantes serão identificados por sua fluorescência verde com a inserção de GFP nos loci E5R, K7R ou B14R. Os clones positivos serão então purificados em placa 4-5 vezes em células BSC40. A análise de PCR será realizada para confirmar que os vírus recombinantes de VACVΔE5R, VACVΔK7R ou VACVΔB14R perderam o E5R, K7R ou B14R, respectivamente.

[0623] Para determinar se um dentre E5R, K7R ou B14R é um fator de virulência e se VACVΔE5R, VACVΔK7R ou VACVΔB14R é altamente atenuado em comparação com WT VACV, um modelo de infecção intranasal murino será empregado. A perda de peso em camundongos C57BL/6J após infecção intranasal com várias doses de WT VACV será comparada à

observada em C57BL/6J após infecção com VACVΔE5R, VACVΔK7R ou VACVΔB14R.

Exemplo 23: Geração de um vírus vaccinia recombinante com uma deleção TK, interrupção do gene E3L, deleção C7 e expressão de hFlt3L, anti-CTLA-4 e OX40L (VACVΔE3L83N-hFlt3L-anti-CTLA-4-ΔC7L-OX40L) e seu uso em métodos para o tratamento de tumores sólidos sozinhos ou em combinação com agentes de bloqueio de ponto de verificação imunológico.

[0624] Este exemplo descreve a geração de um vírus vaccinia E3LΔ83N recombinante compreendendo uma deleção TK, uma deleção C7 e expressando um anticorpo que visa especificamente o antígeno 4 de linfócito T citotóxico (anti-CTLA-4), hFlt3L e OX40L e seu uso em métodos para o tratamento de tumores sólidos sozinhos ou em combinação com agentes de bloqueio de ponto de verificação imunológico.

[0625] O vírus é gerado usando plasmídeos contendo cassetes de expressão projetados para expressar um ou mais genes específicos de interesse (SG) (*por exemplo*, anti-CTLA-4, OX40L, hFtl3L). Os cassetes de expressão serão projetados para expressar anti-CTLA-4, OX40L, e/ou hFtl3L usando o promotor precoce e tardio sintético viral de vaccinia (PsE/L) e GFP ou o *Gene de E. coli* xantina-guanina fosforibosil transferase (gpt) sob o controle do promotor P7.5 de vaccinia usado como um marcador de seleção. Por exemplo, um cassete de expressão é flanqueado por uma sequência parcial de C8L e C6R no lado esquerdo e direito do gene C7L para inserção de um ou mais genes específicos de interesse no locus C7 por meio de recombinação homóloga. Um cassete de expressão pode ser flanqueado pelo gene da timidina quinase (TK) em ambos os lados (TK-L, TK-R) para inserção de um ou mais genes específicos de interesse no locus TK via recombinação homóloga. As células BHK21 serão infectadas com o vírus vaccinia recombinante em uma multiplicidade de infecção (MOI) de 0,05 por 1 h, e então serão transfectadas com os DNAs de plasmídeo descritos acima. As células infectadas foram

coletadas em 48 h. Os vírus recombinantes foram selecionados por meio de cultura adicional em meio de seleção incluindo MPA, xantina e hipoxantina, e purificados por placa. A análise de PCR foi realizada para verificar que VACVΔE3L83N-hFlt3L-anti-CTLA-4-ΔC7L-OX40L carece do gene C7L e parte do gene TK, mas com inserção de hFlt3L, anti-CTLA-4, e OX40L. A expressão de OX40L em células B16-F10 murino e células SK-MEL-28 humanas infectadas com o vírus VACVΔE3L83N-hFlt3L-anti-CTLA-4-ΔC7L-OX40L foi determinada por análise de FACS usando anticorpo anti-OX40L. Prevê-se que a maioria das células B16-F10 e SK-MEL28 murinas expressarão OX40L.

[0626] Um modelo de implantação de tumor bilateral será usado para avaliar a eficácia antitumoral dos vírus recombinantes. Resumidamente, as células de melanoma B16-F10 foram implantadas por via intradermica na pele raspada nos flancos direito ($5x10^5$ células) e esquerdo ($1x10^5$ células) de um camundongo C57BL/6J. Após 7 a 8 dias após a implantação, os camundongos serão injetados duas vezes por semana com: (i) PBS; (ii) intraperitoneal (IP) de VACVΔE3L83N-hFlt3L-anti-CTLA-4-ΔC7L-OX40L; (iii) intratumoral (IT) de VACVΔE3L83N-hFlt3L-anti-CTLA-4-ΔC7L-OX40L; (iv) intraperitoneal (IP) e intratumoral (IT) VACVΔE3L83N-hFlt3L-anti-CTLA-4-ΔC7L-OX40L; ou (v) intratumoral (IT) de VACVΔE3L83N-hFlt3L-anti-CTLA-4-ΔC7L-OX40L mais intraperitoneal (IP) de agente de bloqueio de ponto de verificação imunológico (*por exemplo*, anticorpo anti-PD-L1, anticorpo anti-PD-1, anti-CTLA -4 anticorpo) quando os camundongos estão sob anestesia. Os camundongos são monitorados quanto à sobrevivência e os tamanhos dos tumores são medidos duas vezes por semana.

[0627] Os resultados deste exemplo irão demonstrar a eficácia antitumoral de VACVΔE3L83N-hFlt3L-anti-CTLA-4-ΔC7L-OX40L. Prevê-se que a administração IP e/ou IT de VACVΔE3L83N-hFlt3L-anti-CTLA-4-ΔC7L-OX40L a camundongos com tumores sólidos induzirá uma resposta antitumoral, reduzirá o tamanho do tumor e/ou aumentará a sobrevida. Também é antecipado que a administração combinada de VACVΔE3L83N-

hFlt3L-anti-CTLA-4-ΔC7L-OX40L e agente de bloqueio de ponto de verificação imunológico (*por exemplo*, anticorpo anti-PD-L1, anticorpo anti-PD-1, anticorpo anti-CTLA-4) irá induzir uma resposta antitumoral, reduzir o tamanho do tumor e/ou aumentar a sobrevida. É ainda antecipado que a administração combinada de VACVΔE3L83N-hFlt3L-anti-CTLA-4-ΔC7L-OX40L e agente de bloqueio de ponto de verificação imunológico (*por exemplo*, anticorpo anti-PD-L1, anticorpo anti-PD-1, anticorpo anti-CTLA-4) produzirá efeitos sinérgicos a este respeito em comparação com a administração de VACVΔE3L83N-hFlt3L-anti-CTLA-4-ΔC7L-OX40L ou terapia de bloqueio de ponto de verificação imunológico sozinha.

[0628] Por conseguinte, este exemplo demonstra que as composições da presente tecnologia compreendendo o vírus VACVΔE3L83N-hFlt3L-anti-CTLA-4-ΔC7L-OX40L recombinante sozinho ou em combinação com agentes de bloqueio de ponto de verificação imunológico são úteis em métodos para o tratamento de tumores sólidos.

Exemplo 24: Geração de vírus vaccinia recombinante produtor de citocinas usando vírus VACV∆E3L83N-hFlt3L-antiCTLA-4-∆C7L-OX40L recombinante como uma estrutura para inserir IL-2, IL-12, IL-18, IL-15 e/ou IL- 21 no locus E5R, K7R e/ou B14R e seu uso em métodos para o tratamento de tumores sólidos isoladamente ou em combinação com agentes de bloqueio de ponto de verificação imunológico.

[0629] Este exemplo descreve a geração de um vírus VACVΔE3L83N-hFlt3L-anti-CTLA-4-ΔC7L-OX40L recombinante que expressa os transgenes IL-2, IL-12, IL-18, IL-15 e/ou IL-21 de dentro do gene E5R locus, o locus do gene K7R e/ou o locus do gene B14R e seu uso em métodos para o tratamento de tumores sólidos sozinhos ou em combinação com agentes de bloqueio de ponto de verificação imunológico.

[0630] O vírus recombinante será manipulado de acordo com os métodos de recombinação homóloga descritos nos exemplos anteriores. Por exemplo, os cassetes de expressão serão projetados para expressar IL-2, IL-

12, IL-18, IL-15 e/ou IL-21 usando o promotor precoce e tardio sintético viral de vaccinia (PsE/L) e GFP ou o *Gene de E. coli* xantina-guanina fosforibosil transferase (gpt) sob o controle do promotor P7.5 de vaccinia usado como um marcador de seleção. Os cassetes de expressão serão flanqueados por sequências parciais do gene no qual os cassetes serão inseridos via recombinação homóloga (*por exemplo*, o gene E5R, o gene K7R ou o gene B14R). As células BHK21 serão infectadas com o vírus vaccinia recombinante em uma multiplicidade de infecção (MOI) de 0,05 por 1 h, e então serão transfectadas com os DNAs de plasmídeo descritos acima. As células infectadas foram coletadas em 48 h. Os vírus recombinantes foram selecionados por meio de cultura adicional em meio de seleção gpt incluindo MPA, xantina e hipoxantina, e purificados por placa. A análise de PCR será realizada para verificar se o vírus VVACVΔE3L83N-hFlt3L-anti-CTLA-4-ΔC7L-OX40L carece do gene E5R, o gene K7R e/ou o gene B14R, mas com IL-2, IL-12, IL-18, Inserção de IL-15 e/ou IL-21. A expressão dos transgenes em células B16-F10 murinas e células SK-MEL-28 humanas infectadas com o vírus recombinante será determinada por análise FACS usando o anticorpo apropriado. Prevê-se que a maioria das células B16-F10 e SK-MEL28 murinas expressarão o transgene.

[0631] Um modelo de implantação de tumor bilateral será usado para avaliar a eficácia antitumoral dos vírus recombinantes. Resumidamente, as células de melanoma B16-F10 foram implantadas por via intradermica na pele raspada nos flancos direito ($5x10^5$ células) e esquerdo ($1x10^5$ células) de um camundongo C57BL/6J. Após 7 a 8 dias após a implantação, os camundongos serão injetados duas vezes por semana com: (i) PBS; (ii) intraperitoneal (IP) do vírus VACVΔE3L83N-hFlt3L-anti-CTLA-4-ΔC7L-OX40LL expressando transgenes IL-2, IL-12, IL-18, IL-15 e/ou IL-21 de dentro do locus do gene E5R, o locus do gene K7R e/ou o locus do gene B14R; (iii) intratumoral (IT) do vírus VACVΔE3L83N-hFlt3L-anti-CTLA-4-ΔC7L-OX40L expressando transgenes IL-2, IL-12, IL-18, IL-15 e/ou IL-21 de dentro do locus

do gene E5R, o locus do gene K7R e/ou o locus do gene B14R mais; (iv) intraperitoneal (IP) e intratumoral (IT) do vírus VACVΔE3L83N-hFlt3L-anti-CTLA-4-ΔC7L-OX40LL expressando transgenes IL-2, IL-12, IL-18, IL-15 e/ou IL-21 de dentro de qualquer o locus do gene E5R, o locus do gene K7R ou o locus do gene B14R; ou (v) intratumoral (IT) do vírus VACVΔE3L83N-hFlt3L-anti-CTLA-4-ΔC7L-OX40L expressando transgenes IL-2, IL-12, IL-18, IL-15 e/ou IL-21 de dentro do locus do gene E5R, o locus do gene K7R e/ou o locus do gene B14R mais intraperitoneal (IP) do o agente de bloqueio do ponto de verificação reações imunológicas (*por exemplo*, anticorpo anti-PD-L1, anticorpo anti-PD-1, anticorpo anti-CTLA-4) quando os camundongos estão sob anestesia. Os camundongos são monitorados quanto à sobrevivência e os tamanhos dos tumores são medidos duas vezes por semana.

[0632] Os resultados deste exemplo irão demonstrar a eficácia antitumoral de vírus VACVΔE3L83N-hFlt3L-anti-CTLA-4-ΔC7L-OX40L expressando transgenes IL-2, IL-12, IL-18, IL-15, e/ou IL-21 a partir do locus do gene E5R, no locus do gene K7R e/ou no locus do gene B14R. Prevê-se que a administração IP e/ou IT de VACVΔE3L83N-hFlt3L-anti-CTLA-4-ΔC7L-OX40L expressando transgenes IL-2, IL-12, IL-18, IL-15 e/ou IL-21 de dentro de qualquer o locus do gene E5R, o locus do gene K7R e/ou o locus do gene B14R para camundongos com tumores sólidos irão induzir uma resposta antitumoral, reduzir o tamanho do tumor e/ou aumentar a sobrevivência. Também é antecipado que a administração combinada de vírus VACVΔE3L83N-hFlt3L-anti-CTLA-4-ΔC7L-OX40L expressando transgenes IL-2, IL-12, IL-18, IL-15 e/ou IL-21 de dentro do gene E5R locus, o locus do gene K7R e/ou o locus do gene B14R e o agente de bloqueio do ponto de verificação imunológico (*por exemplo*, anticorpo anti-PD-L1, anticorpo anti-PD-1, anticorpo anti-CTLA-4) irão induzir uma resposta antitumoral, reduzir o tamanho do tumor e/ou aumentar a sobrevida. É ainda antecipado que a administração combinada de vírus VACVΔE3L83N-hFlt3L-anti-CTLA-4-ΔC7L-OX40L expressando transgenes IL-2, IL-12, IL-18, IL-15, e/ou IL-21 de dentro do locus

gene E5R, o locus do gene K7R e/ou o locus do gene B14R e o agente de bloqueio do ponto de verificação imunológico (*por exemplo*, anticorpo anti-PD-L1, anticorpo anti-PD-1, anticorpo anti-CTLA-4) produzirão efeitos sinérgicos a este respeito em comparação com a administração de vírus VACVΔE3L83N-hFlt3L-anti-CTLA-4-ΔC7L-OX40L expressando transgenes IL-2, IL-12, IL-18, IL-15 e/ou IL-21 de dentro do locus do gene E5R, o Locus do gene K7R e/ou o locus do gene B14R ou terapia de bloqueio do ponto de verificação imunológico sozinho.

[0633] Consequentemente, este exemplo demonstra que composições da presente tecnologia compreendendo vírus VACVΔE3L83N-hFlt3L-anti-CTLA-4-ΔC7L-OX40L recombinante que expressam transgenes IL-2, IL-12, IL-18, IL-15 e/ou IL-21 de dentro do locus do gene E5R, o locus do gene K7R e/ou o locus do gene B14R sozinho ou em combinação com agentes de bloqueio de ponto de verificação imunológico são úteis em métodos para o tratamento de tumores sólidos.

Exemplo 25: Geração de um vírus vaccinia mutante C7L recombinante com uma deleção de TK e expressando hFlt3L e OX40L (VACVΔC7L-TK(-)-hFlt3L-OX40L) e seu uso em métodos para o tratamento de tumores sólidos isoladamente ou em combinação com agentes de bloqueio de ponto de verificação imunológico.

[0634] Este exemplo descreve a geração de um vírus VACVΔC7L-TK(-)-hFlt3L-OX40L recombinante e seu uso em métodos para o tratamento de tumores sólidos isoladamente ou em combinação com agentes de bloqueio de ponto de verificação imunológico.

[0635] O vírus é gerado usando plasmídeos contendo cassetes de expressão projetados para expressar um ou mais genes específicos de interesse (SG) (*por exemplo*, OX40L, hFtl3L). Os cassetes de expressão serão projetados para expressar OX40L e/ou hFtl3L usando o promotor precoce e tardio sintético viral de vaccinia (PsE/L) e GFP ou o *Gene de E. coli* xantina-guanina fosforibosil transferase (gpt) sob o controle do promotor P7.5 de

vaccinia usado como um marcador de seleção. Por exemplo, um cassete de expressão é flanqueado por uma sequência parcial de C8L e C6R no lado esquerdo e direito do gene C7L para inserção de um ou mais genes específicos de interesse (*por exemplo*, hFlt3L) no locus C7 por meio de recombinação homóloga. Um cassete de expressão pode ser flanqueado pelo gene da timidina quinase (TK) em ambos os lados (TK-L, TK-R) para inserção de um ou mais genes específicos de interesse (*por exemplo*, OX40L) no locus TK via recombinação homóloga. As células BHK21 serão infectadas com o vírus vaccinia recombinante em uma multiplicidade de infecção (MOI) de 0,05 por 1 h, e então serão transfectadas com os DNAs de plasmídeo descritos acima. As células infectadas foram coletadas em 48 h. Os vírus recombinantes foram selecionados por meio de cultura adicional em meio de seleção incluindo MPA, xantina e hipoxantina, e purificados por placa. A análise de PCR foi realizada para verificar que VACVΔC7L-TK(-)-hFlt3L-OX40L carece do gene C7L e parte do gene TK, mas com inserção de hFlt3L e OX40L. A expressão de OX40L e hFlt3L em células B16-F10 murino e células SK-MEL-28 humanas infectadas com o vírus VACVΔC7L-TK(-)-hFlt3L-OX40L foi determinada por análise de FACS usando anticorpo anti-OX40L e anti-hFlt3L. Prevê-se que as células B16-F10 e SK-MEL28 murinas expressarão OX40L e hFlt3L.

[0636] Um modelo de implantação de tumor bilateral será usado para avaliar a eficácia antitumoral dos vírus recombinantes. Resumidamente, as células de melanoma B16-F10 foram implantadas por via intradermica na pele raspada nos flancos direito ($5x10^5$ células) e esquerdo ($1x10^5$ células) de um camundongo C57BL/6J. Após 7 a 8 dias após a implantação, os camundongos serão injetados duas vezes por semana com: (i) PBS; (ii) intraperitoneal (IP) de VACVΔC7L-TK(-)-hFlt3L-OX40L; (iii) intratumoral (IT) de VACVΔC7L-TK(-)-hFlt3L-OX40L; (iv) intraperitoneal (IP) e intratumoral (IT) VACVΔC7L-TK(-)-hFlt3L-OX40L; ou (v) intratumoral (IT) de VACVΔC7L-TK(-)-hFlt3L-OX40L mais intraperitoneal (IP) de agente de bloqueio de ponto de verificação imunológico (*por exemplo*, anticorpo anti-PD-L1, anticorpo anti-PD-

1, anti-CTLA -4 anticorpo) quando os camundongos estão sob anestesia. Os camundongos são monitorados quanto à sobrevivência e os tamanhos dos tumores são medidos duas vezes por semana.

[0637] Os resultados deste exemplo irão demonstrar a eficácia antitumoral do vírus VACVΔC7L-TK(-)-hFlt3L-OX40L. Prevê-se que a administração IP e/ou IT de VACVΔC7L-TK(-)-hFlt3L-OX40L a camundongos com tumores sólidos induzirá uma resposta antitumoral, reduzirá o tamanho do tumor e/ou aumentará a sobrevida. Também é antecipado que a administração combinada de VACVΔC7L-TK(-)-hFlt3L-OX40L e agente de bloqueio de ponto de verificação imunológico (*por exemplo*, anticorpo anti-PD-L1, anticorpo anti-PD-1, anticorpo anti-CTLA-4) irá induzir uma resposta antitumoral, reduzir o tamanho do tumor e/ou aumentar a sobrevida. É ainda antecipado que a administração combinada de vírus VACVΔC7L-TK(-)-hFlt3L-OX40L e agente de bloqueio de ponto de verificação imunológico (*por exemplo*, anticorpo anti-PD-L1, anticorpo anti-PD-1, anticorpo anti-CTLA-4) produzem efeitos sinérgicos a este respeito em comparação com a administração de vírus VACVΔC7L-TK(-)-hFlt3L-OX40L ou terapia de bloqueio de ponto de verificação imunológico sozinha.

[0638] Por conseguinte, este exemplo demonstra que as composições da presente tecnologia compreendendo o vírus VACVΔC7L-TK(-)-hFlt3L-OX40L recombinante sozinho ou em combinação com agentes de bloqueio de ponto de verificação imunológico são úteis em métodos para o tratamento de tumores sólidos.

Exemplo 26: Geração de um vírus vaccinia mutante C7L recombinante com uma deleção de TK e expressando anti-CTLA-4, hFlt3L, OX40L e hIL-12 (VACVΔC7L-anti-CTLA-4-TK(-)-hFlt3L-OX40L-hIL-12) e seu uso em métodos para o tratamento de tumores sólidos sozinhos ou em combinação com agentes de bloqueio de ponto de verificação imunológico.

[0639] Este exemplo descreve a geração de um- -12 vírus VACVΔC7L-TK(-)-anti-CTLA-4-TK(-)-hFlt3L-OX40L-hIL-12 recombinante e seu uso em métodos para o tratamento de tumores sólidos isoladamente ou em combinação com agentes de bloqueio de ponto de verificação imunológico.

[0640] O vírus recombinante será manipulado de acordo com os métodos de recombinação homóloga descritos nos exemplos anteriores. Por exemplo, os cassetes de expressão serão projetados para expressar anti-CTLA-4, hFlt3L, OX40L, e/ou hIL-12 usando o promotor precoce e tardio sintético viral de vaccinia (PsE/L) e GFP ou o *Gene de E. coli* xantina-guanina fosforibosil transferase (gpt) sob o controle do promotor P7.5 de vaccinia usado como um marcador de seleção. Os cassetes de expressão serão flanqueados por sequências parciais do gene no qual os cassetes serão inseridos via recombinação homóloga (*por exemplo*, o gene C7, o gene TK ou qualquer outro gene viral de vaccinia adequado). As células BHK21 serão infectadas com o vírus vaccinia recombinante em uma multiplicidade de infecção (MOI) de 0,05 por 1 h, e então serão transfectadas com os DNAs de plasmídeo descritos acima. As células infectadas foram coletadas em 48 h. Os vírus recombinantes foram selecionados por meio de cultura adicional em meio de seleção incluindo MPA, xantina e hipoxantina, e purificados por placa. A análise de PCR é realizada para verificar se VACVΔC7L-TK(-)-anti-CTLA-4-TK(-)-hFlt3L-OX40L-hIL-12 carece do gene C7L e parte do gene TK, mas com transgenes anti-CTLA-4, inserção de hFlt3L, OX40L e hIL-12. A expressão de transgenes em células B16-F10 murinas e células SK-MEL-28 humanas infectadas com vírus VACVΔC7L-TK(-)-anti-CTLA-4-TK(-)-hFlt3L-OX40L-hIL-12 é determinada por

FACS análise usando os anticorpos apropriados. Prevê-se que as células B16-F10 e SK-MEL28 murinas expressarão o transgene.

[0641] Um modelo de implantação de tumor bilateral será usado para avaliar a eficácia antitumoral dos vírus recombinantes. Resumidamente, as células de melanoma B16-F10 foram implantadas por via intradermica na pele raspada nos flancos direito ($5x10^5$ células) e esquerdo ($1x10^5$ células) de um camundongo C57BL/6J. Após 7 a 8 dias após a implantação, os camundongos serão injetados duas vezes por semana com: (i) PBS; (ii) intraperitoneal (IP) de VACVΔC7L-TK(-)-anti-CTLA-4-TK(-)-hFlt3L-OX40L-hIL-12; (iii) intratumoral (IT) de VACVΔC7L-TK(-)-anti-CTLA-4-TK(-)-hFlt3L-OX40L-hIL-12; (iv) intraperitoneal (IP) e intratumoral (IT) VACVΔC7L-TK(-)-anti-CTLA-4-TK(-)-hFlt3L-OX40L-hIL-12; ou (v) intratumoral (IT) de VACVΔC7L-TK(-)-anti-CTLA-4-TK(-)-hFlt3L-OX40L-hIL-12 mais intraperitoneal (IP) de agente de bloqueio de ponto de verificação imunológico (*por exemplo*, anticorpo anti-PD-L1, anticorpo anti-PD-1) quando os camundongos estão sob anestesia. Os camundongos são monitorados quanto à sobrevivência e os tamanhos dos tumores são medidos duas vezes por semana.

[0642] Os resultados deste exemplo irão demonstrar a eficácia anti-tumoral do vírus VACVΔC7L-TK(-)-anti-CTLA-4-TK(-)-hFlt3L-OX40L-hIL-12. Prevê-se que a administração IP e/ou IT de VACVΔC7L-TK(-)-anti-CTLA-4-TK(-)-hFlt3L-OX40L-hIL-12 a camundongos com tumores sólidos induzirá uma resposta antitumoral, reduzirá o tamanho do tumor e/ou aumentará a sobrevida. Também é antecipado que a administração combinada de VACVΔC7L-TK(-)-anti-CTLA-4-TK(-)-hFlt3L-OX40L-hIL-12 e agente de bloqueio de ponto de verificação imunológico (*por exemplo*, anticorpo anti-PD-L1, anticorpo anti-PD-1) irá induzir uma resposta antitumoral, reduzir o tamanho do tumor e/ou aumentar a sobrevida. É ainda antecipado que a administração combinada de vírus VACVΔC7L-TK(-)-anti-CTLA-4-TK(-)-hFlt3L-OX40L-hIL-12 e agente de bloqueio de ponto de verificação imunológico (*por exemplo*, anticorpo anti-PD-L1, anticorpo anti-PD-1) produzem efeitos sinérgicos a este

respeito em comparação com a administração de vírus VACVΔC7L-TK(-)-anti-CTLA-4-TK(-)-hFlt3L-OX40L-hIL-12 ou terapia de bloqueio de ponto de verificação imunológico sozinha.

[0643] Por conseguinte, este exemplo demonstra que as composições da presente tecnologia compreendendo o vírus VACVΔC7L-TK(-)-anti-CTLA-4-TK(-)-hFlt3L-OX40L-hIL-12 recombinante sozinho ou em combinação com agentes de bloqueio de ponto de verificação imunológico são úteis em métodos para o tratamento de tumores sólidos.

Exemplo 27: Co-administração de MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L com o antígeno modelo, ovalbumina de galinha (OVA), aumenta a geração de células $CD8^+$ e $CD4^+$ T específicas de OVA no baço e nos linfonodos de drenagem (dLNs), e Anticorpos IgG anti-OVA no soro em camundongos imunizados.

[0644] Este exemplo irá demonstrar que MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L pode atuar como um adjuvante de vacina para aumentar a apresentação de antígeno por células dendríticas (DCs). Os camundongos são imunizados por via subcutânea (SC) com OVA (10 μg) com ou sem MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L ($1x10^7$ pfu) duas vezes, com 2 semanas de intervalo. Os camundongos são sacrificados 1 semana após a segunda vacinação, com baços, drenagem de nódulos linfáticos (dLNs) e sangue subsequentemente coletado para avaliação de células T específicas de OVA e anticorpos. Para determinar as respostas de células anti-OVA $CD8^+$ T, os esplenócitos (500.000 células) são incubados com o peptídeo OVA 257-264 (SIINFEKL) (SEQ ID NO: 15), que é um epítopo de peptídeo restrito ao MHC classe I (K^b)de OVA, por 12h antes de serem corados para anticorpos anti-CD8 e anti-IFN-γ. Para testar as respostas de células anti-OVA $CD4^+$ T, os esplenócitos (500.000 células) são incubados com o peptídeo OVA 323-339 (ISQAVHAAHAEINEAGR) (SEQ ID NO: 16), que é um epítopo de peptídeo restrito ao MHC classe II I-A^d-, por 12h antes de serem corados para anticorpos anti-CD4 e anti-IFN-γ. Prevê-se que a co-administração de MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L com OVA SC

resulte no aumento de células anti-OVA IFN- γ $^{+}CD8^{+}$ T e células anti-OVA IFN- γ $^{+}CD4^{+}$ T nos baços em comparação com OVA sozinho.

[0645] Uma indução similar de células anti-OVA IFN- γ $^{+}CD8^{+}$ T e células anti-OVA IFN- γ $^{+}CD8^{+}$ T após SC de OVA mais MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L é prevista para ser observada em os dLNs. Resumidamente, suspensões de células únicas são geradas a partir de dLNs e 500.000 células são incubadas com peptídeos OVA 257-264 ou OVA 323-339. Prevê-se ainda que a administração combinada de MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L e Heat-iMVA com OVA produzirá efeitos sinérgicos a este respeito em comparação com a administração de MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L com OVA sozinho.

Exemplo 28: MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L é superior ao Adjuvante Completo de Freund (CFA) na geração de respostas de células $CD8^{+}$ e $CD4^{+}$ T específicas para o antígeno.

[0646] Adjuvante completo de Freund (CFA) *compreende Mycobacterium tuberculosis* morto por calor em óleos não metabolizáveis (óleo de parafina e monooleato de manida). Ele também contém ligantes para TLR2, TLR4 e TLR9. A injeção de antígeno com CFA induz uma resposta imunológica dominante Th1. O uso de CFA em humanos é atualmente inadmissível devido ao seu perfil de toxicidade, e seu uso em animais é limitado às vias subcutânea ou intraperitoneal devido a reações dolorosas e riscos de dano ao tecido no local da injeção. Para testar se MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L é superior ao CFA, os camundongos são vacinados por via subcutânea com antígeno OVA mais MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L ou OVA mais CFA duas vezes, 2 semanas de intervalo e, posteriormente, baços coletados, dLNs e sangue são coletados para respostas de células anti-OVA $CD8^{+}$ e $CD4^{+}$ T e anticorpos anti-OVA., conforme descrito no Exemplo 27.

[0647] Prevê-se que a co-administração subcutânea de OVA com MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L irá induzir níveis mais elevados de células $CD8^{+}$ e $CD4^{+}$ T específicas do antígeno em comparação com a imunização com OVA mais CFA nos baços de camundongos vacinados.

Exemplo 29: MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L é superior a poli I: C ou agonista de STING na geração de respostas de células CD8$^+$ e CD4$^+$ T específicas para o antígeno.

[0648] Poli IC e agonista de STING são ativadores reações imunológicass inatos que foram investigados como adjuvantes de vacinas. Para testar se MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L é superior ao Poli IC e agonista de STING, os camundongos são vacinados por via subcutânea com antígeno OVA mais MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L ou OVA mais Poli IC e agonista de STING duas vezes, 2 semanas de intervalo e, posteriormente, baços coletados, dLNs e sangue são coletados para respostas de células anti-OVA CD8+ e CD4+ T e anticorpos anti-OVA., conforme descrito no Exemplo 27.

[0649] Prevê-se que a co-administração subcutânea de OVA com MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L irá induzir níveis mais elevados de células CD8+ e CD4+ T específicas do antígeno em comparação com a imunização com OVA mais Poli IC e agonista de STING nos baços de camundongos vacinados.

Exemplo 30: A escarificação da pele com MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L-OVA gera células T CD8 + e CD4 + específicas de OVA mais fortes e anticorpos em comparação com MVA-OVA.

[0650] O MVA é um vetor de vacina altamente atenuado, não replicativo, seguro e eficaz para vários agentes infecciosos e cânceres. A dosagem ideal para a vacinação com MVA é testada *por meio de* escarificação da pele. MVA-OVA (que codifica o comprimento total de OVA sob o controle do promotor P7.5) ou MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L-OVAem doses de 10^5, 10^6 e 10^7 pfu são administrados as caudas de camundongos C57BL/6J fêmeas de 6-8 semanas de idade após escarificação da pele. Uma semana após a vacinação, os camundongos são sacrificados e os baços são isolados para testar respostas de células CD8$^+$ T específicas ao antígeno. DCs derivadas da medula óssea (BMDCs) são infectados com MVA-OVA em MOI de 5 por 1h e, em seguida, incubados por 5h antes de os BMDCs serem incubados com

esplenócitos por 12h. As células são processadas para coloração de citocina intracelular (ICS) para células IFN-γ^+CD8^+ T. Alternativamente, os BMDCs são incubados com o peptídeo SIINFEKL (SEQ ID NO: 15) por 1h e depois incubado com esplenócitos por 12 h. ICS é realizado para células IFN-γ^+CD8^+ T reativas ao peptídeo SIINFEKL (SEQ ID NO: 15).

[0651] Para testar se as DCs dependentes de STING ou Batf3, OX40 desempenha um papel nos efeitos de vacinação induzida por MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L-OVA, MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L-OVA em uma dose de 10^6 pfu também é administrado às caudas de camundongos $STING^{Gt/Gt}$, ou $Batf3^{-/-}$, ou $OX40^{-/-}$após a escarificação da pele. Prevê-se que este exemplo demonstrará que MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L-OVA é um vetor de vacina melhorado em comparação com MVA-OVA, e sua função requer STING, DCs dependentes de Batf3 e interação OX40-OX40L.

Exemplo 31: MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L induz a expressão de MHC-I de células dendríticas derivadas de medula óssea cultivadas por GM-CSF (BMDCs), mas não aumenta a fagocitose do antígeno.

[0652] Infecção de BMDCs com MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L induz a maturação de DC que é dependente da via de detecção de DNA citosólica mediada por STING (Dai et al., *Science Immunology* 2017). Neste exemplo, a indução da expressão de MHC-I na superfície celular de BMDCs por MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L é comparada com poli I: C. Os BMDCs são incubados com OVA na presença ou ausência de MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L por 3 ou 16 h, ou com poli IC por 16h. O MHC-I da superfície celular (H-$2K^b$) a expressão é determinada por FACS usando anticorpo anti-H-$2K^b$. Prevê-se que a co-incubação com MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L aumentará a expressão da superfície celular de H-$2K^b$. Prevê-se que os resultados demonstrarão que MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L é um indutor mais forte da expressão de MHC-I em BMDCs em comparação com poli IC.

[0653] Para avaliar se a capacidade dos BMDCs para a absorção do antígeno de modelo marcado com fluorescência OVA (OVA-647) é afetada pelo

tratamento MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L, os BMDCs são infectados com MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L (MOI de 1) por 1h e depois incubado com OVA-647 por 1 h. As intensidades de fluorescência de OVA-647 fagocitado em BMDC são medidas por citometria de fluxo. Prevê-se que os resultados desta experiência demonstrarão que embora os MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L sofram maturação, a sua capacidade de fagocitar o antígeno é reduzida como consequência da maturação.

Exemplo 32: A co-incubação de BMDCs cultivados com GM-CSF com MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L e OVA aumenta a proliferação de células OT-I e OT-II T *in vitro*.

[0654] A infecção de células dendríticas epidérmicas com vaccinia WT viva inibe a capacidade das DCs de ativar células T específicas do antígeno (Deng et al., JVI, 2006). Para testar se a infecção por MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L de BMDCs aumenta a proliferação de células OT-I e OT-II T específicas do antígeno, os BMDCs são incubados com OVA em várias concentrações na presença ou ausência de MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L por 3 h. As células são lavadas para remover OVA ou vírus não absorvidos e, em seguida, co-cultivadas com células OT-I T marcadas com Carboxifluoresceína Diacetato Succinimidil (CFSE) por 3 dias (BMDC: células OT-I T=1: 5). A citometria de fluxo é aplicada para medir as intensidades CFSE de células OT-I. Prevê-se que a pré-incubação com MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L aumentará a capacidade das DCs de estimular a proliferação de células OT-I T, conforme indicado pela diluição de CSFE em células em divisão. Também é antecipado que o pré-tratamento com MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L ou poli IC aumenta a capacidade das DCs de estimular a proliferação de células OT-II T que reconhecem o antígeno OVA apresentado pelo MHC-II nas DCs. Prevê-se ainda que a administração combinada de MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L e Heat-iMVA produzirá efeitos sinérgicos a este respeito em comparação com a administração de MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L sozinho.

Exemplo 33: A co-incubação de BMDCs cultivados com Flt3L com MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L e OVA aumenta a proliferação de células OT-I T *in vitro*.

[0655] Ligante de tirosina quinase 3 similar a FMS (Flt3L) é um fator de crescimento crítico para a diferenciação de CD103 $^{+}$/CD8 dependente de Batf3^{+} DCs e DCs plasmocitoides (pDCs). Os BMDCs cultivados com Flt3L são pulsados com OVA na presença ou ausência de MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L e, em seguida, co-cultivados com células OT-I marcadas com CFSE por 3 dias (BMDC: OT-I=1: 5). A citometria de fluxo é aplicada para medir as intensidades CFSE de células OT-I. Prevê-se que MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40Lestimulará a proliferação de células OT-I, que reconhece o peptídeo $OVA_{257-264}$ (SIINFEKL) (SEQ ID NO: 15) apresentado no MHC-I, mesmo em concentrações muito baixas de OVA. Prevê-se ainda que a administração combinada de MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L e Heat-iMVA produzirá efeitos sinérgicos a este respeito em comparação com a administração de MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L sozinho.

Exemplo 34: As células dendríticas plasmocitóides (pDCs) desempenham um papel importante nos efeitos adjuvantes da vacina mediados por MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L.

[0656] As DCs plasmocitóides (pDCs) podem apresentar antígenos de forma cruzada para estimular as respostas das células CD8^{+} T. Para testar se os pDCs desempenham um papel no efeito adjuvante mediado por MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L *in vivo*, o anticorpo anti-PDCA-1 é usado um dia antes e um dia após a imunização intradérmica com OVA + MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L, que são realizados no Dia 0 e no Dia 14. Os baços e dLNs são isolados no dia 21 para análises de células CD8^{+} T específicas para o antígeno. Prevê-se que a co-administração intradérmica de OVA + MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L aumenta a porcentagem de Células IFN-γ^{+} T entre as células CD8^{+} T nos baços. Também é antecipado que o esgotamento dos pDCs resulta em uma diminuição na porcentagem de Células IFN-γ^{+} T entre as

células $CD8^+$ T nos baços. Os resultados desta experiência são antecipados para demonstrar o papel dos pDCs nos efeitos adjuvantes da vacina induzida por MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L em um modelo de vacinação de peptídeo *in vivo*.

Exemplo 35: Subconjuntos de células dendríticas migratórias Langerina-CD11b-e CD11b $^+$ DCs são eficientes na captação de antígeno OVA.

[0657] Muitos subconjuntos de DCs estão presentes nos linfonodos, que incluem DCs migratórias e DCs residentes. As DCs migratórias são MHC-II^+CD11c^+. As populações de células dendríticas residentes são MHC-$II^{Int}CD11c^+$. As DCs migratórias podem ser posteriormente separadas em CD11b $^+$ DC, Langerin-CD11b-DC e Langerin $^+$ DC. Langerina $^+$ DCs compreendem de células $CD103^+$ DC e Langerhans, ao passo que as DCs residentes são compostos de DC $CD8\alpha^+$ residente e DC $CD8\alpha^-$ residente. Para testar quais subconjuntos de DCs são eficientes na fagocitação do antígeno OVA marcado com corante fluorescente (OVA-647) e têm a capacidade de migrar para os dLNs, OVA-647 são injetados intradermicamente (ID) no flanco direito e coletados os dLNs em 24h pós-injeção. Para comparar se a co-administração de OVA-647 com ou sem adjuvantes de vacina Addavax ou MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L afeta as porcentagens de células $OVA\text{-}647^+$ entre $Langerin^-CD11b^-$ e CD11b $^+$ DCs, OVA-647 é intradermicamente (ID) injetado com ou sem Addavax ou MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L, e analisou OVA-647 $^+$ DCs entre $Langerin^-CD11b^-$ e $CD11b^+$ DCs. Prevê-se que a co-administração de OVA com MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L aumenta as percentagens de células OVA-647 + entre a$Langerin^-CD11b^-$ e $CD11b^+$ DCs, enquanto a co-administração de OVA com Addavax não consegue o mesmo. Addavax é uma nanoemulsão de óleo em água à base de esqualeno bem aceita com uma formulação semelhante ao MF59 que foi licenciada na Europa para vacinas contra a gripe com adjuvante. Prevê-se que os resultados desta experiência irão sugerir que a co-administração de OVA-647 com MVAΔC7L-

hFlt3L-TK(-)-mOX40L aumenta a capacidade das DCs migratórias para transportar o antígeno fagocitado para os dLNs. Prevê-se ainda que a administração combinada de MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L e Heat-iMVA produzirá efeitos sinérgicos a este respeito em comparação com a administração de MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L sozinho.

Exemplo 36: MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L é um Adjuvante imunológico Potente para Vacina de Célula Inteira Irradiada.

[0658] A vantagem de usar vacinas de células inteiras irradiadas em vez de antígeno tumoral peptídico ou neoantígeno incluem: (i) as células de tumor fornecem vários antígenos tumorais que podem ser reconhecidos pelo sistema imunológico do hospedeiro; e (ii) pode ignorar a necessidade ou o tempo para identificar antígenos tumorais ou neoantígenos. É analisado se a adição de MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L com B16-OVA irradiado melhora a eficácia da vacinação e se a distribuição sistêmica de anti-PD-L1 melhoraria ainda mais a eficácia da vacinação. Os camundongos são implantados por via intradermica com B16-OVA, eles são vacinados por via intradermica com B16-OVA, B16-OVA + MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L ou B16-OVA + poly IC irradiado três vezes no dia 3, 6 e 9 no flanco contralateral.

[0659] Prevê-se que a vacinação com B16-OVA + MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L irradiado estenderá a sobrevida média em função de B16-OVA irradiado sozinho. Também é antecipado que, na presença de anticorpo anti-PD-L1, a vacinação com B16-OVA + MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L irradiado estenderá a sobrevida média em função de B16-OVA + anti-PD-L1 irradiado. Prevê-se que estes resultados irão demonstrar que MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L é um adjuvante de vacina potente e seguro para vacinação de células inteiras irradiadas.

Exemplo 37: MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L é um adjuvante imunológico para vacinação de peptídeo neoantígeno.

[0660] Para testar se MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L pode atuar como um adjuvante de vacina para a vacinação de peptídeo neoantígeno, um

modelo de vacinação subcutânea foi usado em que camundongos são primeiro implantados com células B16-F10 ($7,5x10^4$ células por camundongo) por via intradérmica. No dia 3, 7 e 10 pós-implantação, os camundongos são vacinados no flanco contralateral por via subcutânea (SC) com uma mistura de peptídeos neoantígenos (M27 (REGVELCPGNKYEMRRHGTTHSLVIHD) (SEQ ID NO: 17), M30 (PSKPSFQEFVDWENVSPELNSTDQPFL) (SEQ ID NO: 18), e M48 (SHCHWNDLAVIPAGVVHNWDFEPRKVS) (SEQ ID NO: 19)) com ou sem MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L ou poli I: C. O crescimento do tumor e a sobrevivência dos camundongos são monitorados. Prevê-se que a vacinação SC com peptídeos neoantígenos por si só gera imunidade antitumoral sistêmica e o efeito antitumoral é aumentado quando a mistura de peptídeos neoantígenos é co-administrada com MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L.

Exemplo 38: MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L é um adjuvante imunológico para vacinação de peptídeo com antígeno viral.

[0661] Os antígenos virais são imunógenos potentes que podem ser reconhecidos pelo sistema imunológico do hospedeiro. Para testar se a combinação de MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L e o antígeno viral (tal como o peptídeo longo sintético (SLP) do vírus do papiloma humano E7) desencadeia células T antivirais, os camundongos serão vacinados por via subcutânea com E7 SLP sozinho, ou E7 SLP mais MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L, ou E7 mais poli I: C duas vezes, com duas semanas de intervalo, e os baços são subsequentemente coletados, dLNs e o sangue são coletados para respostas de células anti- $CD8^+$ e $CD4^+$ T e anticorpos Para testar o papel de MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L no modelo de vacinação terapêutica, células de câncer que expressam E7 (TC-1) serão implantadas por via intradérmica e, em seguida, a vacinação será realizada com ou sem adjuvante com intervalo de duas semanas, e os volumes do tumor e a sobrevivência dos camundongos serão acompanhados.

Exemplo 39: Escarificação da pele com MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L-E7 gera respostas de células anti-E7 CD8+ e CD4+ T mais fortes em comparação com MVA-E7.

[0662] O vírus MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L recombinante que expressa o gene E7 do HPV será gerado inserindo o gene E7 do HPV sob o controle do promotor psE/L da vacina em loci MVA E5R ou K7R. MVA-E7 (que codifica todo o comprimento de E7 de HPV sob o controle do promotor PSE/L inserido no locus TK) ou MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L-E7 em doses de 10^6 ou 10^7 pfu são administrados nas caudas de camundongos C57BL/6J fêmeas de 6-8 semanas de idade após a escarificação da pele. Uma semana após a vacinação, os camundongos são sacrificados e os baços são isolados para testar respostas de células $CD8^+$ T específicas ao antígeno. DCs derivadas da medula óssea (BMDCs) são infectados com MVA-E7 em MOI de 5 por 1h e, em seguida, incubados por 5h antes de os BMDCs serem incubados com esplenócitos por 12h. As células são processadas para coloração de citocina intracelular (ICS) para células IFN-γ^+CD8^+ T. Alternativamente, os BMDCs são incubados com o peptídeo E7 por 1h e, em seguida, incubados com esplenócitos por 12 h. ICS é realizado para células IFN-γ^+CD8^+ T reativas ao peptídeo E7.

Exemplo 40: Infecção intranasal de MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L-E7 fornece melhor proteção de camundongos de células TC-1 (expressando E7) no crescimento nos pulmões em comparação com MVA-E7.

[0663] Camundongos C57BL/6J fêmeas de seis e oito semanas de idade são infectados por via intranasal com MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L-E7, ou MVA-E7 (a $2x10^7$ pfu) ou controle de PBS. Uma semana após a infecção intranasal, os camundongos são desafiados com $1x10^5$ células TC-1 por meio de injeção na veia da cauda. Os camundongos são sacrificados 3 semanas depois para avaliar o crescimento do tumor nos pulmões. Prevê-se que a vacinação com MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L-E7 fornece melhor

proteção contra o crescimento de células de tumor que expressam E7 nos pulmões em comparação com MVA-E7.

Exemplo 41: Teste se a vacinação intratumoral (IT) é superior à vacinação subcutânea (SC) na geração de respostas imunológicas específicas para antígenos

[0664] ***Justificativa:*** Foi demonstrado anteriormente que a injeção intratumoral (IT) de Heat-iMVA erradica tumores injetados e induz imunidade antitumoral sistêmica, que requer CD103 $^{+}$/CD8 dependente de Batf3 $^{+}$ DCs e via de detecção de DNA citosólica mediada por STING. A administração de IT de Heat-iMVA altera o microambiente imunossupressor tumoral parcialmente por meio da ativação da via cGAS/STING e promove a apresentação do antígeno tumoral pelas CD103^{+} DCs. É hipotetizado que a administração IT de Heat-iMVA mais modelo de antígeno ou neoantígeno aumentaria a apresentação do antígeno por DCs infiltrantes de tumor e geraria imunidade adaptativa superior em comparação com a administração SC de Heat-iMVA mais antígeno.

[0665] ***Métodos:*** Para testar se a vacinação IT é superior à vacinação SC na geração de respostas imunológicas específicas do antígeno, células de melanoma B16-F10 ($5x10^5$ células) serão implantadas por via intradermal no flanco direito. No dia 7 pós implantação, quando os tumores têm 2-3 mm de diâmetro, MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L e a proteína OVA serão injetados diretamente nos tumores ou SC 1 cm de distância dos tumores à direita flanco. Uma semana pós injeção, TDLNs e baços serão coletados e as células T anti-OVA CD4 e CD8 serão analisadas por FACS.

[0666] Alternativamente, a mistura de peptídeo neoantígeno B16-F10 (M27/M30/M48) será co-injetada com MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L diretamente nos tumores no flanco direito ou injetado SC 1 cm de distância do tumores no flanco direito. Uma semana após a injeção, os TDLNs e os baços serão coletados e co-cultivados com M27 (REGVELCPGNKYEMRRHGTTHSLVIHD) (SEQ ID NO: 17), M30

(PSKPSFQEFVDWENVSPELNSTDQPFL) (SEQ ID NO: 18), ou M48 (SHCHWNDLAVIPAGVVHNWDFEPRKVS) (SEQ ID NO: 19) peptídeo por 16h para análise ELISPOT.

Exemplo 42: Teste se a vacinação intratumoral (IT) é superior à vacinação subcutânea (SC) na geração de respostas imunológicas específicas para antígenos na presença de bloqueio de ponto de verificação imunológico.

[0667] Para testar se a vacinação IT é superior à vacinação SC na geração de respostas imunológicas específicas do antígeno na presença de anticorpos de bloqueio de ponto de verificação imunológico, incluindo anti-CTLA-4, anti-PD-1 ou anti-PD-L1, B16-F10 células de melanoma ($5x10^5$ células) serão implantadas por via intradérmica no flanco direito. No dia 7 pós implantação, quando os tumores têm 2-3 mm de diâmetro, MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L e a proteína OVA serão injetados diretamente nos tumores ou SC 1 cm de distância dos tumores no flanco direito, duas vezes, com três dias de intervalo. Anti-CTLA-4, anti-PD-1 ou anti-PD-L1, ou anticorpo de controle de isotipo serão administrados por via intraperitoneal duas vezes, com três dias de intervalo. 2 dias pós segunda injeção, TDLNs e baços serão coletados e as células T anti-OVA CD4 e CD8 serão analisadas por FACS.

[0668] Alternativamente, a mistura de peptídeo neoantígeno B16-F10 (M27/M30/M48) será co-injetada com MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L diretamente nos tumores no flanco direito ou injetado SC 1 cm de distância do tumores no flanco direito duas vezes, com três dias de intervalo. Anti-CTLA-4, anti-PD-1 ou anti-PD-L1, ou anticorpo de controle de isotipo serão administrados por via intraperitoneal duas vezes, com três dias de intervalo. Aos 2 dias após a segunda injeção, TDLNs e baços serão coletados e co-cultivados com peptídeo M27, M30 ou M48 por 16h para análise ELISPOT.

Exemplo 43: Os vírus recombinantes E3LΔ83N-TK⁻-hFlt3L-anti-muCTLA-4/C7L⁻-mOX40L ou VAC-TK⁻-anti-muCTLA-4/C7L⁻-mOX40L são competentes para replicação.

[0669] As capacidades de replicação de E3LΔ83N-TK⁻-hFlt3L-anti-muCTLA-4/C7L⁻-mOX40L ou VAC-TK⁻-anti-muCTLA-4/C7L⁻-mOX40L foram determinadas em células de melanoma B16-F10 murino infectando-os em um MOI de 0,1. As células foram coletadas em vários pontos de tempo após a infecção (*por exemplo*, 1, 24, 48 e 72 h) e os rendimentos virais (log pfu) foram determinados por titulação em células BSC40. A **FIG. 24A** mostra os gráficos de rendimentos virais traçados contra horas após a infecção. Ambos E3LΔ83N-TK⁻-hFlt3L-anti-muCTLA-4/C7L⁻-mOX40L e VAC-TK⁻-anti-muCTLA-4/C7L⁻-mOX40L replicaram eficientemente em células B16-F10 com títulos virais aumentando em mais de 1421 e 32142 vezes 72h após a infecção, respectivamente. As alterações dobradas de rendimentos virais em 72h sobre aqueles em 1h após a infecção foram calculadas (**FIG. 24B**). Os vírus recombinantes E3LΔ83N-TK⁻-hFlt3L-anti-muCTLA-4/C7L⁻-mOX40L e VAC-TK⁻-anti-muCTLA-4/C7L⁻-mOX40L replicaram-se eficientemente em células de melanoma murino B16-F10.

TABELA 6

Os dados quantitativos (alteração da dobra em 72 hpi) para os resultados mostrados nas FIGS. 24A e 24B.

	Vaccinia	**E3LΔ83N-TK--hFlt3L-anti-muCTLA-4**	**E3LΔ83N-TK⁻-hFlt3L-anti-muCTLA-4/C7L⁻mOX40L**	**VAC-TK⁻-anti-muCTLA-4/C7L⁻mOX40L**
B16-F10	**161111**	**7052**	**1421**	**32142**

Exemplo 44: Expressão de anti-muCTLA-4, hFlt3L e mOX40L em células de melanoma B16-F10 *via* infecção de vírus E3LΔ83N-TK$^-$-hFlt3L-anti-muCTLA-4/C7L$^-$-mOX40L

[0670] Para determinar se os vírus recombinantes E3LΔ83N-TK$^-$-hFlt3L-anti-muCTLA-4/C7L$^-$-mOX40L são capazes de expressar genes específicos desejados, células de melanoma murino B16-F10 foram infectadas com E3LΔ83N-TK$^-$-hFlt3L-anti-muCTLA-4 ou E3LΔ83N-TK$^-$-hFlt3L-anti-muCTLA-4/C7L$^-$-mOX40L em um MOI de 10, e a expressão de anti-muCTLA-4, hFlt3L e mOX40L foi medida. Os lisados celulares foram coletados em vários momentos (*por exemplo*, 7, 24 e 48 h) após a infecção. As análises de Western blot foram realizadas para determinar os níveis de anticorpos e proteínas. Como mostrado na **FIG. 25**, há expressão abundante de anticorpo anti-muCTLA-4 (cadeia pesada (HC) e cadeia leve (LC)), proteína hFlt3L e mOX40L em células B16-F10 infectadas com vírus E3LΔ83N-TK$^-$-hFlt3L-anti-muCTLA-4/C7L$^-$-mOX40L. Consequentemente, estes resultados demonstram que os vírus recombinantes da presente tecnologia têm a capacidade de expressar simultaneamente vários genes específicos de interesse de diferentes loci no vírus em células infectadas e são úteis em métodos para administração dos produtos desejados às células.

Exemplo 45: Expressão da superfície celular de mOX40L em células de melanoma B16-F10 *via* infecção de vírus E3LΔ83N-TK$^-$-hFlt3L-anti-muCTLA-4/C7L$^-$-mOX40L ou VAC-TK$^-$-anti-muCTLA-4/C7L$^-$-mOX40L.

[0671] Para determinar se mOX40L é expresso na superfície de células B16-F10 murinas infectadas com vírus E3LΔ83N-TK$^-$-hFlt3L-anti-muCTLA-4/C7L$^-$-mOX40L ou VAC-TK$^-$-anti-muCTLA-4/C7L$^-$-mOX40L recombinantes, células B16-F10 foram infectadas com E3LΔ83N-TK$^-$-hFlt3L-anti-muCTLA-4, E3LΔ83N-TK$^-$-hFlt3L-anti-muCTLA-4/C7L$^-$-mOX40L, ou VAC-TK$^-$-anti-muCTLA-4/C7L$^-$-mOX40L a um MOI de 10. A expressão de mOX40L da superfície celular a é determinada por FACS usando anticorpo anti- mOX40L 24 horas após a infecção. Como mostrado na **FIG. 26**, há expressão abundante

na superfície celular da proteína mOX40L em células B16-F10 murinas infectadas com vírus E3LΔ83N-TK$^-$-hFlt3L-anti-muCTLA-4/C7L$^-$-mOX40L ou VAC-TK$^-$-anti-muCTLA-4/C7L$^-$-mOX40L. Por conseguinte, estes resultados demonstram que os vírus recombinantes da presente tecnologia têm a capacidade de expressar genes específicos de interesse em células infectadas e são úteis em métodos para administrar os produtos desejados às células e à superfície celular.

Exemplo 46: A combinação com administração IT de MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L e administração sistêmica de anticorpo anti-PD-L1 aumenta significativamente as respostas globais e a taxa de cura no modelo de implantação unilateral de melanoma B16-F10.

[0672] A combinação com administração IT de MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L e administração sistêmica de anti-PD-L1 demonstrou eficácia antitumoral superior em um modelo de implantação unilateral de melanoma B16-F10 murino. Resumidamente, $5x10^5$ células de melanoma B16-F10 foram implantadas intradermicamente na pele raspada nos flancos direitos de camundongos C57BL/6J. 9 dias após a implantação, os tumores foram injetados duas vezes por semana com PBS ou $4x10^7$ pfu de MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L. O anticorpo anti-PD-L1 foi administrado por via intraperitoneal a 250 µg por camundongo (**FIG. 27**). Os volumes do tumor de camundongos individuais foram medidos (**FIGS. 28A-28C**) e a taxa de sobrevivência geral dos camundongos foi monitorada (**FIGS. 29A-29B**). A injeção intratumoral de MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L atrasou o crescimento do tumor e melhorou a sobrevida em comparação com PBS, com uma sobrevida média de 13 dias. A combinação de IT de MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L e anticorpo anti-PD-L1 IP mostrou melhor eficácia anti-tumoral na erradicação de tumores em comparação com MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L sozinho, com 60% dos camundongos sem tumor e sobreviveram após os tratamentos.

Exemplo 47: A combinação com administração IT de MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L e administração sistêmica de anticorpo anti-PD-L1

aumenta significativamente as respostas globais e a taxa de cura no modelo de implantação unilateral de câncer de cólon MC38.

[0673] A combinação com administração IT de MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L e administração sistêmica de anti-PD-L1 teve eficácia antitumoral superior no modelo de implantação unilateral de câncer de cólon MC38. Resumidamente, $5x10^5$ células MC38 foram implantadas por via intradermica na pele raspada nos flancos direitos de camundongos C57BL/6J. 9 dias após a implantação, os tumores foram injetados duas vezes por semana com PBS ou $4x10^7$ pfu de MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L. O anticorpo anti-PD-L1 foi administrado por via intraperitoneal a 250 µg por camundongo (**FIG. 30**). Os volumes do tumor de camundongos individuais foram medidos (**FIGS. 31A-31C**) e a taxa de sobrevivência geral dos camundongos foi monitorada (**FIGS. 32A-32B**). A injeção intratumoral de MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L atrasou o crescimento do tumor e prolongou a sobrevida em comparação com PBS, com extensão da sobrevida média para 28 dias. A combinação de IT de MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L e anticorpo anti-PD-L1 IP mostrou melhor eficácia anti-tumoral na erradicação de tumores em comparação com MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L sozinho, com 62,5% dos camundongos sem tumor e sobreviveram após os tratamentos.

Exemplo 48: A combinação com administração IT de MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L e administração sistêmica de anticorpo anti-PD-L1 aumenta significativamente as respostas globais e a taxa de cura no modelo de implantação unilateral de câncer de bexiga MB49.

[0674] A combinação com administração IT de MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L e administração sistêmica de anti-PD-L1 teve eficácia antitumoral superior no modelo de implantação unilateral de câncer de bexiga MB49. Resumidamente, $2,5x10^5$ células MB49 foram implantadas por via intradermica na pele raspada nos flancos direitos de camundongos C57BL/6J. 8 dias após a implantação, os tumores foram injetados duas vezes por semana com PBS ou $4x10^7$ pfu de MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L ou os

camundongos receberam anticorpo anti-PD-L1 duas vezes por semana. O anticorpo anti-PD-L1 foi administrado por via intraperitoneal a 250 µg por camundongo (**FIG. 33**). Os volumes do tumor de camundongos individuais foram medidos (**FIGS. 34A-34D**) e a taxa de sobrevivência geral dos camundongos foi monitorada (**FIGS. 35A-35B**). Em camundongos tratados com PBS, os tumores cresceram rapidamente, o que resultou em morte precoce com uma sobrevida média de 13 dias. A injeção intratumoral de MVA∆C7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L atrasou o crescimento do tumor e prolongou a sobrevida em comparação com PBS, com extensão da sobrevida média para 23 dias. A administração IP de anticorpo anti-PD-L1 sozinho recebeu respostas parciais com crescimento retardado do tumor e sobrevida média estendida para 21,5 dias em comparação com PBS, mas os camundongos não foram capazes de rejeitar tumores. A combinação de IT de MVA∆C7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L e IP de anticorpo anti-PD-L1 é mais eficaz na erradicação de tumores MB49 em comparação com MVA∆C7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L sozinho ou anticorpo anti-PD-L1 sozinho com sobrevida média estendida para 43,5 dias. 50% dos camundongos estavam livres do tumor e sobreviveram após os tratamentos

Exemplo 49: Os cânceres de mama espontâneos respondem à terapia de combinação com administração de IT de MVA∆C7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L e administração sistêmica de anticorpo anti-PD-L1.

[0675] A combinação com administração IT de MVA∆C7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L e administração sistêmica de anti-PD-L1 teve eficácia antitumoral superior em cânceres de mama espontâneos. Fêmeas MMTV-PyMT desenvolveram múltiplos tumores mamários palpáveis com latência média de 92 dias de idade, que são comumente usados como um modelo de tumor espontâneo (**FIG. 36**). Depois que o primeiro tumor se tornou palpável, MVA∆C7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L foi injetado em tumores nos flancos direitos e o anticorpo anti-PD-L1 foi dado por via intraperitoneal a 250 µg por camundongo. Os tamanhos dos tumores foram medidos duas vezes por semana. Tumores de 2 camundongos que receberam tratamentos de

anticorpos IT de MVA∆C7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L e IP de anti-PD-L1 foram coletados e processados em suspensões de células únicas para marcação de superfície com anticorpos anti-CD45, CD3, CD8, CD4, CD103 e CD69. As células T infiltrantes de tumor vivo foram analisadas por FACS. Os volumes do tumor de camundongos individuais foram medidos (**FIG. 37**). O camundongo tratado com PBS desenvolveu vários tumores e os tumores cresceram rapidamente. A injeção intratumoral de MVA∆C7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L atrasou o crescimento do tumor em comparação com PBS. A combinação de IT de MVA∆C7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L e IP de anticorpo anti-PD-L1 é mais eficaz na supressão da ocorrência e crescimento tumoral em comparação com MVA∆C7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L sozinho. As análises de FACS de linfócitos infiltrantes de tumor mostraram que as células T eram abundantes no microambiente tumoral em tumores PyMT (**FIG. 38**). Tratamento com IT de MVA∆C7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L e IP de anticorpo anti-PD-L1 induziu uma maior porcentagem de população de células $CD103^+CD69^+$ de células $CD8^+$ T**(FIG. 39**), que representa células $CD8^+$ Tsimilares à memória ativadas. Tratamento com IT de MVA∆C7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L e IP de anticorpo anti-PD-L1 não induziu uma maior porcentagem de população de células $CD103^+CD69^+$ de células $CD4^+$ T**(FIG. 40**), demonstrando que o efeito antitumoral da terapia de combinação no modelo de tumor MMTV-PyMT se baseou principalmente na ativação de células $CD8^+$ T.

Exemplo 50: Geração de linhas celulares estáveis B16-F10 superexpressando hFlt3L ou mOX40L.

[0676] Este exemplo demonstrou a geração de linha celular estável B16-F10 superexpressando hFlt3L ou mOX40L. Resumidamente, as células B16-F10 foram transfectadas com retrovírus que expressam hFlt3L ou mOX40L. Após a seleção em 2μ g/ml de puromicina durante uma semana, as células foram coletadas e hFlt3L (**FIG.41A**) ou mOX40L (**FIG. 41B**) a expressão na superfície celular foi detectada e confirmada por FACS.

Exemplo 51: As células de melanoma B16-F10 que superexpressam hFlt3L são mais responsivas à administração intratumoral de MVA∆C7L.

[0677] As células de melanoma B16-F10 que superexpressam (B16-F10-hFlt3L) são mais responsivas à administração intratumoral de MVA∆C7L. Resumidamente, $5x10^5$ células de melanoma B16-F10 foram implantadas intradermicamente nos flancos direitos de camundongos C57B/6J e $5x10^5$ células de melanoma B16-F10-hFlt3L foram implantadas intradermicamente nos flancos esquerdos de camundongos C57B/6J. Nove dias após a implantação do tumor, PBS ou $4x10^7$ pfu de MVA∆C7L foram injetados intratumoralmente duas vezes por semana nos tumores em ambos os flancos (**FIG. 42**). Os volumes do tumor dos flancos direito e esquerdo de camundongos individuais foram medidos (**FIGS. 43A-43D**). Os tumores foram coletados 2 dias após a segunda injeção e os linfócitos infiltrantes do tumor foram analisados por FACS (**FIGS. 44A-44E e 45A-45E**). Os tumores B16-F10 e B16-F10-hFlt3L tratados com PBS tiveram taxa de crescimento similar. Em camundongos tratados com MVA∆C7L, o crescimento do tumor B16-F10-hFlt3L foi significativamente inibido em comparação com os tumores B16-F10. A injeção intratumoral de MVA∆C7L gerou maior porcentagem de células $CD8^+$ T **(FIGS. 44A e 45A**) e células $CD4^+$ T **reduzidas (FIGS. 44C e 45C**) e células $CD4^+FoxP3^+$ T **(FIGS. 44E e 45E**) em ambos os tumores B16-F10 e B16-F10-hFlt3L em comparação com o grupo PBS. IT MVA∆C7L induziu mais $CD8^+GranzymeB^+$ (**FIGS. 44B e 45B**) e células $CD4^+GranzymeB^+$ T **(FIGS. 44D e 45D**) em tumores B16-F10-hFlt3L. Estes resultados demonstram que as células de melanoma B16-F10 que superexpressam hFlt3L são mais responsivas à administração intratumoral de MVA∆C7L com ativação de células T.

Exemplo 52: As células de melanoma B16-F10 que superexpressam mOX40L são mais responsivas à administração intratumoral de MVA∆C7L.

[0678] As células de melanoma B16-F10 que superexpressam mOX40L (B16-F10-OX40L) são mais responsivas à administração intratumoral de MVA∆C7L. Resumidamente, $5x10^5$ células de melanoma B16-F10 foram implantadas intradermicamente nos flancos direitos de camundongos C57B/6J e $5x10^5$ células de melanoma B16-F10-OX40L foram implantadas intradermicamente nos flancos esquerdos de camundongos C57B/6J. Nove dias após a implantação do tumor, PBS ou $4x10^7$ pfu de MVA∆C7L foram injetados intratumoralmente duas vezes por semana nos tumores em ambos os flancos (**FIG. 46**). Os volumes do tumor dos flancos direito e esquerdo de camundongos individuais foram medidos duas vezes por semana (**FIGS. 47A-47D**). Os tumores foram coletados 2 dias após a segunda injeção e os linfócitos infiltrantes do tumor foram analisados por FACS (**FIGS. 48A-48E e 49A-49E**). Os tumores B16-F10-OX40L cresceram mais lentamente do que os tumores B16-F10, mesmo no grupo tratado com PBS (**FIGS. 47A e 47C**). Em camundongos tratados com MVA∆C7L por via intratumoral, o crescimento do tumor B16-F10 foi atrasado (**FIG. 47B**) e o crescimento do tumor B16-F10-OX40L foi significativamente suprimido (**FIG. 47D**). A injeção intratumoral de MVA∆C7L gerou mais $CD8^+$ ativado (**FIG. 48A e 49A**) e células $CD4^+$ T **(FIG. 48C e 49C**) em tumores B16-F10 em comparação com o grupo tratado com PBS. Notavelmente, as células 99%~100% $CD8^+$ e $CD4^+$ T que se infiltraram nos tumores B16-F10-OX40L foram $GranzymeB^+$ (**FIG. 48B e 48D; 49B e 49D**). Mais células $CD4^+FoxP3^+$ T estavam se infiltrando em tumores B16-F10-OX40L do que em tumores B16-F10, mas IT MVA∆C7L esgotou essas células de forma eficiente de uma média de 60% a 15% do total de células $CD4^+$ T **(FIG. 48E e 49E**). Estes resultados demonstram que as células de melanoma B16-F10 que superexpressam OX40L são mais responsivas à administração intratumoral de MVA∆C7L. OX40L desempenha um papel importante na

ativação das células $CD8^+$ e $CD4^+$ T· IT de MVAΔC7L é capaz de esgotar as células $CD4^+FoxP3^+$ T no microambiente tumoral.

Exemplo 53: O tratamento com FTY720 aumenta a eficácia antitumoral de IT de MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L com crescimento tumoral retardado e sobrevida prolongada no modelo de implantação unilateral de melanoma B16-F10.

[0679] Para determinar se a iniciação e ativação de células T de linfonodos são cruciais para a erradicação do tumor no tratamento IT de MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L (**FIG. 50B**) foi usado para bloquear a saída de células T de órgãos linfóides em um modelo de implantação de melanoma B16-F10. Resumidamente,$5x10^5$ células de melanoma B16-F10 foram implantadas por via intradérmica para o flanco direito de camundongos C57B/6J. Nove dias após a implantação do tumor, PBS ou $4x10^7$ pfu de MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-muOX40L foram injetados intratumoralmente duas vezes. FTY720 a 25 µg por camundongo em 50% de etanol foi administrado por via intraperitoneal diariamente durante o tratamento, começando um dia antes da primeira injeção de MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-muOX40L (**FIG. 51**). Os tamanhos dos tumores foram medidos (**FIGS. 52A-D; 53A e 53B**) e a sobrevivência foi monitorada (**FIGS. 53C e 53D**). **A FIG. 50A** é um diagrama que demonstra o mecanismo da função imunomoduladora de FTY720. Após o tratamento com FTY720, as células T são aprisionadas nos gânglios linfáticos. Em camundongos tratados com PBS, os tumores cresceram rapidamente e não foram afetados por FTY720 (**FIGS. 52A e 52C**). IT de MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-muOX40L sozinho atrasou o crescimento do tumor (**FIG. 52B**). FTY720 aumentou o efeito antitumoral de IT de MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-muOX40L com crescimento retardado do tumor (**FIG.52D**) e sobrevida melhorada (**FIG.53D**). Estes resultados demonstram que no tratamento IT de MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-muOX40L, as células T acumuladas nos tumores durante o desenvolvimento do tumor desempenham um papel crucial na erradicação do tumor.

Exemplo 54: Vaccinia E5 é altamente conservado na família dos poxvírus.

[0680] Vaccinia E5 é um polipeptídeo de 341 aminoácidos, compreendendo dois domínios BEN no terminal C, de aa 112-222 e aa 233-328 (**FIG. 54A**). BEN é nomeado após sua presença em BANP/SMAR1, poxvírus E5R e NAC1. As proteínas contendo o domínio BEN estão envolvidas na organização da cromatina, na regulação da transcrição e, possivelmente, na organização do DNA viral. E5 é altamente conservado entre os membros da família do poxvírus. O ortólogo E5 do vírus mixoma, que pertence ao gênero leporipox, é o mais divergente entre todos os outros membros da família dos poxvírus, incluindo o vírus varíola, que causa a varíola em humanos, ectromelia (varíola do camundongo), varíola bovina e varíola dos macacos (**FIG. 54B**).

Exemplo 55: Vaccinia E5 é um fator de virulência.

[0681] Para testar se vaccinia E5 é um fator de virulência, um vírus VACV∆E5R recombinante foi gerado por recombinação homóloga nos genes flanqueadores E4L e E6R. O gene E5R foi substituído pelo gene que codifica mCherry sob o controle de um promotor p7.5 (**FIG. 55A**). Um experimento de infecção intranasal com vaccinia de tipo selvagem (WT VACV) em $2x10^{6}$ pfu e vírus vaccinia com deleção de E5 (VACV∆E5R) em $2x10^{7}$ pfu ou $2x10^{6}$ pfu foi realizado usando 6-8 semanas camundongos fêmeas C57BL/6J antigos. Todos os camundongos infectados com WT VACV perderam peso rapidamente a partir do segundo dia de infecção. Todos os camundongos morreram ou foram sacrificados devido a mais de 30% de perda de peso no dia 7 a 8 após a infecção (**FIGS. 55B e 55C**). Em contraste, os camundongos infectados com $2x10^{6}$ pfu ou $2x10^{7}$ pfu de VACV∆E5R perderam cerca de 15% ou 20% do peso corporal inicial em média, respectivamente, no dia 5 e 6 após a infecção, e então ganharam peso e recuperado da infecção (**FIGS. 55B e 55C**). Estes resultados indicam que VACV∆E5R é altamente atenuado em comparação com WT VACV e E5 é um fator de virulência.

Exemplo 56: VACV∆E5R induz níveis mais elevados de expressão do gene IFNB e secreção de proteínas IFN-ß de células dendríticas derivadas da medula óssea (BMDCs) em comparação com MVA.

[0682] A infecção por WT VACV de BMDCs não induz IFN tipo I, enquanto a infecção por MVA o faz (Dai *et al. PLoS Pathogens* (2014)). Foi examinado se a deleção de E5R de VACV ganhou a capacidade de induzir IFNB em BMDCs infectados. As células da medula óssea de C57BL/6J foram cultivadas na presença de GM-CSF. Os BMDCs foram infectados com MVA, VACV ou VACV∆E5R a um MOI de 10. As células foram coletadas 6h após a infecção. RNAs foram extraídos e RT-PCRs foram realizados. Os sobrenadantes foram coletados 21h após a infecção e IFN-ß e os níveis foram medidos por ELISA. Os resultados de RT-PCR demonstraram que a infecção por WT VACV de BMDCs induziu uma expressão do gene IFNB de 29 vezes em comparação com o controle sem tratamento (NT), a infecção por MVA induziu 387 vezes e VACV∆E5R induziu 1316 vezes (**FIG 56A**). Os resultados de ELISA demonstraram que a infecção por VACV de BMDCs falhou em induzir secreção de IFN-ß BMDCs. No entanto, os níveis de IFN-ß nos sobrenadantes de BMDCs infectados com MVA ou VACV∆E5R foram 375,5 pg/ml e 660 pg/ml, respectivamente (**FIG. 56B**). Estes resultados indicam que VACV∆E5R induz níveis mais elevados de expressão do gene IFNB e secreção de proteína IFN-ß de BMDCs em comparação com MVA.

Exemplo 57: MVA∆E5R induz níveis mais elevados de expressão do gene IFNB em BMDCs e BMDMs em comparação com MVA.

[0683] Para testar se a deleção de E5 do genoma MVA também aumenta sua capacidade de induzir a indução do gene IFNB, um MVA∆E5R recombinante foi gerado por recombinação homóloga nos genes flanqueadores E4L e E6R, que resultou na substituição do gene E5R pelo gene codificação de mCherry sob o controle de um promotor p7.5 (**FIG. 57A**). Um MVA∆K7R recombinante foi gerado por recombinação homóloga nos genes flanqueadores

K5,6L e F1L, que resultou na substituição do gene K7R pelo gene codificação de mCherry sob o controle de um promotor p7.5 (**FIG. 57B**).

[0684] BMDCs ou BMDMs foram gerados por cultura de células da medula óssea na presença de GM-CSF ou M-CSF, respectivamente. BMDCs e BMDMs foram infectados com MVA, MVA∆E5R ou MVA∆K7R a um MOI de 10. As células foram coletadas 6h após a infecção. O RT-PCR demonstrou que a infecção por MVA∆E5R, MVA∆K7R ou MVA de BMDCs resultou na indução de 2.452 vezes, 22 vezes ou 12 vezes do gene IFNB, respectivamente, em comparação com um controle "em branco" (**FIG. 57C)**. Em BMDMs, a infecção por MVA∆E5R, MVA∆K7R ou MVA resultou na indução de 4510, 35 ou 4 vezes da expressão do gene IFNB em comparação com um controle "em branco" (**FIG. 57D)**. Estes resultados demonstram que o E5 é um inibidor dominante da indução do gene IFNB em BMDCs e BMDMs, e a deleção de E5 do genoma de MVA leva a uma indução dramática de IFNB. Esses resultados também demonstram que K7 também é um inibidor da indução do gene IFNB em BMDCs e BMDMs.

Exemplo 58: MVA∆E5R induz níveis mais elevados de expressão dos genes IFNA, CCL4 e CCL5 em BMDCs em comparação com MVA.

[0685] Os BMDCs foram infectados com MVA ou MVA∆E5R a um MOI de 10. As células foram coletadas 6h após a infecção. As análises de RT-PCR demonstraram que MVA∆E5R também induziu níveis muito mais elevados de IFNA (**FIG. 58A**), CCL4 (**FIG. 58B**), e CCL5 (**FIG. 58C**) expressão do gene em comparação com MVA. Esses resultados sugerem que a infecção por MVA∆E5R desencadeia a indução de IFN tipo I e quimiocinas que podem facilitar o recrutamento de células imunológicas para o local da infecção.

Exemplo 59: MVA∆E5R induz níveis mais elevados de expressão do gene IFNB em comparação com MVA∆E5R inativado por calor (Heat-iMVA∆E5R).

[0686] MVA inativado por calor induz níveis mais elevados de IFN tipo I e citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas em comparação com MVA vivo (Dai *et al. Science Immunology* (2017)). A indução da expressão do gene IFNB e secreção de IFN-ß por MVA∆E5R em função de BMDCs infectados com Heat-iMVA∆E5R foram examinados. Resumidamente, os BMDCs foram infectados com vírus MVA∆E5R ou aquecido-iMVA∆E5R a MOIs de 0,25, 1, 3 ou 10. As células foram lavadas após 1h de infecção e meio fresco foi adicionado. As células e os sobrenadantes foram coletados 14h após a infecção. As expressões dos genes IFNB e E3 foram determinadas por RT-PCR. Os níveis de proteína IFN-ß nos sobrenadantes foram determinados por ELISA. Os resultados de RT-PCR mostram que MVA∆E5R induz a expressão do gene IFNB e secreção de IFN-ß uma forma dependente da dose, e a indução foi muito maior em comparação com Heat-iMVA∆E5R. Em MOIs de 3 ou 10, MVA∆E5R resultou nos níveis máximos de indução da expressão do gene IFNB e IFN-ß secreção de proteína (**FIGS. 59A e 59C**). O MVA∆E5R expressou o gene E3 da vaccinia, enquanto o MVA∆E5R inativado pelo calor não conseguiu expressar como esperado (**FIG. 59B**).

Exemplo 60: A expressão do gene IFNA e IFNB induzida por MVA∆E5R e a secreção da proteína IFN-b a partir de BMDCs requerem o sensor de DNA citosólico cGAS.

[0687] A infecção por MVA∆E5R de BMDCs induziu níveis elevados de IFNA e indução de genes IFNB e secreção de proteína IFN-ß em comparação com MVA vivo, MVA inativado por calor ou MVA∆E5R inativado por calor. Para determinar se o cGAS é necessário para a expressão do gene IFN induzida por MVA∆E5R e secreção de proteína, BMDCs de camundongos WT e $cGAS^{-/-}$ foram gerados e foram infectados com MVA ou MVA∆E5R em um MOI de 10. As células foram coletadas 6h após a infecção. A análise de

RT-PCR mostrou que IFNB induzido por MVA∆E5R (**FIG. 60A**) e IFNA (**FIG. 60B**) a expressão do gene é dependente de cGAS, ao passo que tanto o MVA quanto o MVA∆E5R expressam o gene E3L em células WT ou $cGAS^{-/-}$ **(FIG. 60C**). BMDCs de camundongos WT e $cGAS^{-/-}$ foram infectados com MVA, MVA∆E5R, Heat-iMVA ou Heat-iMVA∆E5R em um MOI de 10 e os sobrenadantes foram coletados 8 e 16h após a infecção. Os níveis de proteína IFN-ß nos sobrenadantes foram medidos por ELISA. Níveis mais elevados induzidos por MVA∆E5R de secreção de IFN-ß de WT BMDCs em comparação com MVA, Heat-iMVA ou Heat-iMVA∆E5R 8h após a infecção. Às 16 horas após a infecção, o nível de IFN-ß do sobrenadante de WT BMDCs infectados com MVA∆E5R aumentou ainda mais em comparação com o sobrenadante coletado 8h após a infecção (**FIG. 60D**). A indução da secreção de IFN-ß por BMDCs infectados com MVA∆E5R era completamente dependente de cGAS (**FIG. 60D**).

Exemplo 61: A expressão do gene IFNB induzida por MVA∆E5R e a secreção da proteína IFN-b de BMDCs e BMDMS requerem STING.

[0688] STING é uma proteína localizada no retículo endoplasmático (ER), crítica para a via de detecção do DNA citosólico. Após a ligação ao DNA, cGAS é ativado e gera um segundo mensageiro GMP-AMP cíclico (cGAMP) a partir de ATP e GTP. O cGAMP se liga a STING e, subsequentemente, ativa a STING, que leva à ativação do fator de transcrição IRF3 e à indução do gene IFNB. Para testar se a expressão do gene IFNB induzida por MVA∆E5R e secreção de proteína IFN-ß requer STING, BMDCs e BMDMs de camundongos WT e $STING^{Gt/Gt}$ de mesma idade foram gerados, os quais carecem da proteína STING funcional. MVA∆E5R e Heat-iMVA∆E5R induziram a expressão do gene IFNB em WT BMDCs, mas não em células $STING^{Gt/Gt}$**(FIG. 61A**). Similarmente, secreção de proteínaIFN-ß induzida por MVA∆E5R em WT BMDMs, mas não em células $STING^{Gt/Gt}$ **(FIG. 61B**).

Exemplo 62: secreção de proteínas IFN-ß induzida por MVA∆E5R de BMDCs requer IRF3, IRF7 e IFNAR1.

[0689] Fatores de transcrição IRF3 e IRF7 são importantes para a indução da expressão do gene IFNB. Os IFNs do tipo I, uma vez secretados, ligam-se ao IFNAR, o que leva à ativação da via JAK/STAT e à indução de genes estimulados por IFN (ISGs). Para determinar se IRF3, IRF7 e IFNAR1 foram necessários para a indução de secreção de proteína IFN-ß de BMDCs e BMDMs, BMDCs e BMDMs de camundongos WT e IRF3$^{-/-}$ foram infectados com MVA, MVA∆E5R, Heat-iMVA ou Heat-iMVA∆E5R. Os sobrenadantes foram coletados 8 e 16h após a infecção. Os níveis de proteína IFN-ß nos sobrenadantes foram determinados por ELISA. A secreção de IFN-ß induzida por MVA∆E5R em 8 e 16h foi reduzida em 96% e 94% em IRF3$^{-/-}$ BMDCs respectivamente (**FIG. 62A**). Além disso, a secreção de IFN-ß induzida por MVA∆E5R em 8 e 16h foi reduzida em 63% e 75% em IRF3$^{-/-}$ BMDCs respectivamente (**FIG. 62B**).

[0690] BMDCs de camundongos WT e IRF7$^{-/-}$ foram infectados com MVA∆E5R em um MOI de 10 ou tratados com controle simulado. Os sobrenadantes foram coletados 16 horas após a infecção. Os níveis de proteína IFN-ß nos sobrenadantes foram determinados por ELISA. A secreção de IFN-ß induzida por MVA∆E5R foi reduzida em 89% em IRF7$^{-/-}$ BMDCs (**FIG. 62C**).

[0691] BMDCs de camundongos WT, cGAS$^{-/-}$, ou IFNAR1$^{-/-}$ foram infectados com MVA, MVA∆E5R, Heat-iMVA ou Heat-iMVA∆E5R. Os sobrenadantes foram coletados 16 horas após a infecção. Os níveis de proteína IFN-ß nos sobrenadantes foram determinados por ELISA. A secreção de IFN-ß induzida por MVA∆E5R foi abolida em cGAS$^{-/-}$BMDCs e foi reduzida em 79% em IFNAR1$^{-/-}$ BMDCs (**FIG. 62D**).

[0692] Tomados em conjunto, esses resultados demonstram que IRF3/IRF7/IFNAR1 desempenham papéis importantes na indução de produção IFN-ß por BMDCs.

Exemplo 63: degradação de cGAS induzida por WT VACV é mediada por uma via dependente de proteassoma.

[0693] Foi determinado que a infecção por WT VACV desencadeia a degradação de cGAS em fibroblastos embrionários murinos (MEFs) e BMDCs. Para determinar o mecanismo de degradação de cGAS induzida por VACV, os MEFs foram pré-tratados com cicloheximida (CHX); um inibidor proteassomal, MG132; um inibidor de pan-caspase, Z-VAD; ou um inibidor VIII AKT1/2 durante 30 min. MEFs foram então infectados com WT VACV na presença de cada medicamento. As células foram coletadas 6h após a infecção. A análise de Western blot demonstrou que na presença de MG132, a degradação de cGAS induzida por WT VACV foi bloqueada (**FIG. 63A**). Como um controle, o tratamento de MEFs com DMSO ou MG132 não afetou o nível de proteína cGAS (**FIG. 63B**). Para testar se vaccinia E5 é responsável pela degradação de cGAS mediada por WT VACV, os BMDCs foram infectados com WT VACV ou VACV∆E5R na presença ou ausência de MG132 (**FIG. 63C**). Enquanto a infecção por WT VACV de BMDCs resultou na degradação de cGAS, a infecção por VACV∆E5R não. Além disso, a degradação de cGAS induzida por WT VACV foi bloqueada na presença de MG132. Estes resultados suportam ainda que E5 do vírus vaccinia é responsável pela degradação de cGAS induzida por WT VACV.

Exemplo 64: O gene E5R em MVA é importante na mediação da degradação de cGAS em BMDCs.

[0694] Para testar se o gene E5R em MVA tem papel semelhante ao gene E5R vaccinia, os BMDCs foram infectados com MVA ou MVA∆E5R em um MOI de 10. As células foram coletadas 2, 4, 6, 8 e 12 horas após a infecção. Uma amostra de $cGAS^{-/-}$ BMDC sem infecção também foi incluída. A análise de Western blot mostrou que a infecção de BMDCs com MVA também causou rápida degradação de cGAS, enquanto a infecção com MVA∆E5R resultou em muito menos degradação de cGAS (**FIG. 64**). Estes resultados

demonstram que o gene E5R em MVA também é responsável pela degradação de cGAS.

Exemplo 65: MVAΔE5R induz níveis mais elevados de Stat2 fosforilado em comparação com MVA.

[0695] Para testar se a infecção por MVAΔE5R de BMDCs desencadeia uma sinalização mais forte de IFNR a jusante, BMDCs foram infectados com MVA ou MVAΔE5R em um MOI de 10. As células foram coletadas 2, 4, 6, 8 e 12 horas após a infecção. A análise de Western blot foi realizada usando anticorpos anti-fosfo-STAT2, anti-STAT2 e anti-GAPDH (**FIG. 65**). Os resultados demonstram que o MVAΔE5R induz níveis mais elevados de p-STAT2, especialmente às 4 e 6h após a infecção, em comparação com o MVA. STAT2 é um importante fator de transcrição para os genes estimulados por IFN de indução. STAT2 fosforilado transloca-se do citoplasma para o núcleo para se ligar ao elemento de resposta sensível a IFN (ISRE), o que leva à indução da expressão de ISG. Esses resultados indicam que a infecção por MVAΔE5R pode desencadear uma indução mais forte de centenas de ISGs por meio de p-STAT2 em comparação com MVA. Alguns ISGs são citocinas e quimiocinas importantes, importantes para a ativação das células T e o recrutamento de outras células do sistema imunológico para o local da infecção.

Exemplo 66: MVAΔE5R induz níveis elevados de produção de cGAMP em BMDCs infectados.

[0696] Após a ligação do DNA, cgas é activado, e converte o ATP e GTP a GMP cíclico-AMP (cGAMP), que actua como um segundo mensageiro, o que resulta na ativação do eixo STING/TBK1/IRF3 e indução de IFN tipo I. Para determinar se o MVAΔE5R leva a níveis mais elevados de produção de cGAMP, $2,5x10^6$ BMDCs foram infectados com MVA ou MVAΔE5R a um MOI de 10. As células foram coletadas 2, 4, 6 e 8h após a infecção. As concentrações de cGAMP foram medidas incubando lisados de células com células THP1-Dual™ diferenciadas permeabilizadas, que foram derivadas a

partir da linha de células de monócitos THP-1 humana por integração estável de duas construções repórter induzíveis (**FIG. 66**). Os sobrenadantes foram coletados em 24 h, e as atividades da luciferase (como uma indicação para a ativação da via de IRF) foram medidas. Os níveis de cGAMP foram calculados por comparação com os padrões de cGAMP. MVAΔE5R induziu perto de 400 ng/10^7 células em 6h após a infecção e 900 ng/10^7 células em 8h após a infecção. Em contraste, o nível de cGAMP induzido por MVA não foi detectável por este método, que é menos sensível do que a espectrometria de massa. Dado o aumento dos níveis de cGAMP produzidos durante as primeiras 8h de infecção por MVAΔE5R, é plausível que a proteína E5 não apenas evite o reconhecimento do DNA viral parental por cGAS, mas também evite a detecção de DNA viral progênie por cGAS. Foi demonstrado que o E5 está presente na fabricação de virossomos/virais, onde ocorre a replicação do DNA viral. Estes resultados indicam que E5 inibe a produção de cGAMP por cGAS.

Exemplo 67: MVAΔE5R induz secreção de proteína IFN-β de células dendríticas plasmocitoides (pDCs).

[0697] pDCs são potentes células produtoras de IFN tipo I. Para testar se a infecção por MVAΔE5R de pDCs induz a produção de IFN tipo I, 1,2x10^5 pDCs (B220$^+$PDCA-1$^+$) classificados de esplenócitos foram infectados com MVA, Heat-iMVA ou MVAΔE5R. Esplenócitos não infectados foram incluídos como controle. Os sobrenadantes foram coletados 18 horas após a infecção. Os níveis de IFN-β nos sobrenadantes foram medidos por ELISA. MVAΔE5R induziu níveis mais elevados de secreção de proteína IFN-β de pDCs esplênicos em comparação com MVA e Heat-iMVA (**FIG. 67A**); 517,5 pg/ml nos sobrenadantes de pDCs esplênicos infectados com MVAΔE5R em função de 43,5 pg/ml nos sobrenadantes de pDCs esplênicos infectados com MVA em função de 220 pg/ml nos sobrenadantes de pDCs esplênicos infectados com calor-iMVA (**FIG. 67A**).

Exemplo 68: A secreção de proteína IFN-β induzida por MVA∆E5R de pDCs é dependente de cGAS.

[0698] pDCs comumente usam TLR7 e TLR9 endossômicos localizados para detectar RNA e DNA endossômico para eliciar respostas de IFN tipo I fortes. MyD88 é um adaptador para TLR7 e TLR9. Mais recentemente, foi demonstrado que o cGAS também é importante para a detecção de DNA citosólico em pDCs. Para testar se a via de cGAS ou MyD88 é importante para a produção de IFN tipo I induzida por MVA∆E5R, os pDCs foram classificados de BMDCs cultivados com Flt3L ($B220^+$ $PDCA\text{-}1^+$) obtidos de camundongos WT, $cGAS^{-/-}$, ou $MyD88^{-/-.}$ $2x10^5$ células foram infectadas com MVA ou MVAΔE5R. Nenhum controle de tratamento (NT) foi incluído. Os sobrenadantes foram coletados 18 horas após a infecção. Os níveis de IFN-β nos sobrenadantes foram medidos por ELISA. Os resultados mostram que a produção de IFN-ß induzido por MVA∆E5R foi abolida em $cGAS^{-/-}$ Flt3L-pDCs e permaneceu amplamente inalterada em $MyD88^{-/-}$ Flt3L-pDCs (**FIG. 68**).

Exemplo 69: A secreção de proteína IFN-β induzida por MVA∆E5R a partir de $CD103^+$ DCs é dependente de cGAS.

[0699] $CD103^+$ DCs são um subconjunto de DCs convencionais importantes para antígenos de apresentação cruzada. O fator de transcrição Batf3 é importante para o desenvolvimento de $CD103^+$ DCs. As $CD103^+$ DCs são críticas para apresentar antígenos tumorais de forma cruzada e iniciar a imunidade antitumoral. Para testar se MVA∆E5R induz secreção de proteína IFN-ß de Flt3L-$CD103^+$ DCs classificadas e se cGAS ou MyD88 é importante para a indução, $CD103^+$ DCs foram classificadas de BMDCs cultivadas com Flt3L v obtidas de camundongos WT, $cGAS^{-/-}$, ou $MyD88^{-/-.}$ $2x10^5$ células foram infectadas com MVA ou MVAΔE5R. O controle NT foi incluído. Os sobrenadantes foram coletados 18 horas após a infecção. Os níveis de IFN-β nos sobrenadantes foram medidos por ELISA. Os resultados mostram que o MVA∆E5R induz potentemente secreção de proteína IFN-ß a partir de DCs Flt3L-$CD103^+$ classificadas. A concentraçãoIFN-ß nos sobrenadantes das

CD103^{+}DCs infectadas com MVA∆E5R foi de 3610 pg/ml, enquanto a concentração de IFN-ß nos sobrenadantes de CD103^{+}DCs infectados com MVA foi de 365,5 pg/mL (**FIG. 69**). Além disso, a indução de secreção de proteína IFN-ß a de Flt3L-CD103^{+} DCs classificadas por MVA∆E5R é completamente dependente de cGAS e MyD88 não é necessário para o efeito de indução (**FIG. 69**).

Exemplo 70: A infecção por MVA∆E5R de BMDCs resulta em níveis mais baixos de morte celular em comparação com MVA.

[0700] Para quantificar a fração de BMDCs infectados com MVA∆E5R que estavam vivos após vários dias de cultura com meio regular em comparação com BMDCs infectados com MVA, os BMDCs foram infectados com MVA ou MVA∆E5R em um MOI de 10. As células foram coletadas 16h após a infecção e coradas com corante de viabilidade fixável LIVE/DEAD e submetidas a análise de citometria de fluxo. Os resultados do FACS mostram que enquanto 76,4% dos BMDCs infectados com PBS estavam vivos, apenas 10,5% dos BMDCs infectados com MVA estavam vivos. Em contraste, 66,7% dos BMDCs infectados com MVA∆E5R estavam vivos 16h após a infecção (**FIG. 70**).

Exemplo 71: infecção por MVA∆E5R promove a maturação de DC de uma maneira dependente de cGAS.

[0701] Sabe-se que os BMDCs infectados com MVA∆E5R exibem um fenótipo ativado, com extensão de dendritos. CD40 e CD86 são dois marcadores de ativação DC conhecidos. Para determinar se a infecção por MVA∆E5R induz a ativação de DC, e se a maturação de DC ocorre *por meio de* um mecanismo dependente de cGAS, os BMDCs de camundongos WT e cGAS$^{-/-}$ foram simuladamente infectados ou infectados com MVA-OVA ou MVA∆E5R-OVA em MOI de 10. As células foram coletadas 16h após a infecção e coradas para marcadores de maturação DC: CD40 (**FIG. 71A**) e CD86 (**FIG. 71B**). BMDCs expressam altos níveis de MHCII. Após a infecção por MVA∆E5R-OVA, o CD40 foi regulado positivamente em WT BMDCs, mas

não em cGAS$^{-/-}$ BMDCs (**FIG. 71A**). A infecção por MVAΔE5R-OVA de BMDCs aumentou fortemente a expressão de CD86 em BMDCs de WT, mas não em BMDCs de cGAS$^{-/-}$. 89,2% dos BMDCs de WT eram CD86 $^{+}$ após a infecção por MVAΔE5R, enquanto apenas 16,5% dos BMDCs de cGAS$^{-/-}$eram CD86 $^{+}$ após a infecção por MVAΔE5R. A infecção por MVA em BMDCs de WT resultou em 50,2% CD86 $^{+}$ BMDCs, mas apenas 16,3% CD86 $^{+}$ BMDCs de cGAS$^{-/-}$ (**FIG. 71B**). Estes resultados demonstram que a infecção por MVAΔE5R de BMDCs induz maturação de DC, que se manifesta como suprarregulação de marcadores de maturação, incluindo CD40 e CD86, de uma maneira dependente de cGAS.

Exemplo 72: infecção por MVAΔE5R de BMDCs promove a apresentação cruzada de antígeno conforme medido pela ativação de células T.

[0702] Para testar a significância funcional da ativação de BMDC induzida por MVA, MVAΔE5R, Heat-iMVA ou Heat-iMVAΔE5R, os BMDCs foram infectados com MVA, MVAΔE5R, Heat-iMVA ou Heat-iMVAΔE5R em MOI de 3 por 3h e depois incubados com (OVA por 3 h. OVA foi lavado e as células foram então incubadas com células OT-I (que reconhece o peptídeo $OVA_{257-264}$ SIINFEKL) durante 3 dias. O BMDC: razão de células OT-1 era de 1: 1. As células OT-1 foram coradas com anticorpos anti-CD69 e anti-CD8 e analisadas por citometria de fluxo. Os gráficos de pontos demonstram células CD8 $^{+}$ que expressam CD69 (**FIGS. 72A-72G**). Os resultados mostram que BMDCs pulsados com OVA infectados com MVAΔE5R: co-cultura de células OT-1 T levam a 65,7% de células CD69^{+}CD8^{+} T, enquanto BMDCs pulsados com OVA infectados com MVA: co-cultura de células OT-1 T resultou em 10,1% de células CD69^{+}CD8^{+} T. A infecção por Heat-iMVA ou Heat-iMVAΔE5R de BMDCs também resultou na ativação de células OT-1 T na co-cultura de células T BMDC: OT-1 pulsadas por OVA. Estes resultados demonstram que a infecção por MVAΔE5R, Heat-iMVA ou Heat-iMVAΔE5R de BMDCs promove a apresentação cruzada de antígeno por BMDCs.

Exemplo 73: infecção por MVA∆E5R de BMDCs promove a apresentação cruzada de antígeno conforme medido pela produção de IFN-γ por células T ativadas.

[0703] Os sobrenadantes foram coletados no final do BMDC de 3 dias: co-cultura de células OT-1 T no experimento descrito no Exemplo 72. Os níveis de IFN-γ nos sobrenadantes foram determinados por ELISA. Os resultados demonstram que as co-culturas de células T de pulsos de OVA infectadas com MVA BME5R ou Heat-iMVA∆E5R geraram altos níveis de IFN-γ proteína nos sobrenadantes (**FIG. 73**). Estes resultados demonstram que a infecção por MVA∆E5R ou Heat-iMVA∆E5R de BMDCs promove a apresentação cruzada de antígeno por BMDCs.

Exemplo 74: infecção por VACV∆E5R de BMDCs promove a apresentação cruzada de antígeno conforme medido pela produção de IFN-γ por células T ativadas.

[0704] Foi observado anteriormente que a infecção por VACV∆E5R de BMDCs induz níveis mais elevados de expressão do gene IFNB e produção de proteína IFN-ß do que MVA (**FIGS. 56A e 56B**). Para determinar se a infecção por VACV∆E5R de BMDCs promove a apresentação cruzada de antígeno, os inventores realizaram o seguinte experimento. Resumidamente, os BMDCs foram infectados com MVA, MVA∆E5R ou VACV∆E5R em MOI de 3 por 3 h; ou BMDCs foram incubados com cGAMP (20 µM) ou controle simulado durante 3h. Os BMDCs foram subsequentemente incubados com proteína OVA por 3h e, em seguida, o OVA foi lavado. As células foram então incubadas com células OT-I (que reconhecem o peptídeo $OVA_{257-264}$ SIINFEKL) por 3 dias. Os sobrenadantes foram coletados e os níveis de IFN- foram determinados por ELISA (**FIG. 74**). Os resultados demonstram que a co-cultura de células T BMDC: OT-1 com pulsos de OVA infectados com MVA∆E5R gerou o nível mais alto de IFN-γ nos sobrenadantes. BMDC pulsado com OVA infectado com VACV∆E5R: co-cultura de células OT-1 T secretou nível mais alto de IFN-γ em comparação com a co-cultura de células T BMDC: OT-1 pulsadas com OVA

tratada com cGAMP. Estes resultados indicam que a infecção por VACV∆E5R de BMDCs também promove a apresentação cruzada de antígeno.

Exemplo 75: **deleção do gene E5R do genoma MVA melhora a eficácia da vacinação**.

[0705] O MVA é um vetor de vacina importante e seguro. Dado que o MVA tem indução modesta secreção de IFN-ß o de BMDCs e efeitos modestos de ativação na maturação de DC, a identificação do mecanismo imunossupressor pode levar à melhoria do desenho do vetor de vacina baseado em MVA. Para testar se a deleção do gene E5R de MVA melhora a eficácia da vacinação, os inventores realizaram a seguinte experiência. Resumidamente, no dia 0, camundongos C57BL/6J foram vacinados com MVA-OVA ou MVA∆E5R-OVA a $2x10^7$ pfu por meio de escarificação da pele ou injeção por via intradermal. (**FIG. 75A**). Os baços foram coletados a partir de camundongos sacrificados uma semana depois e co-cultivados com o peptídeo peptídeo OVA257-264 (SIINFEKL) (10µg/mL) BMDCs pulsados por 12 h. Os níveis intracelulares de IFN-γ em células CD8+ T foram então medidos por citometria de fluxo. (*p< 0,05,***p< 0,01). **A FIG. 75B** mostra células $CD8^+$ T ativadas após vacinação por meio de escarificação da pele com MVA-OVA ou MVA∆E5R-OVA. **A FIG. 75C** mostra células $CD8^+$ T ativadas após vacinação por meio de de injeção intradérmica de MVA-OVA ou MVA∆E5R-OVA. Estes resultados demonstram que a vacinação com MVA∆E5R-OVA, quer por meio de de escarificação da pele ou injeção intradérmica, leva a células $CD8^+$ T ativadas mais altas em comparação com a vacinação com MVA-OVA. Portanto, a remoção do gene E5R do genoma MVA melhora a eficácia da vacinação.

Exemplo 76: infecção por MVA∆E5R induz a expressão do gene IFNB e a secreção de IFN-β de fibroblastos primários murinos de uma maneira dependente de cGAS.

[0706] Além de células dendríticas e macrófagos, os inventores investigaram se a infecção por MVA∆E5R de fibroblastos dérmicos da pele também induz a produção de IFN tipo I. Fibroblastos dérmicos da pele foram

gerados a partir de camundongos WT e cGAS$^{-/-}$ C57B/6J fêmeas. As células foram infectadas com MVA, MVA∆E5R, Heat-iMVA ou Heat-iMVA∆E5R. As células e os sobrenadantes foram coletados 16h após a infecção. Os resultados de RT-PCR mostraram que a infecção por MVA∆E5R desencadeou a expressão do gene IFNB em fibroblastos dérmicos WT, mas não em células cGAS$^{-/-}$(**FIG.76A**). Os resultados de ELISA demonstraram a secreção de proteína IFN-β induzida por MVA∆E5R a partir de fibroblastos dérmicos WT infectados com MVARE5R, mas não em células cGAS$^{-/-}$infectadas (**FIG. 76B**). Em contraste, a infecção por MVA de WT induziu nível mais baixo de secreção de proteína IFN-β de fibroblastos dérmicos de WT (**FIG. 76B**). A concentração de proteína IFN-β nos sobrenadantes de fibroblastos dérmicos WT infectados com MVA foi de 350 pg/ml, em comparação com 10970 pg/ml nos sobrenadantes de fibroblastos dérmicos WT infectados com MVA∆E5R. Estes resultados demonstram que o E5 é um inibidor potente da produção de IFN em fibroblastos dérmicos infectados com MVA, e o MVA∆E5R gera um forte efeito de ativação imunológica nos fibroblastos dérmicos da pele. É provável que esse efeito de ativação imunológica contribua para o aumento da eficácia da vacina por meio de escarificação da pele ou infecção intradérmica. Além disso, é provável que o MVA∆E5R ative as células do estroma tumoral ou fibroblastos associados ao câncer por meio de mecanismos similares, o que contribuiria para seu efeito na alteração do microambiente imunossupressor do tumor.

Exemplo 77: MVA∆E5R ganha sua capacidade de replicar seu DNA em fibroblastos dérmicos primários de pele deficientes em cGAS ou IFNAR1.

[0707] Para testar se cGAS ou IFNAR1 contribuem para a restrição do hospedeiro de vírus MVA ou MVA∆E5R em fibroblastos dérmicos da pele, fibroblastos dérmicos primários de pele de camundongos WT, cGAS$^{-/-}$ ou IFNAR1$^{-/-}$foram infectados com MVA ou MVA∆E5R em um MOI de 3. As células foram coletadas 1, 4, 10 e 24h após a infecção. Os números de cópias do DNA viral foram determinados por PCR quantitativo. Embora MVA tem capacidade

limitada de se replicar genoma viral em fibroblastos dérmicos WT, a sua capacidade de replicação foi drasticamente aumentada em células cGAS$^{-/-}$ e modestamente em células IFNAR1$^{-/-}$**(Figs. 77A e 77B**). Por exemplo, o número de cópias de DNA de MVA aumentou de 2 vezes em 4 h, para 28 vezes em 10h e para 41 vezes em 24h após a infecção em comparação com 1h após a infecção em fibroblastos dérmicos WT. Em células cGAS$^{-/-}$, o número de cópias de DNA de MVA aumentou de 8 vezes em 4 h, para 120 vezes em 10h e para 390 vezes em 24h após a infecção em comparação com 1h após a infecção. Em células IFNAR1$^{-/-}$, o número de cópias de DNA de MVA aumentou de 5 vezes em 4 h, para 50 vezes em 10h e para 107 vezes em 24h após a infecção em comparação com 1h após a infecção (**FIGS. 77A e 77B**).

[0708] Da mesma forma, em fibroblastos dérmicos WT,, o número de cópias de MVA∆E5R DNA aumentou de 1 vezes em 4 h, para 18 vezes em 10h e para 21 vezes em 24h após a infecção em comparação com 1h após a infecção. Em células cGAS$^{-/-}$, o número de cópias de de DNA de MVA∆E5R aumentou de 1,8 vezes em 4 h, para 87 vezes em 10h e para 832 vezes em 24h após a infecção em comparação com 1h após a infecção. Em células IFNAR1$^{-/-}$, o número de cópias de DNA de MVA∆E5R aumentou de 1,9 vezes em 4 h, para 57 vezes em 10h e para 181 vezes em 24h após a infecção em comparação com 1h após a infecção (**FIGS. 77C e 77D**). Estes resultados demonstram que o mecanismo de detecção mediado por cGAS em fibroblastos dérmicos foi crítico no controle da replicação do DNA viral de MVA e MVA∆E5R, e o loop de feedback positivo de IFN tipo I mediado por IFNAR desempenha um papel parcial.

Exemplo 78: MVA∆E5R ganha sua capacidade de gerar vírus de progênie infecciosa em fibroblastos dérmicos primários de pele deficientes em cGAS.

[0709] O MVA não é replicativo em fibroblastos dérmicos. Para determinar se a via de detecção de DNA citosólico mediado por cGAS e a via de IFANR desempenham um papel na restrição da produção de vírions

infecciosos, fibroblastos dérmicos primários de pele de camundongos WT, cGAS$^{-/-}$ou IFNAR1$^{-/-}$foram infectados com MVA ou MVA∆E5R a um MOI de 0,05. As células foram coletadas 1, 24, e 48h após a infecção. Os títulos virais foram determinados por titulação em células BHK21. Em fibroblastos dérmicos WT, tanto o MVA quanto o MVA∆E5R são não replicativos. No entanto, em células cGAS$^{-/-}$, os títulos de MVA em 48h após a infecção aumentaram 148 vezes em comparação com seus títulos em 1h após a infecção (**FIGS. 78A e 78B**). Mais surpreendentemente, os títulos de MVA∆E5R em 48h após a infecção aumentaram 583 vezes em comparação com seus títulos em 1h após a infecção (**FIGS. 78C e 78D**). Em células IFNAR1$^{-/-}$, MVA e MVA∆E5R aumentaram seus títulos em 48h após a infecção em 12 e 19 vezes, respectivamente, em comparação com seus títulos em 1h após a infecção (**FIGS. 78A-77D**). Estes resultados demonstram que o cGAS desempenha um papel crítico na restrição da replicação de MVA e MVA∆E5R em fibroblastos dérmicos da pele.

Exemplo 79: infecção por MVA∆E5R de células de melanoma murino induz a expressão do gene IFNB e a secreção da proteína IFN-β de uma maneira dependente de STING.

[0710] Para determinar se a infecção por MVA∆E5R de células de tumor induz a expressão do gene IFNB e a secreção da proteína IFN-β, células WT e STING-/-B16-F10 (geradas pelo direcionamento do gene CRISPR-cas9 de STING) foram infectadas com MVA ou MVA ∆E5R a um MOI de 10. As células foram coletadas 18h após a infecção. Os RNAs foram extraídos e a análise quantitativa de PCR em tempo real foi realizada. Os resultados de RT-PCR demonstram que o MVA∆E5R induziu a expressão do gene IFNB em células WT B16-F10, mas não em células STING$^{-/-}$. A infecção por MVA demonstrou uma indução mais fraca da expressão do gene IFNB em comparação com MVA∆E5R em células WT B16-F10 (**FIG. 79A**). Os resultados de ELISA dos níveis de proteína de IFN-β nos sobrenadantes de células WT e STING-/-B16-F10 infectadas com MVA ou MVA∆E5R coletadas 18h após a

infecção demonstraram que MVA∆E5R induz um nível modesto de secreção de proteína de IFN-β de Células WT B16-F10, mas não em células STING$^{-/-}$ **(FIG. 79B**). A infecção por MVA não resultou na secreção da proteína IFN-β (**FIG. 79B**).

Exemplo 80: infecção por MVA∆E5R de células de melanoma murino induz a liberação de ATP, que é uma marca registrada da morte de células imunogênicas.

[0711] A FIG. 80 mostra que a infecção por MVA∆E5R de células de melanoma murino induz a liberação de ATP, que é uma marca registrada da morte de células imunogênicas. Resumidamente, as células B16-F10 foram infectadas com vaccinia WT, MVA ou MVA∆E5R a um MOI de 10. As células foram lavadas e meio fresco foi adicionado uma hora após a infecção do vírus. Os sobrenadantes foram coletados 48 horas após a infecção. Os níveis de ATP foram determinados usando *ATPlite 1step Luminescence ATP Detection Assay System (PerkinElmer, Waltham, MA*). Os resultados mostraram que a infecção por MVA e MVA∆E5R de células de melanoma murino induziu maior liberação de ATP do que o vírus vaccinia, o que demonstra que MVA e MVA recombinante induziram morte celular imunogênica em células de tumor. Estudos futuros examinarão se a infecção de células de tumor por MVA ou MVA∆E5R também induz a liberação de HMGB1, outra marca registrada da morte celular imunogênica.

Exemplo 81: Geração de MVA∆E5R recombinante expressando hFlt3L e hOX40L.

[0712] Este exemplo descreve a geração de vírus MVA∆E5R recombinante que expressa hFlt3L e hOX40L. **A FIG. 81** mostra um esquema de geração de MVA∆E5R recombinante expressando hFlt3L e hOX40L por meio de de recombinação homóloga nos loci E4L e E6R do genoma de MVA. O vetor pMA foi usado para inserir um único cassete de expressão projetado para expressar hFlt3L e hOX40L usando o promotor precoce e tardio sintético viral de vaccinia (PsE/L). A sequência de codificação de hFlt3L e hOX40L foi

separada por uma cassete incluindo um síto de clivagem de furina seguido por uma sequência Pep2A. A recombinação homóloga que ocorreu nos loci E4L e E6R resulta na inserção do cassete de expressão para hFlt3L e hOX40L. **As FIGS. 82A e 82B** mostram que o vírus MVA∆E5R-hFlt3L-hOX40L recombinante tem a inserção esperada conforme determinado por análise de PCR. A inserção de DNA também foi submetida ao sequenciamento Sanger e as sequências foram as esperadas.

Exemplo 82: Expressão de hFlt3L e hOX40L por células infectadas com MVA∆E5R-hFlt3L-hOX40L.

[0713] Para testar se o vírus MVA∆E5R-hFlt3L-hOX40L recombinante expressa hFlt3L e hOX40L na superfície das células infectadas, BHK-21, células de melanoma B16-F10 murino e células de melanoma SK-MEL28 humanas foram plaqueadas e infectadas com MVA ou MVA∆E5R-hFlt3L-hOX40L em MOI 10. Um controle de infecção simulada sem vírus foi incluído. 24 horas após a infecção, as células foram coletadas para coloração de superfície com anticorpos hFlt3L e hOX40L. A expressão de superfície de hFlt3L e hOX40L foi analisada por análise FACS. **FIG.83A** são gráficos de pontos da expressão de superfície de hFlt3L e hOX40L em células BHK-21 após a infecção. **FIG.83B** são gráficos de pontos da expressão de superfície de hFlt3L e hOX40L em células B16-F10 após a infecção. **FIG.83C** são gráficos de pontos da expressão de superfície de hFlt3L e hOX40L em células SK-MEL28 após a infecção. Os resultados mostram que MVA∆E5R-hFlt3L-hOX40L expressou hOX40L e hFlt3L eficientemente em células BHK-21, B16-F10 e SK-MEL28. Dado que MVA∆E5R-hFlt3L-hOX40L não se replica em B16-F10 ou SK-MEL28, a expressão de hFlt3L e hOX40L nas células de tumor infectadas foi robusta.

[0714] A análise de Western blot foi realizada para testar se o vírus MVA∆E5R-hFlt3L-hOX40L expressa hFlt3L e hOX40L em células BHK21 (**FIG. 84**). Resumidamente, as células BHK21 foram falsamente infectadas ou infectadas com MVA ou MVA∆E5R-hFlt3L-hOX40L. Os lisados de células

foram coletados 24h após a infecção. Os resultados de Western blot mostram que hFlt3L e hOX40L foram expressos por células BHK21 infectadas com MVAΔE5R-hFlt3L-hOX40L, mas não por MVA (**FIG. 84**).

Exemplo 83: Geração de VACV-TK--anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-mOX40L recombinante.

[0715] Este exemplo descreve a geração de um vírus vaccinia ou MVA recombinante que expressa um anticorpo que visa seletivamente o antígeno 4 do linfócito T citotóxico no locus TK e expressa os genes Flt3L humano e OX40L murino no locus E5R (VAC-TK$^-$-anti-muCTLA-4-E5R$^-$-hFlt3L-mOX40L). A **FIG. 85A** mostra um diagrama esquemático do com um único cassete de expressão projetado para expressar a cadeia pesada e leve do anticorpo usando o promotor precoce e tardio sintético viral de vaccinia (PsE/L). A sequência de codificação da cadeia pesada (muIgG2a) e da cadeia leve de 9D9 foi separada por um cassete incluindo um sítio de clivagem de furina seguido por uma sequência de peptídeo 2A (Pep2A) para permitir o salto de ribossomo. O plasmídeo pCB foi construído contendo o gene anti-mu-CTLA-4 sob o controle de vaccinia PsE/L, bem como o *gene de xantina-guanina fosforibosil transferase de E. coli* (gpt) sob o controle do promotor P7.5 de vaccinia flanqueado pelo gene da timidina quinase (TK) em ambos os lados. O vírus recombinante expressando anti-mu-CTLA-4 a partir do locus TK foi gerado por meio de de recombinação homóloga no locus TK entre o DNA do plasmídeo pCB e o DNA genômico viral. A **FIG. 85B** é o diagrama esquemático do uso do promotor inicial e tardio sintético viral vaccinia (PsE/L) para expressar Flt3L humano e OX40L murino como uma proteína de fusão em um único cassete de expressão. A sequência de codificação de Flt3L humano e OX40L murino foi separada por um cassete incluindo um sítio de clivagem de furina seguido por uma sequência de peptídeo 2A (Pep2A), que permitiu o salto de ribossomo Foi construído um plasmídeo pUC57 contendo Flt3L humano e gene de fusão OX40L murino flanqueado pelos genes E4L e E6R em ambos os lados. O vírus recombinante que expressa Flt3L humano e proteína de fusão

OX40L murina do locus E5R foi gerado por meio de de recombinação homóloga no locus E5R entre o DNA do plasmídeo pUC57 e o DNA genômico viral. Para gerar o VAC-TK$^-$-anti-muCTLA-4-E5R$^-$-hFlt3L-mOX40L, as primeiras células BSC-40 foram infectadas com o vírus vaccinia em uma multiplicidade de infecção (MOI) de 0,05 por 1h, e foram então transfectadas com os DNAs de plasmídeo pCB descritos acima. As células infectadas foram coletadas em 48 h. Os vírus recombinantes foram selecionados por meio de cultura adicional em meio de seleção gpt incluindo MPA, xantina e hipoxantina, e purificados por placa. A análise de PCR foi realizada para identificar vírus recombinantes com deleção de parte do gene TK e inserção de anti-muCTLA-4. A recombinação homóloga que ocorreu no locus TK resultou na inserção de cassetes de expressão anti-mu-CTLA-4 e gpt no DNA genômico viral para gerar VAC-TK$^-$-anti-muCTLA-4. Na segunda etapa, as células BSC-40 foram infectadas com VAC-TK$^-$-anti-muCTLA-4 a um MOI de 0,1 por 1 h, e então foram transfectadas com os DNAs do plasmídeo pUC57 descritos acima. As células infectadas foram coletadas em 48 h. Os vírus recombinantes foram selecionados por meio de do marcador GFP e purificação de placa. A análise de PCR foi realizada para identificar vírus recombinantes com deleção do gene E5R e com inserção de Flt3L humano e gene de fusão OX40L murino para gerar vírus VAC-TK$^-$-anti-muCTLA-4-E5R$^-$-hFlt3L-mOX40L recombinante.

Exemplo 84: Verificação por PCR de VVACV-TK$^-$-anti-muCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-mOX40L recombinante e a expressão de anticorpo anti-muCTLA-4 por células infectadas com o vírus recombinante.

[0716] As análises de PCR foram usadas para verificar o VACV-TK$^-$-anti-muCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-mOX40L recombinante (**FIGS. 86A e 86B**). Para determinar se a infecção por vírus recombinante resulta na produção de anticorpos anti-CTLA-4, células de melanoma SK-MEL-28 humanas foram falsamente infectadas ou infectadas com E3LΔ83N-TK$^-$-vector, E3LΔ83N-TK$^-$-hFlt3L-anti-muCTLA-4, E3LΔ83N-TK$^-$-hFlt3L-anti-muCTLA-4-C7L$^-$-mOX40L, VACV, VAC-TK$^-$-anti-muCTLA-4-C7L$^-$-mOX40L, ou VAC-TK$^-$-anti-muCTLA-4-

E5R$^-$-hFlt3L-mOX40L em um MOI de 10. Os lisados de células foram coletados 24 horas após a infecção e os polipeptídeos foram separados utilizando SDS-PAGE a 10%. O anticorpo IgG anti-camundongo ligado a HRP (cadeia pesada e leve) foi usado para detectar comprimento total (FL), cadeia pesada (HC) e cadeia leve (LC) de anticorpos anti-muCTLA-4. A análise de Western blot mostra a expressão de comprimento total (FL), cadeia pesada (HC) e cadeia leve (LC) de anticorpos anti-CTLA-4 em linhas de células de melanoma SK-MEL-28 após infecção por vírus (**FIG. 86C**). Consequentemente, estes resultados demonstram que os vírus recombinantes da presente tecnologia têm a capacidade de expressar anticorpos anti-CTLA-4 em células infectadas e são úteis em métodos para administrar os anticorpos às células.

Exemplo 85: Vaccinia E5 é altamente conservado na família dos poxvírus.

[0717] Vaccinia E5 é altamente conservado na família dos poxvírus. **A FIG. 87** mostra os alinhamentos de sequência de proteínas de ortólogos E5 de vários membros da família dos poxvírus. Os ortólogos E5 exibem diferenças nos terminais N, mas alta conservação do terminal médio ao C. **A FIG. 88A** mostra os alinhamentos de sequência de proteína de E5 de Vaccinia WR e vírus vaccinia modificado de Ankara (MVA). O MVA não possui os primeiros 10 aminoácidos e as mutações pontuais no terminal N em comparação com o VACV. **A FIG. 88B** mostra os alinhamentos de sequência de proteína de E5 do vírus vaccinia e M31, que é o ortólogo E5 no vírus mixoma. M31 e E5 do vírus vaccinia compartilham cerca de 20% de homologia.

Exemplo 86: O vírus mixoma M31, um ortólogo da vaccinia E5, inibe a via de IFN-β induzida por cGAS e STING.

[0718] Para investigar o papel do vírus Mixoma M31, um ortólogo de vaccinia E5, na via de IFN-β induzida por cGAS e STING, células HEK293T foram transfectadas com plasmídeos que expressam cGAS murino, STING humano juntamente com plasmídeos de expressão de controle de vetor E5R, M31R ou pcDNA. Após 24h, as células foram coletadas para um ensaio de

luciferase. **A FIG. 89A** demonstrou que tanto E5 quanto M31 foram capazes de inibir a produção de IFN-β. O Mixoma M31 demonstrou um efeito de inibição mais forte do que o E5. **A FIG. 89B** mostra que as células HEK293T foram transfectadas com plasmídeos que expressam STING humano juntamente com o plasmídeo que expressa o controle do vetor de E5R, M31R ou pcDNA. 24 horas após a transfecção, o sinal da luciferase foi determinado. E5 não bloqueou a produção de IFN-β enquanto M31 ainda inibiu a produção de IFN-β induzida por STING, o que demonstrou que M31 pode atuar a jusante da via de IFN-β induzida por cGAS e STING.

Exemplo 87: Vaccinia E5 promove a ubiquitinação de cGAS.

[0719] Para avaliar se E5 bloqueia a via de IFN-β induzida por cGAS, promovendo a ubiquitinação de cGAS, as células HEK293T foram transfectadas com Flag-cGAS e HA-ubiquitina. Após 24 h, as células foram infectadas com WT VACV ou VACV∆E5R. A lise celular foi coletada 6 hpi. Os cGAS foram imunoprecipitados com o anticorpo anti-Flag e a ubiquitinação foi detectada pelo anticorpo anti-HA (**FIG. 90A**). **A FIG. 90B** mostra a análise de Western blot de cGAS e β-actina em lisados de células inteiras (WCL). O VACV induziu a ubiquitinação do cGAS após a infecção, enquanto o VACV∆E5R induziu um nível mais baixo de ubiquitinação do cGAS, o que demonstrou que o vaccinia E5 promove a ubiquitinação do cGAS.

Exemplo 88: administração intratumoral de MVA∆E5R retarda o crescimento do tumor e prolonga a sobrevivência no modelo de implantação de tumor unilateral de melanoma B16-F10 murino.

[0720] Para testar se a administração IT de MVA∆E5R gera efeitos antitumorais, um modelo de implantação de tumor B16-F10 murino unilateral foi usado. Resumidamente,$5x10^5$ células de melanoma B16-F10 foram implantadas por via intradérmica para o flanco direito de camundongos C57B/6. Oito dias após a implantação do tumor, os tumores foram injetados com PBS ou $4x10^7$ pfu de MVA, MVA∆E5R ou Heat-iMVA duas vezes por semana. Os tamanhos dos tumores foram medidos duas vezes por semana e a

sobrevivência dos camundongos foi monitorada (**FIG. 91A**). A taxa de sobrevivência dos camundongos é mostrada na **FIG. 91B**. Em camundongos tratados com PBS, os tumores B16-F10 cresceram rapidamente, o que resultou em morte precoce com uma sobrevida média de 11 dias. A injeção intratumoral de MVAΔE5R teve efeito antitumoral superior ao MVA, o que resultou em crescimento tardio do tumor e melhora na sobrevida. IT de MVAΔE5R recebeu efeito antitumoral equivalente a Heat-iMVA com 60% dos camundongos sobreviveram em ambos os grupos tratados com MVAΔE5R e Heat-iMVA.

Exemplo 89: MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)mOX40LΔE5R de BMDCs resulta em níveis mais elevados de expressão do gene IFNB e IFN-ß secreção de proteína em comparação com MVAΔE5R.

[0721] As FIGS. 92A-C mostram que a infecção por MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)mOX40LΔE5R de BMDCs resulta em níveis mais elevados de expressão do gene IFNB e IFN- β secreção de proteína em comparação com MVAΔE5R. **A FIG. 92A-92C** mostram diagramas esquemáticos de geração de vírus MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40LΔE5R. A primeira etapa envolveu a geração de MVAΔC7L-hFlt3L por meio de recombinação homóloga nos loci C8L e C6R, substituindo o gene C7L por hFlt3L sob o controle do promotor PsE/L (FIG. A segunda etapa envolveu a geração de MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L por meio de recombinação homóloga nos loci TK, substituindo o gene TK por mOX40L sob o controle do promotor PsE/L (FIG. O vírus resultante foi descrito nas **FIGS. 5A e 5B**. A terceira etapa foi gerar MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40LΔE5R por meio de recombinação homóloga nos loci E4L e E6R, substituindo o gene E5R por mCherry sob o controle do promotor P7.5 (FIG. **A FIG. 92D** mostra resultados de RT-PCR da expressão do gene IFNB em BMDCs infectados com MVAΔE5R, MVAΔE5R, MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L, ou MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)mOX40LΔE5R. WT e IFNAR$^{-/-}$ BMDCs foram falsamente infectados ou infectados com MVAΔE5R, MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L, ou MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)mOX40LΔE5R em um MOI de 10. As células foram coletadas 16h após a infecção e RT-PCR foi realizado. **A FIG.**

92E mostra resultados de ELISA de níveis de proteína IFN-β nos sobrenadantes de BMDCs infectados com MVAΔE5R, MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L, ou MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)mOX40LΔE5R. WT e IFNAR$^{-/-}$ BMDCs foram falsamente infectados ou infectados com MVAΔE5R, MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L, ou MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)mOX40LΔE5R em um MOI de 10. Os sobrenadantes foram coletados 16h após a infecção e ELISA foi realizado para medir níveis de proteína IFN-β. MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40LΔE5R induziu maior produção de IFN-β em ambos os níveis de RNA e secreção de proteína em BMDCs WT em comparação com MVAΔE5R e MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L. Em IFNAR$^{-/-}$BMDCs, a produção de IFN-β induzida por MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40LΔE5R foi muito menor do que em WT BMDCs, o que demonstrou que produção de IFN-β induzida por MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40LΔE5R é parcialmente dependente da via de IFNAR.

Exemplo 90: Gerar MVAΔC7LΔE5R-hFlt3L-mOX40L e MVAΔC7L-OVA-ΔE5R-hFlt3L-mOX40L.

[0722] As FIGS. 93A e 93B mostram o esquema de geração de MVAΔC7LΔE5R-hFlt3L-mOX40L e MVAΔC7L-OVA-ΔE5R-hFlt3L-mOX40L. **A FIG. 93A** mostra o esquema de geração de MVAΔC7LΔE5R-hFlt3L-mOX40L. O plasmídeo pMA foi construído para usar o promotor inicial e tardio sintético viral vaccinia (PsE/L) para expressar Flt3L humano e OX40L murino como uma proteína de fusão em um único cassete de expressão. A sequência de codificação de Flt3L humano e OX40L murino foi separada por um cassete incluindo um sítio de clivagem de furina seguido por uma sequência de peptídeo 2A (Pep2A). O vírus recombinante que expressa Flt3L humano e proteína de fusão OX40L murino do locus E5R foi gerado por meio de de recombinação homóloga nos loci E4L e E6R entre o plasmídeo pMA e o genoma viral MVAΔC7L. **A FIG. 93B** mostra o esquema de geração de MVAΔC7L-OVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L. O vírus recombinante que expressa Flt3L humano e proteína de fusão OX40L murino do locus E5R foi gerado por

meio de de recombinação homóloga nos loci E4L e E6R entre o plasmídeo pMA e o genoma viral MVAΔC7L-OVA.

Exemplo 91: O mixoma M64 tem um papel inibidor da ativação do elemento de resposta sensível ao IFN induzida por IFN-β.

[0723] Para determinar se o mixoma M62 ou M64 tem efeito inibitório semelhante de C7 na sinalização IFNAR, células HEK293T foram transfectadas com repórter ISRE-firefly luciferase, um plasmídeo de controle pRL-TK que expressa *Renilla* luciferase, mixoma M62R, Myxoma M62R-HA, Myxoma M64R, Myxoma M64R-HA, expressão de vaccinia C7L ou plasmídeo de controle. 24h após a transfecção, as células foram tratadas com IFN-β por mais 24 horas antes da coleta. As atividades da luciferase foram medidas. Os resultados demonstram que a superexpressão transitória de mixoma M64 inibe a ativação de ISRE induzida por IFN-β (**FIG. 94A**).

[0724] Para determinar se o mixoma M62 ou M64 tem efeito inibitório semelhante de C7 na ativação do promotor IFNB induzida por STING, células HEK293T foram transfectadas com repórter ISRE-firefly luciferase, um plasmídeo de controle pRL-TK que expressa *Renilla* luciferase e plasmídeo que expressa STING, juntamente com mixoma M62R, Myxoma M62R-HA, Myxoma M64R, Myxoma M64R-HA, vaccinia C7L expressando ou plasmídeo de controle. Os resultados demonstram que a superexpressão transitória de mixoma M64 ou M62 falha em inibir a ativação do promotor IFNB induzida por STING (**FIG. 94B**).

Exemplo 92: A combinação de injeção IT dos poxvírus projetados da presente tecnologia com administração sistêmica de qualquer combinação de (i) um ou mais agentes bloqueadores de ponto de verificação imunológico e/ou um ou mais estimuladores do sistema imunológico; (ii) um ou mais medicamentos anticâncer; e (iii) um fármaco imunomodulador (*isto é*, fingolimode (FTY720)) é mais eficaz do que o vírus IT sozinho no tratamento de um tumor sólido.

[0725] Teste para saber se a combinação com TI administração dos poxvírus modificados da presente tecnologia (por exemplo, composição de MVAΔE3L-OX40L, MVAΔC7L-OX40L, MVAΔC7L-hFlt3L-OX40L, MVAΔC7LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, VACVΔC7L-OX40L, VACVΔC7L-hFlt3L-OX40L, VACVΔE5R, VACV-TK$^-$-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L, VACVΔB2R, VACVE3LΔ83NΔB2R, VACVΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83NΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12-ΔB2R, MYXVΔM31R, MYXVΔM31R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM63R, MYXVΔM64R, MVAΔWR199, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔWR199, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12ΔC11R, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12ΔC11R-hIL-15/IL-15α, VACVΔE5R-IL-15/IL-15Rα, VACVΔE5R-IL-15/IL-15Rα-OX40L, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200-hIL-15/IL-15Rα, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200ΔC11R, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200-hIL-15/IL-15RαΔC11R, MYXVΔM63RΔM64R, MYXVΔM62R, MYXVΔM62RΔM63RΔM64R, MYXVΔM31R, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R, MYXVΔM63RΔM64R-hFlt3L-OX40L,

MYXVΔM62RΔM63RΔM64R-hFlt3L-OX40L,
MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L,
MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12,
MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-IL-15/IL-15Rα,
MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-anti-CTLA-4, e/ou MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-IL-15/IL-15Rα-anti-CTLA-4 e administração sistêmica de qualquer combinação dentre: (i) um ou mais agentes bloqueadores do ponto de verificação imunológico e/ou um ou mais estimuladores do sistema imunológico; (ii) um ou mais medicamentos anticâncer; e (iii) uma medicamento imunomoduladora (*ou seja*, fingolimode (FTY720)) teve eficácia antitumoral superior em comparação com o vírus IT sozinho contra grande melanoma B16-F10 estabelecido, 5x10 ^{5} células são implantadas por via intradermal nos flancos direitos de C57B/6 camundongos. Nove dias após a implantação do tumor, quando os tumores tinham 5 mm de diâmetro, eles são tratados com: (a) IT de PBS; (B) IT de MVAΔE3L-OX40L, MVAΔC7L-OX40L, MVAΔC7L-hFlt3L-OX40L, MVAΔC7LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, VACVΔC7L-OX40L, VACVΔC7L-hFlt3L-OX40L, VACVΔE5R, VACV-TK^{-}-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L, VACVΔB2R, VACVE3LΔ83NΔB2R, VACVΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83NΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12-ΔB2R, MYXVΔM31R, MYXVΔM31R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM63R, MYXVΔM64R, MVAΔWR199, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔWR199, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12ΔC11R, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199-hIL-12ΔC11R-hIL-15/IL-15α, VACVΔE5R-IL-15/IL-15Rα, VACVΔE5R-IL-15/IL-15Rα-OX40L, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200-hIL-15/IL-15Rα, VACVΔE3L83N-ΔTK-

anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200ΔC11R, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200-hIL-15/IL-15RαΔC11R, MYXVΔM63RΔM64R, MYXVΔM62R, MYXVΔM62RΔM63RΔM64R, MYXVΔM31R, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R, MYXVΔM63RΔM64R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-IL-15/IL-15Rα, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-anti-CTLA-4, e/ou MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-IL-15/IL-15Rα-anti-CTLA-4 mais IP de (i) um ou mais agentes bloqueadores do ponto de verificação imunológico e/ou um ou mais estimuladores do sistema imunológico; (ii) um ou mais medicamentos anticâncer; e (iii) uma medicamento imunomoduladora (*isto é*, fingolimode (FTY720)); duas vezes por semana. Os volumes do tumor são medidos e a sobrevivência dos camundongos é monitorada. Prevê-se que a administração combinada de um ou mais poxvírus projetados da presente tecnologia e: (i) um ou mais agentes bloqueadores do ponto de verificação imunológico e/ou um ou mais estimuladores do sistema imunológico; (ii) um ou mais medicamentos anticâncer; e/ou (iii) uma medicamento imunomoduladora (*isto é*, fingolimode (FTY720)) resultará em efeitos antitumorais aumentados em comparação com a administração do poxvírus modificado sozinho.

[0726] Consequentemente, estes resultados mostrarão que a administração combinada de poxvírus projetados da presente tecnologia e (i) um ou mais agentes bloqueadores de ponto de verificação imunológico e/ou um ou mais estimuladores do sistema imunológico; (ii) um ou mais medicamentos anticâncer; e/ou (iii) um fármaco imunomodulador (*isto é*, fingolimode (FTY720)), são úteis em métodos para o tratamento de tumores sólidos. É ainda antecipado que a administração combinada de poxvírus

manipulados da presente tecnologia e (i) um ou mais agentes bloqueadores do ponto de verificação imunológico e/ou um ou mais estimuladores do sistema imunológico; (ii) um ou mais medicamentos anticâncer; e/ou (iii) uma medicamento imunomoduladora (*isto é*, fingolimode (FTY720)) produzirá efeitos sinérgicos a esse respeito em comparação com a administração de poxvírus modificado sozinho.

Exemplo 93: Geração de MVA∆E5R recombinante expressando hFlt3L e mOX40L

[0727] Este exemplo descreve a geração de vírus MVA∆E5R recombinante que expressa hFlt3L e mOX40L. **A FIG. 95** mostra um esquema de geração de MVA∆E5R recombinante expressando hFlt3L e mOX40L por meio de de recombinação homóloga nos loci E4L e E6R do genoma de MVA. O vetor pUC57 é usado para inserir um único cassete de expressão modificado para expressar hFlt3L e mOX40L usando o promotor precoce e tardio sintético viral de vaccinia (PsE/L). A sequência de codificação do hFlt3L e mOX40L foi separada por um sítio de clivagem de furina seguido por uma sequência Pep2A. A recombinação homóloga que ocorreu nos loci E4L e E6R resulta na inserção do cassete de expressão para hFlt3L e mOX40L.

Exemplo 94: Expressão de hFlt3L e mOX40L por células infectadas com MVA∆E5R-hFlt3L-mOX40L.

[0728] Para testar se o vírus MVA∆E5R-hFlt3L-mOX40L recombinante expressa hFlt3L e mOX40L na superfície de células infectadas, os seguintes experimentos foram realizados. BHK-21, células de melanoma B16-F10 murino e células de melanoma SK-MEL28 humano foram infectadas com MVA ou MVA∆E5R-hFlt3L-mOX40L em MOI 10. Nenhum controle de infecção simulada por vírus foi incluído. 24 horas após a infecção, as células foram coletadas para coloração de superfície com anticorpos hFlt3L e mOX40L. A expressão de superfície de hFlt3L e mOX40L foi analisada por análise FACS. **A FIG. 96A** são pontos gráficos de expressão de superfície de hFlt3L e mOX40L em células BHK-21, B16-F10 e SK-MEL28 após a infecção.

FIG.96B são gráficos de barras da intensidade média de fluorescência (MFI) da expressão de hFlt3L e mOX40L em células BHK-21, B16-F10 e SK-MEL28 após a infecção. Os resultados mostram que MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L expressou mOX40L e hFlt3L eficientemente em células BHK-21, B16-F10 e SK-MEL28 24h após a infecção. Dado que MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L não se replica em B16-F10 ou SK-MEL28, a expressão de hFlt3L e mOX40L nas células de tumor infectadas foi robusta.

Exemplo 95: A injeção IT de MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L induz imunidade sistêmica antitumoral de células T mais forte em comparação com MVA, MVAΔE5R ou Heat-iMVA.

[0729] ELISpot foi realizado para avaliar a geração de células T antitumorais específicas nos baços de camundongos tratados com MVA, MVAΔE5R, MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L ou Heat-iMVA. Resumidamente, as células de melanoma B16-F10 foram implantadas por via intradermica na pele raspada nos flancos direito ($5x10^5$ células) e esquerdo ($2,5x10^5$ células) de um camundongo C57BL/6J. 8 dias após a implantação, os tumores maiores no flanco direito foram injetados duas vezes por semana com $4x10^7$ pfu de MVA, MVAΔE5R ou MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L, ou com uma quantidade equivalente de Heat-iMVA. Os baços foram coletados para análise ELISpot **(FIG. 97).** 1.000.000 esplenócitos foram cultivados com $1,5x10^5$ células B16-F10 irradiadas durante a noite a 37°C em anti-IFN-γ microcavidades de placa BD ELISpot revestidos. Os esplenócitosforam estimuladas com células B16-F10 irradiadas com um γ-irradiador e secreção de IFN-γ foi detectada com um anticorpo anti-IFN-γ. **As FIGs. 98A-98B** mostra imagens representativas de pontos de IFN-γ^+ por 1.000.000 esplenócitos de camundongos individuais tratados com PBS, MVAΔE5R, MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L ou Heat-iMVA. **As FIGs. 99A-99C** mostra o número de pontos IFN-γ^+ por 1.000.000 esplenócitos de camundongo individual em cada grupo tratado com PBS, MVAΔE5R, MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L ou Heat-iMVA. Estes resultados demonstram que a

injeção IT de MVA∆E5R-hFlt3L-mOX40L é mais eficaz do que MVA, MVA∆E5R ou Heat-iMVA na geração de células T antitumorais em camundongos tratados em um modelo de implantação bilateral de melanoma B16-F10 murino.

Exemplo 96: A injeção intratumoral (IT) de MVA∆E5R-hFlt3L-mOX40L leva à ativação de células $CD8^+$ e $CD4^+$ T em tumores distantes injetados e não injetados no modelo de implantação de tumor bilateral B16-F10.

[0730] Para avaliar se IT de MVA∆E5R-hFlt3L-mOX40L resulta na geração de imunidade antitumoral local e sistêmica, um modelo de implantação de tumor bilateral B16-F10 foi usado conforme descrito no Exemplo 3. Dois dias após a segunda injeção, os tumores foram coletados e as células foram processadas para marcação de superfície com anticorpos anti-CD3, CD45, CD4 e CD8, e também para coloração de Granzyme B intracelular. Os infiltrados de células imunológicas vivas nos tumores foram analisados por FACS. IT MVA∆E5R-hFlt3L-mOX40L resultou em maior porcentagem de células $CD8^+$ T totais, bem como células TGranzyme B^+ $CD8^+$ T nos tumores não injetados em comparação com Heat-iMVA (**FIGs. 100A-100C**). Notavelmente, IT de MVA∆E5R-hFlt3L-mOX40L resultou em maior porcentagem de células $CD4^+$ T totais, bem como células TGranzyme B^+ $CD4^+$ T nos tumores não injetados em comparação com Heat-iMVA (**FIGs. 101A-101C**). Além disso, IT de MVA∆E5R-hFlt3L-mOX40L resultou em maior porcentagem de células $CD8^+$ T totais, bem como células TGranzyme B^+ $CD8^+$ T nos tumores não injetados em comparação com Heat-iMVA (**FIGs. 102A-102C**). Além disso, IT MVA∆E5R-hFlt3L-mOX40L induziu maior porcentagem de células Granzyme B^+ $CD4^+$ T nos tumores injetados em comparação com Heat-iMVA (**FIGs. 103A-103C**). Estes resultados demonstram que IT de MVA∆E5R-hFlt3L-mOX40L é mais eficaz do que Heat-iMVA na indução de células $CD8^+$ T citotóxicas e células $CD4^+$ T em tumores injetados e não injetados, e demonstram que esses construtos virais são úteis em métodos para o tratamento de tumores sólidos.

Exemplo 97: A injeção intratumoral (IT) de MVA∆E5R-hFlt3L-mOX40L leva à redução de células T regulatórias em tumores distantes injetados no modelo de implantação de tumor bilateral B16-F10.

[0731] Para avaliar se IT de MVA∆E5R-hFlt3L-mOX40L afetou células T reguladoras de infiltração de tumor, um modelo de implantação de tumor bilateral B16-F10 foi usado conforme descrito no Exemplo 95. Dois dias após a segunda injeção, os tumores foram coletados e as células foram processadas para marcação de superfície com anticorpos nti-CD3, CD45, CD4, CD8 e OX40 e também para coloração de FoxP3 intracelular. Os infiltrados de células imunológicas vivas nos tumores foram analisados por FACS. IT de MVA∆E5R-hFlt3L-mOX40L resultou em porcentagem reduzida e número absoluto de células $CD4^+FoxP3^+$ T nos tumores injetados (**FIGs.103A-103C)**. Não houve diferença significativa da porcentagem e número absoluto de Tregs nos tumores não injetados entre os grupos tratados com PBS, Heat-iMVA e IT MVA∆E5R-hFlt3L-mOX40L (**FIGs. 104A-104C**). OX40, o receptor de OX40L foi altamente expresso em células $CD4^+FoxP3^+$ T **(FIGs.105A-105C**). IT de MVA∆E5R-hFlt3L-mOX40L resultou em porcentagem reduzida e número absoluto de células $OX40^+CD4^+FoxP3^+$ T nos tumores injetados (**FIGs. 105A-105C)**, que não foi observada em tumores não injetados **(FIGs. 106A-106C).** OX40 não foi altamente expresso em células $CD4^+FoxP3^-$ T **(FIGs. 107A-107C)** e células $CD8^+$ T **(FIG. 108**). Estes resultados demonstram que a injeção IT de MVA∆E5R-hFlt3L-mOX40L reduz as células $OX40^+CD4^+FoxP3^+$ T nos tumores injetados e é útil em métodos para o tratamento de tumores sólidos.

Exemplo 98: A redução de células T reguladoras (Tregs) em tumores distantes injetados por distribuição intratumoral (IT) de MVA∆E5R-hFlt3L-mOX40L é dependente da expressão de OX40L por MVA∆E5R-hFlt3L-mOX40L.

[0732] Para avaliar se a redução de Tregs por injeção de IT de MVA∆E5R-hFlt3L-mOX40L era dependente da expressão de mOX40L, um modelo de implantação de tumor bilateral B16-F10 foi usado e comparou a

eficiência da redução por administração IT de MVAΔE5R-hFlt3L -mOX40L em função de MVAΔE5R. Resumidamente, as células de melanoma B16-F10 foram implantadas por via intradermica na pele raspada nos flancos direito ($5x10^5$ células) e esquerdo ($2,5x10^5$ células) de um camundongo C57BL/6J. Oito dias após a implantação, os tumores maiores no flanco direito foram injetados duas vezes por semana com $4x10^7$ pfu de MVAΔE5R ou MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L, ou PBS. Dois dias após a segunda injeção, os tumores foram coletados e as células foram processadas para marcação de superfície com anticorpos nti- CD45, CD4, CD8 e também para coloração de FoxP3 intracelular. Os infiltrados de células imunológicas vivas nos tumores foram analisados por FACS. Nos tumores injetados, a injeção IT de MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L resultou em porcentagem e números absolutos significativamente reduzidos de células $CD4^+FoxP3^+$ T nos tumores injetados em comparação com PBS **(FIGs. 109A-109C)**. Em contraste, a injeção IT de MVAΔE5R não afetou significativamente a porcentagem de células $CD4^+FoxP3^+$ T**(FIGs. 109A-109C)**. Estes resultados demonstram que a depleção de Tregs nos tumores injetados por injeção IT de MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L é dependente da expressão de OX40L pelo vírus recombinante.

Exemplo 99: A injeção intratumoral (IT) de MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L leva a uma ativação mais forte de células $CD8^+$ e $CD4^+$ T nos tumores injetados em OX40 em comparação com camundongos WT no modelo de implantação de tumor bilateral B16-F10.

[0733] Para comparar as respostas imunológicas induzidas por injeção IT de MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L em camundongos WT e $OX40^{-/-}$, um modelo de implantação de tumor bilateral B16-F10 foi usado. Resumidamente, as células de melanoma B16-F10 foram implantadas por via intradermica na pele raspada nos flancos direito ($5x10^5$ células) e esquerdo ($2,5x10^5$ células) de um camundongo C57BL/6J do tipo selvagem ou $OX40^{-/-}$ Dez dias após a implantação, os tumores maiores no flanco direito foram injetados duas vezes por semana com $4x10^7$ pfu de MVAΔE5R ou MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L, ou

PBS. Dois dias após a segunda injeção, os tumores foram coletados e as células foram processadas para marcação de superfície com anticorpos anti-CD3, CD45, CD4, CD8 e OX40, e também para coloração intracelular de Granzyme B, Ki67 e FoxP3. Os infiltrados de células imunológicas vivas nos tumores foram analisados por FACS **(FIGs. 110).** Em ambos os camundongos de tipo selvagem e OX40-$^{/-}$, a injeção IT de MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L resultou em maior porcentagem e números de células CD8^{+} T totais e células CD8^{+}Granzyme B^{+} T nos tumores injetados em comparação com o grupo PBS **(FIGs. 111A-111E)**. A injeção IT de MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L também resultou em maior porcentagem e números de células CD4^{+} T totais e células CD4^{+}Granzyme B^{+} T nos tumores injetados de ambos os camundongos do tipo selvagem e OX40-/-**(FIGs. 112A-112E)**. As expressões de Granzyme B em células CD8^{+} e CD4^{+} T em tumores injetados com MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L foram maiores em camundongos OX40$^{-/-}$ em comparação com camundongos WT **(FIGs. 111A-112E)**. Esses resultados sugerem que a expressão de OX40 pode estar relacionada à imunossupressão nos tumores. Uma vez que Tregs infiltrantes de tumor expressam altos níveis de OX40, sem serem limitados pela teoria, postula-se que a expressão de OX40 em células T regulatórias pode ser importante para sua função imunossupressora.

Exemplo 100: A injeção intratumoral (IT) de MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L reduz as células T regulatórias nos tumores injetados de camundongos de tipo selvagem, mas não de camundongos OX40-$^{/-}$no modelo de implantação de tumor bilateral B16-F10.

[0734] Para testar se a redução das células T regulatórias por injeção IT de MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L é devido à interação OX40L-OX40, as porcentagens de células CD4^{+}FoxP3^{+} T fora das células CD4^{+} T foram comparadas nos tumores injetados de camundongos de tipo selvagem tratados com PBS ou MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L em função de camundongos OX40-$^{/-}$ tratados com PBS ou MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L. Em camundongos WT, as porcentagens de células CD4^{+}FoxP3^{+} T fora das células CD4^{+} T foram

reduzidas em tumores tratados com MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L em comparação com tumores tratados com PBS. Em contraste, em camundongos $OX40^{-/}$, as porcentagens de células $CD4^+FoxP3^+$ T fora das células $TCD4^+$ T foram similares no grupo PBS e MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L (**FIGs.113A-113B**). Em camundongos WT, as porcentagens de células $OX40^+FoxP3^+CD4^+$ foram reduzidas de 48% nos tumores tratados com PBS para 19% em tumores tratados com MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L (**FIGs. 114A-114C**). Os números absolutos de células $OX40^+FoxP3^+CD4^+$ por grama de tumor foram reduzidos de-nos tumores tratados com PBS para-em tumores tratados com MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L (**FIG. 114B**). Como esperado, a expressão de OX40 em células $FoxP3^+CD4^+$ estava ausente (**FIG. 114C**). Estes resultados indicam que a redução induzida por MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L de Tregs em tumores injetados é provavelmente dependente da expressão de OX40 em Tregs.

[0735] A expressão de OX40 em FoxP3-$CD4^+$ também foi reduzida em tumores tratados com MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L em comparação com tumores tratados com PBS em camundongos WT **(FIGs. 115A-115C)**. Sem querer ser limitado pela teoria, é possível que a interação OX40L/OX40 possa levar à falha na detecção da expressão de OX40 nessas células.

Exemplo 101: A injeção intratumoral (IT) de MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L resulta em ativação e proliferação mais fortes de células $CD8^+$ e $CD4^+$ T nos tumores não injetados de camundongos $OX40^{-/-}$em comparação com camundongos WT.

[0736] Para testar se IT MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L resulta em respostas imunológicas nos tumores não injetados, os tumores não injetados foram coletados 2 dias após a segunda injeção com MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L ou PBS. A análise FACS foi realizada para avaliar a expressão de Granzyme B (um marcador de ativação) e Ki67 (um marcador de proliferação) em células $CD8^+$ e $CD4^+$ T IT de MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L resulta no aumento das porcentagens de células $CD8^+$ fora das células $CD45^+$, bem como no aumento das porcentagens de células Granzyme B + CD8 + fora das

células CD8 + em comparação com aquelas tratadas com PBS **(FIGs 116A-116E)**. Além disso, IT MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L resulta no aumento de células Ki67 + CD8 + de células T CD8 + em comparação com aquelas tratadas com PBS **(FIGs. 117A-117C)**. Nos camundongos $OX40^{-/-}$, IT de MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L eliciou respostas de ativação e proliferação mais fortes em células $CD8^+$ T nos tumores não injetados em comparação com aqueles em camundongos WT **(FIGS. 116A-117C)**.

[0737] Observações similares foram feitas quando as porcentagens de células Granzyme B^+CD4^+ e $Ki67^+CD4^+$ T e fora de células $CD4^+$ T em tumores não injetados de camundongos tratados com IT MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L em comparação com aqueles tratados com PBS. IT de MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L também induziu respostas de ativação e proliferação mais fortes em células $CD4^+$ T nos tumores não injetados de camundongos $OX40^{-/-}$ em comparação com aqueles em camundongos WT **(FIGS. 118A-119C)**. Estes resultados sugerem que OX40 regula negativamente as respostas imunológicas induzidas por IT MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L em tumores injetados e não injetados. É possível que OX40 seja importante para as células $OX40^+FoxP3^+CD4^+$ T por suas funções imunossupressoras, que amortecem as funções das células T efetoras CD4 + e CD8 +. Estes resultados sugerem que a combinação de IT imunogênico e MVA indutor de IFN, tal como MVAΔE5R, com administração sistêmica de agente bloqueador OX40, tal como um anticorpo anti-OX40L, pode desencadear fortes efeitos antitumorais em tumores injetados e não injetados, e demonstrar que essas construções virais são úteis em métodos para o tratamento de tumores sólidos.

Exemplo 102: A injeção intratumoral (IT) de MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L leva à ativação de células $CD8^+$ T locais nos tumores injetados no modelo de implantação de tumor bilateral B16-F10.

[0738] Para avaliar se o bloqueio do tráfego de células T de órgãos linfóides para o sangue periférico afetaria os efeitos antitumorais produzidos por IT de MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L, um modelo de implantação de tumor

bilateral B16-F10 foi usado e FTY720, uma medicamento imunomodulador que inibe a saída de linfócitos de tecidos linfóides (Figura. XX slide27). Resumidamente, as células de melanoma B16-F10 foram implantadas por via intradermica na pele raspada nos flancos direito ($5x10^5$ células) e esquerdo ($2,5x10^5$ células) de um camundongo C57BL/6J. Sete dias após a implantação, cada camundongo foi injetado por via intraperitoneal com 25μ g FTY720 ou DMSO como controle em dias alternados. Nove dias após a implantação, os tumores maiores no flanco direito foram injetados duas vezes por semana com $4x10^7$ pfu de MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L ou PBS, com três dias de intervalo. O crescimento do tumor foi monitorado. Dois dias após a segunda injeção, os tumores foram coletados e pesados. As células foram processadas para marcação de superfície com anticorpos anti-CD3, CD45, CD4, CD8 e OX40, e também para coloração intracelular de Granzyme B e Ki67. Os infiltrados de células imunológicas vivas nos tumores foram analisados por FACS **(FIG. 120**).

[0739] Em grupos tratados com PBS, os tumores injetados e não injetados cresceram mais agressivamente na presença de FTY720, em comparação com o grupo de controle DMSO **(FIG. 121**)**.** Em contraste, IT de MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L inibiu o crescimento de tumores injetados e não injetados de ambos os camundongos tratados com FTY720 ou DMSO **(FIG. 121**).

[0740] As porcentagens de células $CD8^+$ T fora das células $CD45^+$ nos tumores injetados foram aumentadas com IT de MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L no grupo de controle DMSO. Após o tratamento com FTY720, as porcentagens de células $CD8^+$ T fora das células $CD45^+$ foram ligeiramente menores do que o grupo DMSO/PBS e o tratamento IT de MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L não aumentou as porcentagens de células $CD8^+$ T fora das células $CD45^+$ **(FIGO. 122A-122D) XXB)**. Em contraste, IT de MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L resultou em percentagens significativamente aumentadas de células Granzyme B^+ $CD8^+$ T em ambos os grupos DMSO e FTY720 **(FIG. 122A e**

122C). IT de MVA∆E5R-hFlt3L-mOX40L também levou ao aumento da porcentagem de células Ki67$^+$CD8$^+$ T em ambos os grupos DMSO e FTY720 **(FIG. 122D**).

[0741] Além disso, na presença de FTY720, IT de MVA∆E5R-hFlt3L-mOX40L resultou em maiores porcentagens de células T de Granzyme B$^+$CD8$^+$ e Ki67$^+$CD8$^+$ T ativadas nos TDLNs de tumores injetados em comparação com DMSO **(FIGs. 123A-124B**), que indicou que as células CD8$^+$ T ativadas induzidas por IT de MVA∆E5R-hFlt3L-mOX40L foram capturadas em LNs na presença de FTY720. Estes resultados demonstram que IT de MVA∆E5R-hFlt3L-mOX40L ativa células CD8$^+$ T locais e é capaz de inibir o crescimento tumoral mesmo sem recrutar células T de órgãos linfoides e é útil em métodos para o tratamento de tumores sólidos. Consequentemente, estes resultados demonstram que os poxvírus recombinantes da presente tecnologia são úteis em métodos para o tratamento de tumores sólidos.

Exemplo 103: A injeção intratumoral (IT) de MVA∆E5R-hFlt3L-mOX40L retarda o crescimento do tumor em modelo de câncer de mama triplo negativo AT3.

[0742] Para avaliar os efeitos antitumorais gerados pela injeção IT de MVA∆E5R-hFlt3L-mOX40L em tumores de mama, um modelo de implantação de tumor de mama murino AT3 bilateral foi usado **(FIG. 125**). Resumidamente, 1x10 ^{5} AT3 células foram implantadas noº tecido adiposo de camundongos C57BL/6J. 14 dias após a implantação do tumor, 6x10 ^{7} pfu de MVA∆E5R-hFlt3L-mOX40L ou Heat-iMVA ou PBS foram injetados intratumoralmente duas vezes, com três dias de intervalo. Os tumores foram medidos antes de cada injeção. Dois dias após a segunda injeção, os tumores injetados foram medidos e coletados para medição de peso e análise FACS. A injeção IT de MVA∆E5R-hFlt3L-mOX40L resultou em crescimento tumoral retardado em comparação com Heat-iMVA ou PBS (**FIG. 126A**). Os tumores com IT de MVA∆E5R-hFlt3L-mOX40L eram menores em comparação com Heat-iMVA ou PBS após duas injeções **(FIG. 126B**). Estes resultados

demonstram que IT de MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L resultou em um efeito antitumoral mais forte em comparação com Heat-iMVA no modelo de implantação de tumor de mama AT3. Consequentemente, estes resultados demonstram que os poxvírus recombinantes da presente tecnologia são úteis em métodos para o tratamento de tumores sólidos.

Exemplo 104: A injeção intratumoral (IT) de MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L leva à ativação de células CD8$^+$ T e redução de células T reguladoras nos tumores injetados no modelo de câncer de mama triplo negativo AT3.

[0743] Para avaliar as respostas imunológicas induzidas por injeção IT de MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L em tumores de mama, um modelo de implantação de tumor de mama murino AT3 bilateral foi usado conforme descrito no Exemplo 103 **(FIG. 125**). Dois dias após a segunda injeção, os tumores injetados foram coletados e as células foram processadas para marcação de superfície com anticorpos anti- CD45, CD4, CD8 e CD8, e também para coloração intracelular de Granzyme B e FoxP3. A injeção IT de MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L resultou em maiores percentagens e números absolutos de células CD8$^+$ T ^{em} comparação com Heat-iMVA ou PBS **(FIG. 127B).** A injeção IT de MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L também induz maiores percentagens de células GranzymeB$^+$CD8$^+$ T comparação com Heat-iMVA **(FIGs. 127A** e **127C**). No entanto, nem a injeção IT de MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L ou Heat-iMVA induziu percentagens mais altas de células GranzymeB$^+$CD4$^+$ T**(FIGs. 128A-128E**). A porcentagem de células CD4$^+$FoxP3$^+$ T foi reduzida de 31% para cerca de 11% com IT MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L ou Heat-iMVA **(FIGs. 129A-129C**). Estes resultados demonstram que IT de MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L leva à ativação de células CD8$^+$ T e redução de células T reguladoras no modelo de implantação de tumor de mama AT3 e é útil em métodos para o tratamento de tumores sólidos.

Exemplo 105: A combinação de injeção intratumoral de MVA∆E5R-hFlt3L-mOX40L e distribuição sistêmica de anticorpo anti-PD-L1 cura o melanoma B16-F10 bilateral.

[0744] Para testar se a combinação com administração IT de MVA∆E5R-hFlt3L-mOX40L e administração sistêmica de anti-PD-L1 teve eficácia antitumoral superior em comparação com o vírus IT sozinho, um modelo de implantação de tumor B16-F10 murino bilateral foi usado. Resumidamente, células de melanoma B16-F10 foram implantadas intradermicamente nos flancos esquerdo e direito de camundongos C57B/6 ($5x10^5$ no flanco direito e $1x10^5$ no flanco esquerdo). Sete dias após a implantação do tumor, MVA∆E5R-hFlt3L-mOX40L ($4x10^7$ PFU) foi administrado nos tumores maiores no flanco direito duas vezes por semana, com injeção intraperitoneal (IP) concomitante de anti-PD-L1 (250 µg por mouse). Os tamanhos dos tumores foram medidos duas vezes por semana e a sobrevivência dos camundongos foi monitorada (**FIG. 130**). Os volumes de tumores injetados e não injetados de camundongos individuais são mostrados na **FIG. 131A-131B**). Em camundongos tratados com PBS, os tumores cresceram rapidamente, o que resultou em morte precoce com uma sobrevida média de 12,5 dias (**FIGs. 131A-132B**). A injeção intratumoral de MVA∆E5R-hFlt3L-mOX40L resultou em crescimento tumoral retardado e sobrevida melhorada em comparação com PBS, com uma extensão da sobrevida média para 25 dias (**FIGs. 131A-131B**). Os camundongos tratados com a combinação de administração intratumoral de MVA∆E5R-hFlt3L-mOX40L e administração intraperitoneal de anti-PD-L1 estavam todos sobrevivendo no momento da última pesquisa. Sete em nove camundongos estavam livres de tumor e esperava-se que fossem curados do melanoma B16-f10 (**FIGs. 131A-131B**). Com base na terapia de combinação anterior de IT de MVA∆C7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L e distribuição sistêmica de anti-CTLA-4 ou anti-PD-L1 em ambos os modelos de tumor bilateral ou um grande modelo de tumor estabelecido, sem estar vinculado por teoria, espera-se que a combinação de administração IT de

MVA∆E5R-hFlt3L-mOX40L e administração sistêmica de anti-anti-CTLA-4 ou anti-PD-1 deve gerar resultados superiores em comparação com o vírus IT sozinho em ambos os modelos de tumor bilateral ou um grande modelo de tumor estabelecido.

Exemplo 106: MVA∆E5R-hFlt3L-OX40L induz níveis mais elevados de expressão do gene IFNB em comparação com MVA.

[0745] A indução da expressão do gene IFNB e secreção de IFN-β por MVA∆E5RhFlt3L-hOX40L em função de BMDCs infectados com MVA foi examinada. Resumidamente, os BMDCs ($1x10^{6}$) foram infectados com MVA∆E5RhFlt3L-hOX40L ou MVA a um MOI de 10. As células foram lavadas após 1h de infecção e meio fresco foi adicionado. As células foram coletadas 6h após a infecção e os sobrenadantes foram coletados 19h após a infecção. As expressões do gene IFNB foram determinadas por RT-PCR **(FIG. 132A).** Os níveis de proteína IFN-β nos sobrenadantes foram determinados por ELISA **(FIG. 132B)**. Os resultados de RT-PCR mostram que MVA∆E5RhFlt3L-hOX40L induz fortemente a expressão do gene IFNB e a secreção de IFN-β **(FIG. 132A e B)**.

Exemplo 107: Infecção ex vivo com MVA∆E5R-hFlt3L-hOX40L

[0746] Doença de Paget extra-mamária (EMPD) é uma doença rara, de crescimento lento, o câncer de pele, que ocorre no epitélio e muitas vezes origina de apócrinas células glandulares na vulva, escroto, ou a área de perianal. Geralmente é limitado ao epitélio, mas pode progredir e se tornar invasivo. A opção de tratamento é frequentemente limitada, que inclui cirurgia, radioterapia, imiquimode tópico, terapia fotodinâmica. Foi analisado como a cultura *ex vivo* da amostra de biópsia com MVA∆E5R-hFlt3L-hOX40L afeta o fenótipo de linfócitos infiltrantes de tumor em EMPD. Resumidamente, os tecidos tumorais foram cortados em pequenos pedaços com lâminas afiadas e infectados com MVA∆E5R-hFlt3L-hOX40L a um MOI de 10. Após dois dias de infecção, os tecidos foram digeridos com colagenase D () a 37˚C por 45 min. As células foram filtradas e coradas com anticorpos anti-CD3, CD4, CD8 e

foram subsequentemente permeabilizadas e coradas com anticorpos anti-Granzyme B e FoxP3. A análise FACS foi realizada. Os gráficos de pontos representativos de células Granzyme B^+CD8^+ T e células $FoxP3^+CD4^+$ T são mostrados **(FIG. 133A e 133B).** A FIG. **134A** mostra o gráfico de porcentagens de células $Granzyme^+CD8^+$ T fora das células $CD8^+$ após infecção com MVA∆E5R-hFlt3L-hOX40L ou controle de PBS por dois dias. Dados são médias ±SEM (n=3). A FIG. 134B mostra o gráfico de porcentagens de células $FoxP3^+CD4^+$ T fora das células $CD4^+$ após infecção com MVA∆E5R-hFlt3L-hOX40L ou controle de PBS por dois dias. Dados são médias ±SEM (n=3). Estes resultados mostram que a infecção ex vivo de EMPD com MVA∆E5R-hFlt3L-hOX40L resulta no aumento das porcentagens de células $Granzyme^+CD8^+$ T fora das células $CD8^+$ e na redução das porcentagens de células $FoxP3^+CD4^+$ T fora de células $CD4^+$ **(FIG. 134A e 134B)**, apoiando a função de estimulação imunológica de MVA∆E5R-hFlt3L-hOX40L. Consequentemente, estes resultados demonstram que os poxvírus recombinantes da presente tecnologia são úteis em métodos para o tratamento de tumores sólidos.

Exemplo 108: Geração de vírus recombinantes MVA∆E3L∆E5R e MVA∆E3L∆E5R hFlt3L-mOX40L

[0747] A fim de testar se a deleção do gene E3L da vacina de MVA∆E5R ou MVA∆E5RhFlt3L-mOX40L melhora a imunogenicidade dos vírus, MVA∆E3L∆E5R e MVA∆E3L∆E5R hFlt3L-mOX40L foram gerados. O processo consistiu em várias etapas. Na primeira etapa, MVA∆E5R e MVA∆E5R hFlt3L-mOX40L foram gerados por meio de recombinação homóloga nos loci E4 e E6 do genoma MVA **(FIG. 135A e 135B)**. Na segunda etapa, um construto E3L-mCherry FRT foi usado para remover E3L endógeno dos vírus recombinantes por meio de recombinação homóloga nos loci E2L e E4L (**FIG. 135C**). A integração adequada e a pureza da construção mCherry inserida no locus E3L foram confirmadas por PCR. O vírus resultante carecia dos genes E3L e E5R.

A fim de facilitar as etapas posteriores de modificação, os sítios FRT foram incluídos na construção usada para deleção de E3L. Esse construto tinha um sítio FRT proximal ao promotor p7.5 e outro local FRT distal a mCherry. Na terceira etapa, este vírus foi autorizado a se replicar em células que expressam Flp recombinase, a fim de remover o mCherry do genoma viral, quando a modificação adicional do vírus foi desejada.

Exemplo 109: MVA∆E3L∆E5R induz níveis mais elevados de expressão do gene IFNB em BMDCs em comparação com MVA∆E5R e a indução é amplamente dependente de cGAS.

[0748] Vaccinia E3 é um fator de virulência importante com domínios de ligação de dsRNA N-terminal Z-DNA e C-terminal. A infecção intranasal de VACV∆E3L é não patogênica em um modelo de infecção intranasal. MVA∆E3L induz níveis mais elevados de IFN tipo I em comparação com MVA (Dai et al., Plos Pathogens 2014). Para testar se MVA∆E3L∆E5R induz níveis mais elevados de IFN tipo I em comparação com MVA∆E5R, Heat-iMVA ou MVA, BMDCs (1x10 ^{6}) de camundongos WT C57BL/6J e cGAS$^{-/-}$foram infectados com qualquer MVA∆E3L∆E5R, MVA∆E5R, Heat-iMVA ou MVA a um MOI de 10. As células foram coletadas 6h após a infecção. A expressão do gene IFNB foi determinada por RT-PCR. Os resultados mostram que MVA∆E3L∆E5R induz níveis mais elevados de expressão do gene IFNB em comparação com MVA∆E5R em BMDCs WT. Considerando que a expressão do gene IFNB induzida por MVA∆E5R é completamente perdida nas células cGAS$^{-/-}$, a expressão do gene IFNB induzida por MVA∆E3L∆E5R é amplamente reduzida em células cGAS$^{-/-}$, sugerindo que via adicional, como a via MDA5/MAVS- A via de detecção de dsRNA citosólica mediada pode desempenhar um papel menor na detecção de dsRNA produzido por este vírus em BMDCs **(FIG. 136)**.

Exemplo 110: A infecção por MVAΔE3LΔE5R de células de melanoma B16-F10 de murino induz fortemente a expressão do gene IFNB e a secreção da proteína IFN-β.

[0749] Foi testado se MVAΔE3LΔE5R e MVAΔE5 poderiam induzir a expressão do gene IFNB e a secreção de proteína em células de melanoma B16-F10 murino. As células B16-F10 foram infectadas com MVAΔE3L, MVAΔE5R ou MVAΔE3LΔE5R a um MOI de 10. As células foram coletadas 15h após a infecção. Os sobrenadantes foram coletados 24 horas após a infecção. A análise de RT-PCR mostrou que a infecção por MVAΔE3LΔE5R de células de melanoma murino B16-F10 induz indução muito forte de IFNB (4000 vezes) em comparação com MVAΔE3L ou MVAΔE5R (300 ou 50 vezes, respectivamente). Esta diferença foi altamente significativa ($p < 0,0001$) **(FIG. 137A)**. Isso indica que as deleções dos genes E3L e E5R têm um efeito sinérgico. Os resultados de ELISA mostraram que a infecção por MVAΔE3LΔE5R de células B16-F10 induz níveis muito mais elevados de níveis de proteína IFN-β nos sobrenadantes de células infectadas em comparação com aqueles infectados com MVAΔE3L (3498 pg/ml em função de 479 pg/ml, respectivamente). MVAΔE5R falha em induzir a secreção de proteína IFN-β em células B16-F10. Para testar quais vias de detecção de ácido nucleico são importantes para detectar a infecção por MVAΔE3LΔE5R em células B16-F10, as linhas celulares MDA5$^{-/-}$Sting$^{-/-}$ B16-F10 foram geradas usando CRISPR-cas9 e validadas a perda das respectivas proteínas e genes usando Western Blot contra proteínas-alvo e sequenciamento de exons-alvo. Estes resultados mostram que a forte indução de IFNB por MVAΔE3LΔE5R é amplamente dependente de MDA5, conforme mostrado por níveis marcadamente reduzidos em células MDA5$^{-/-}$em RT-PCR e ELISA.

Exemplo 111: A infecção por MVA∆E3L∆E5R-hFlt3L-mOX40L de células de melanoma B16-F10 murino induz fortemente a expressão de hFlt3L e mOX40L na superfície das células infectadas.

[0750] Para testar se a deleção do gene E3L afetou a expressão de hFlt3L ou mOX40L, células B16-F10 foram infectadas com MVA∆E3L∆E5R-hFlt3L-mOX40L, MVA∆E5R-hFlt3L-mOX40L ou MVA∆E3L∆E5R para 1h As células foram lavadas e incubadas em meio fresco e coletadas 24 horas depois. As células foram coradas com anticorpos anti-hFlt3L e anti-mOX40L e FACS foi realizado. **A FIG. 138** mostra gráficos de pontos representativos de FACS demonstrando a expressão de células mOX40L ou hFlt3L na superfície de células B16-F10 infectadas com MVA∆E3L∆E5R hFlt3L-mOX40L ou MVA∆E5R hFlt3L-mOX40L. As células B16-F10 infectadas com vírus de controle MVA∆E3L∆E5R não expressam hFlt3L e mOX40L como esperado. Estes resultados indicam que a deleção do gene E3L não afeta a expressão dos dois transgenes hFlt3L e mOX40L.

Exemplo 112: administração intratumoral de MVA∆E3L∆E5R-hFlt3L-mOX40L induz respostas de células T sistêmicas antitumorais mais fortes em comparação com MVA∆E5R-hFlt3L-mOX40L.

[0751] Dado que a infecção de BMDCs e B16-F10 com MVA∆E3L∆E5R induz uma produção de IFN tipo I mais forte em comparação com MVA∆E5R por meio de da ativação da via de detecção de DNA citosólico mediada por cGAS/STING e da via de detecção de dsRNA citosólica mediada por MDA5/MAVS, sem estar limitado pela teoria, é a hipótese de que a administração de IT do vírus MVA∆E3L∆E5R-hFlt3L-mOX40L induziria respostas imunológicas antitumorais mais fortes. Para testar isso, células de melanoma B16-F10 foram implantadas intradermicamente nos flancos esquerdo e direito de camundongos C57B/6J ($5x10^5$ no flanco direito e $2,5x10^5$ no flanco esquerdo). Sete dias após a implantação do tumor, $2x10^7$ pfu de MVA∆E5R-hFlt3L-mOX40L, MVA∆E3L∆E5R-hFlt3L-mOX40L, uma quantidade equivalente de Heat-iMVA ou PBS foi injetado intratumoralmente (IT) no maior

tumores no flanco direito duas vezes, com três dias de intervalo. Os baços foram coletados 2 dias após a segunda injeção, as análises ELISPOT foram realizadas para avaliar as células T específicas do tumor nos baços. O ensaio ELISPOT foi realizado por co-cultura de células B16-F10 irradiadas (150.000) e esplenócitos (1.000.000) em uma placa de 96 cavidades. **A FIG. 139A** mostra a imagem de ELISPOT de amostras em triplicado de esplenócitos combinados de camundongos no mesmo grupo de tratamento. **A FIG. 139B** mostra um gráfico de pontos de IFN-γ $^{+}$ por 1.000.000 esplenócitos. Estes resultados mostram que IT MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40L gerou as respostas de células T antitumorais mais fortes nos baços de camundongos tratados em comparação com MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L ou Heat-iMVA. Estes resultados sugerem que a ativação da via de detecção de dsRNA citosólica mediada por MDA5/MAVS nos tumores pode ser importante para a geração de fortes respostas imunológicas adaptativas antitumorais.

Exemplo 113: administração intratumoral de MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40L atrasa as células B16-F10 deficientes em B2M.

[0752] Mutações no gene da microglobulina Beta 2 (B2M) foram observadas em tumores que apresentam recidiva com resistência após a terapia de bloqueio do ponto de verificação imunológico. Para testar se MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40L é eficaz contra tais tumores, um modelo de tumor B16F10 deficiente em B2M foi gerado usando tecnologia CRISPR-cas9. A Microglobulina Beta 2 (B2M) é um componente essencial do complexo MHC Classe I. A análise FACS confirmou que apenas as células transfectadas com gRNAs anti-B2M perderam MHC de superfície em alta frequência, indicando um CRISPR eficaz (dados não mostrados). A classificação de células foi usada para isolar células sem MHC de classe de superfície I. Um único isolado clonal dessa classificação foi selecionado para sequenciamento e subsequentes experimentos *in vivo*. Este isolado clonal de B2M $^{-/-}$ tinha uma deleção de 178 BP no exon 2 de B2M que elimina metade da sequência de codificação de B2M e cria um deslocamento de quadro (dados não mostrados).

[0753] Células de melanoma WT e B2M$^{-/-}$ B16-F10 (2,5 × 10 ^{5}) foram implantadas pot via intradermal nos flancos direitos de camundongos C57B/6J. Para que os tumores B2M se implantem com sucesso, as células NK foram esgotadas usando o anticorpo PK136 (200 µg/camundongo nos dias -1, 2 e 5) em camundongos implantados com células WT ou B2M$^{-/-}$ B16-F10. Os tumores cresceram por 10 dias. Posteriormente, 4x10 ^{7} pfu de MVAΔE3LΔE5R hFlt3L-mOX40L ou PBS foi injetado por via intratumoral (IT) duas vezes por semana. Os tamanhos dos tumores foram medidos e a sobrevivência dos camundongos foi monitorada (**FIG. 140**).

[0754] As FIGS. 141A mostra os volumes de tumor dos tumores WT e B2M$^{-/-}$ B16-F10 injetados em camundongos tratados com PBS ou MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40L por via intratumoral. Ambos os tumores WT e B2M$^{-/-}$ B16-F10 responderam ao tratamento com MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L com retardo do crescimento do tumor. **As FIGS. 141B** mostra a curva de sobrevivência de Kaplan Meier dos quatro grupos. O vírus IT MVAΔE3LΔE5R hFlt3L-mOX40L gerou um benefício de sobrevivência inequívoco para camundongos com deficiência de B2M ou tumores WT B16-F10. No dia 24, nenhum dos camundongos não tratados sobreviveu enquanto todos os camundongos com tumores B2M$^{-/-}$ tratados com MVAΔE3L3E5R-hFlt3L-mOX40L estavam vivos. Consequentemente, estes resultados demonstram que os poxvírus recombinantes da presente tecnologia são úteis em métodos para o tratamento de tumores sólidos.

Exemplo 114: injeção intratumoral (IT) de MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40L induz a ativação e proliferação de células CD8^{+} T nos tumores injetados em modelo de câncer de mama triplo negativo AT3

[0755] Para comparar as respostas imunológicas induzidas por injeção IT de MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L e MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40L em tumores de mama, um modelo de implantação de tumor de mama murino AT3 bilateral foi usado **(FIG. 142).** Resumidamente, 1x10 ^{5} AT3 células foram implantadas noº tecido adiposo de camundongos C57BL/6J. 12 dias após a

implantação do tumor, 6x10 ^{7} pfu de MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L, ou MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40L ou PBS foram injetados intratumoralmente duas vezes, com três dias de intervalo. Dois dias após a segunda injeção, os tumores injetados foram coletados e as células foram processadas para marcação de superfície com anticorpos anti-CD3, CD45, CD4, CD8 e OX40, e também para coloração intracelular de Granzyme B, Ki67 e FoxP3. Os infiltrados de células imunológicas vivas nos tumores foram analisados por FACS. IT MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L ou MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40L induz maior porcentagem de células $CD8^+$ T fora das células $CD45^+$ **(FIG. 143B**) em comparação com PBS. O número absoluto de células $CD8^+$ T com IT de MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40L foi maior em comparação com PBS e MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L (**FIG. 143C**). Ambos MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L ou MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40L aumentaram a porcentagem de célulasGranzyme B^+ $CD8^+$ T em comparação com PBS (**FIG. 143A, D**). O número absoluto de células Granzyme B^+ $CD8^+$ T com IT de MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40L foi maior em comparação com PBS e MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L (**FIG. 143E**). IT de MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40L também induziu maior porcentagem e número absoluto de células $Ki67^+$ $CD8^+$ T**(FIG. 144A-C**). Estes resultados demonstram que IT MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40L é mais eficaz na ativação de células CD8 T e na promoção da proliferação de células $CD8^+$ T+ em comparação com IT MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L em modelo de câncer de mama AT3. Por conseguinte, estes resultados demonstram que as construções virais da presente tecnologia são úteis em métodos para o tratamento de tumores sólidos.

Exemplo 115: injeção intratumoral (IT) de MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40L ativa as células $CD4^+$ T e reduz as células T regulatórias nos tumores injetados em modelo de câncer de mama triplo negativo AT3

[0756] Para comparar as respostas imunológicas induzidas por injeção IT de MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L e MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40L em tumores de mama, um modelo de implantação de tumor de mama murino AT3

bilateral foi usado conforme descrito no Exemplo **114 (FIG. 142)**. Após IT MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L ou IT MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40L, a porcentagem de células $CD4^+$ T totais de células $CD3^+$ T não mudou em comparação com PBS (**FIG. 145B**), mas o número absoluto de células $CD4^+$ T aumentou significativamente após a injeção de vírus (**FIG. 145C**). IT de MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40L também gerou mais células Granzyme B^+ $CD4^+$ T em comparação com MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L ou PBS (**FIG. 145E**). Tanto IT MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L ou IT MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40L resultou em porcentagem significativamente reduzida de células $CD4^+FoxP3^+$ T em comparação com PBS (**FIG. 146A, 146B**). A porcentagem de células $OX40^+CD4^+FoxP3^+$ T reduzida após a injeção de vírus (**FIG. 147A-C**). Estes resultados demonstram que IT MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40L induz a ativação de células $CD4^+$ T e reduz as células T reguladoras no modelo de câncer de mama AT3. Consequentemente, estes resultados demonstram que os poxvírus recombinantes da presente tecnologia são úteis em métodos para o tratamento de tumores sólidos.

Exemplo 116: injeção intratumoral (IT) de MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40L reduz macrófagos e DCs nos tumores injetados no modelo de câncer de mama triplo negativo AT3.

[0757] Para avaliar se IT MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40L afeta a população de células mieloides em tumores de mama, um modelo de implantação de tumor de mama murino AT3 bilateral foi usado conforme descrito no Exemplo 114 **(FIG. 142)**. Dois dias após a segunda injeção, os tumores injetados foram coletados e as células foram processadas para marcação de superfície com anticorpos anti-CD3, CD19, CD49b, CD45, MHC-II, CD11c, Ly6G, F4/80, Ly6C e CD24. Os infiltrados de células imunológicas vivas nos tumores foram analisados por FACS. IT de MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40L resultou em porcentagem e número de macrófagos significativamente reduzidos do total de células CD45 + em comparação com PBS (**FIG. 148A, B**). A porcentagem de células dendríticas foi reduzida com IT MVAΔE3LΔE5R-

hFlt3L-mOX40L e IT MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L (**FIG. 148C**), com porcentagem diminuída de $CD11b^+$ e $CD103^+$ DCs**(FIG. 148E-H**). Estes resultados demonstram que IT de MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40L reduz macrófagos e DCs nos tumores injetados no modelo de câncer de mama AT3. Consequentemente, estes resultados demonstram que os poxvírus recombinantes da presente tecnologia são úteis em métodos para o tratamento de tumores sólidos.

Exemplo 117: cânceres de mama espontâneos respondem à terapia de combinação com IT de MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40L e administração sistêmica de anticorpos anti-PD-L1 e anti-CTLA-4.

[0758] Para avaliar a eficácia terapêutica de IT MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40L em combinação com anticorpos anti-PD-L1 e anti-CTLA-4 em cânceres de mama triplo negativo, um modelo de câncer de mama espontâneo MMTV-PyMT foi usado. Depois que o primeiro tumor se tornou palpável, a injeção de MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L nos tumores foi iniciada. 250 μg de anti-PD-L1 e 100 μg de anticorpos anti-CTLA-4 foram dados por via intraperitoneal a cada camundongo. Os tamanhos dos tumores foram medidos duas vezes por semana (**FIG. 149**). O tratamento de combinação resultou em crescimento do tumor retardado em comparação com a semana do grupo de controle de PBS (**FIG. 150**). Este resultado demonstra que os cânceres de mama espontâneos respondem à terapia de combinação com IT de MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40L e administração sistêmica de anticorpos anti-PD-L1 e anti-CTLA-4. Consequentemente, estes resultados demonstram que os poxvírus recombinantes da presente tecnologia são úteis em métodos para o tratamento de tumores sólidos.

Exemplo 118: Geração de vírus MVAΔE5R hFlt3L-mOX40LΔC11R recombinante

[0759] O C11R da vacina codifica o fator de crescimento da vacina. O genoma WT vaccinia (Western Reserve) tem duas cópias, enquanto o genoma MVA tem uma cópia. O gene C11 foi identificado como um dos oito

genes iniciais de vaccinia envolvidos na inibição da via cGAS/STING em um ensaio de varredura de luciferase dupla (**FIGs. 19 e 20**). Para testar se a deleção do gene C11R de MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L aumenta a capacidade de indução de IFN tipo I do vírus, um vírus recombinante MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔC11R foi gerado por meio de de recombinação homóloga no loci C17L/C16L e C10L do genoma MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L (**FIG. 151**).

Exemplo 119: MVAΔE5R hFlt3L-mOX40LΔC11R induz níveis mais elevados de expressão do gene IFNB e secreção de proteína IFN-β em BMDCs em comparação com MVAΔE5R hFlt3L-mOX40L.

[0760] Para testar se MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔC11R induz níveis mais elevados de IFN tipo I em comparação com MVAΔE5R, BMDCs ($1x10^6$) de camundongos WT C57BL/6J foram infectados com MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L ΔC11R ou MVAΔE5R ou MVA a um MOI de 10. As células foram coletadas 6h após a infecção. Os sobrenadantes foram coletados 19 horas após a infecção. A expressão do gene IFNB foi determinada por RT-PCR. Os resultados mostram que MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔC11R induz níveis mais elevados de expressão do gene IFNB em comparação com MVAΔE5R **(FIG. 152A)**.

[0761] Os níveis de proteína IFN-β nos sobrenadantes foram determinados por ELISA **(FIG. 152B)**. Os resultados mostram que a infecção por MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔC11R de BMDCs induz níveis mais elevados de secreção de proteína IFN-β em comparação com MVAΔE5R. Estes resultados indicam que a remoção do gene C11R de MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L melhora ainda mais a capacidade de indução de IFN dos vírus.

Exemplo 120: Geração de vírus recombinantes MVAΔWR199 e MVAΔE5R hFlt3L-mOX40LΔWR199.

[0762] O gene vaccinia WR199 codifica uma proteína anquirina-repetição 68-kDa, e é um dos oito genes precoces de vaccinia identificados na varredura de inibidores da via cGAS/STING **(FIGs. 19).** Para testar se a deleção do gene WR199 de MVA ou MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L aumenta a

capacidade de indução de IFN tipo I dos vírus, respectivamente, os vírus recombinantes MVAΔWR199 e MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199 foram gerados por meio de de recombinação homóloga em os loci B17L e B19R do genoma MVA e MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L (**FIG. 153**). Os locais FRT foram colocados na região flanqueadora do gene que codifica mcherry para facilitar a remoção da cor fluorescente para posterior modificação do vírus.

Exemplo 121: A deleção do gene WR199 de MVA ou MVAΔE5R hFlt3L-mOX40L melhora a capacidade de indução do gene IFNB dos vírus em BMDCs.

[0763] Para testar se a deleção do gene WR199 de MVA ou MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L induz níveis mais elevados de IFN tipo I, BMDCs ($1x10^6$) de camundongos WT e $cGAS^{-/-}$ C57BL/6J foram infectados com MVA ou MVAΔWR199 em um MOI de 10 ou com Heat-iMVA em uma quantidade equivalente. As células foram coletadas 6h após a infecção. Os sobrenadantes foram coletados 19 horas após a infecção. A expressão do gene IFNB foi determinada por RT-PCR. Os resultados mostram que MVAΔWR199 induz níveis mais elevados de expressão do gene IFNB em comparação com MVA, mas níveis mais baixos de IFNB em comparação com Heat-iMVA em BMDCs **(FIG. 154A)**. Em $cGAS^{-/-}$ BMDCs, a indução do gene IFNB induzida por MVAΔWR199 é completamente perdida **(FIG. 154A)**.

[0764] Quatro clones isolados de MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199. Os BMDCs foram gerados e as células foram infectadas com um dos quatro clones, MVAΔWR199 ou MVAΔE5R. A análise de RT-PCR mostrou que MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199 induz níveis mais elevados de expressão do gene IFNB em comparação com MVAΔE5R ou MVAΔWR199 **(FIG. 154B)**.

[0765] Os níveis de proteína IFN-β nos sobrenadantes foram determinados por ELISA **(FIG. 154C)**. Os resultados mostram que a infecção por MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199 de BMDCs induz níveis mais elevados de secreção de proteína IFN-β em comparação com MVAΔE5R ou

MVA∆WR199. Estes resultados indicam que a remoção do gene WR199 de MVA ou MVA∆E5R-hFlt3L-mOX40L melhora ainda mais a capacidade de indução de IFN dos vírus.

Exemplo 122: Geração de vírus vaccinia recombinante com deleção de B2R (VACV∆B2R).

[0766] Foi relatado recentemente que o gene B2R vaccinia codifica uma nuclease que degrada 2 ', 3'-GMP-AMP cíclico (cGAMP), o que contribui para a evasão reações imunológicas da via de detecção de DNA citosólica mediada por cGAS (Eaglesham et al., 2019). Este gene é altamente conservado entre a família dos poxvírus. No entanto, o gene B2R no MVA está truncado e a proteína é inativa. Uma vacina mutante com deleção de B2R da cepa vTF7-3 Western Reserve, na qual o gene da timidina quinase (TK) da vaccinia foi gerado e foi considerado mais atenuado do que o vírus parental em um modelo de escarificação de pele. Para testar o efeito da deleção do gene B2R na virulência viral independente da deleção de TK, um vírus mutante VACV∆B2R foi gerado e avaliado a virulência do vírus em um modelo de infecção intranasal.

[0767] Resumidamente, o vetor pB2R-FRT GFP foi usado para inserir GFP sob o controle do promotor vaccinia P7.5 no locus B2R do vírus vaccinia (VACV; cepa Western Reserve). O cassete de expressão é flanqueado pela sequência parcial dos genes B1R e B3R em ambos os lados **(FIG. 155)**. As células BSC40 foram infectadas com o vírus da vacínia WT a um MOI de 0,05 durante 1h e, em seguida, foram transfectadas com o DNA de plasmídeo descrito acima. As células infectadas foram coletadas em 48 h. Os vírus recombinantes foram identificados por sua fluorescência verde com a inserção de GFP no locus B2R. Os clones positivos foram purificados em placa 4-5 vezes em células BSC40. A análise de PCR foi realizada para confirmar que o vírus recombinante VACV∆B2R perdeu o gene B2R.

Exemplo 123: O gene B2R de vaccinia codifica um fator de virulência.

[0768] Para determinar se o gene B2R do vírus vaccinia contribui para a virulência em um modelo de infecção intranasal, grupos de camundongos WT fêmeas C57BL/6J de 6 semanas de idade foram infectados por via intranasal com duas doses diferentes (2 x10 ^{7} ou 2 x10 ^{6} pfu) de VAVCΔB2R. A perda de peso e a sobrevivência de camundongos C57BL/6J após infecção intranasal com VACVΔB2R foram monitoradas. A infecção de VACVΔB2R em qualquer dose resultou na perda de peso máxima (cerca de 20% do peso inicial) por volta do dia 6 após a infecção. Os camundongos recuperaram o peso no dia 13 após a infecção e todos sobreviveram **(FIGs. 156A e B)**. Estes resultados sugeriram que VAVCΔB2R é altamente atenuado no modelo de infecção intranasal em comparação com WT VACV, que tem um LD_{50} de 2 x10^{5} pfu.

Exemplo 124: Geração de vírus vaccinia recombinantes VACVΔE5RΔB2R e VACVΔE3L83NΔE5RΔB2R.

[0769] Para testar o efeito das deleções de compostos de ambos os genes B2R e E5R do fundo WT VACV ou VACVΔE3L83N, que não possui o fragmento de DNA que codifica o domínio de ligação de Z-DNA de 83 aminoácidos N-terminal, VACVΔE5RΔB2R e VACV ΔE3L83NΔE5RΔB2R foram gerados. Resumidamente, o vetor pB2R-FRT GFP foi usado para inserir GFP sob o controle do promotor vaccinia P7.5 no locus B2R do vírus vaccinia mutante VACVΔE5R **(FIG. 157A)**, ou VACVΔE3L83NΔE5R **(FIG. 157B)**, que foi gerado pela deleção do gene E5R do vírus VACVΔE3L83N. O cassete de expressão é flanqueado pela sequência parcial dos genes B1R e B3R em ambos os lados **(FIG. 157)**.

[0770] Células BSC40 foram infectadas com VACVΔE5R ou VACVΔE3L83NΔE5R a um MOI de 0,05 por 1h e, em seguida, foram transfectadas com os DNAs de plasmídeo descritos acima. As células infectadas foram coletadas em 48 h. Os vírus recombinantes foram

identificados por sua fluorescência verde com a inserção de GFP no locus B2R. Os clones positivos foram purificados em placa 4-5 vezes em células BSC40. A análise de PCR foi realizada para confirmar que os vírus recombinantes VACVΔE5RΔB2R e VACVΔE3L83NΔE5RΔB2R perderam o gene B2R.

Exemplo 125: vírus vaccinia recombinantes VACVΔE5RΔB2R e VACVΔE3L83NΔE5RΔB2R são altamente atenuados em um modelo de infecção intranasal murino.

[0771] A infecção intranasal de camundongos WT fêmeas C57BL/6J de 6 semanas de idade foi realizada com $2x10^{7}$ pfu de VACVΔE5R, VACVΔB2R, VACVΔE3L83NΔE5R, VACVΔE5RΔB2R, ou VACVΔE3L83NΔE5RΔB2R. A perda de peso e a sobrevivência dos camundongos foram monitoradas **(FIG. 158)**. A infecção com VACVΔE3L83NΔE5RΔB2R resultou na menor perda de peso nesses camundongos, com perda de peso máxima em torno de 10% do peso inicial **(FIG. 158)**. A infecção com VACVΔE5RΔB2R também resultou em menor perda de peso em comparação com VACVΔE5R ou VACVΔB2R **(FIG. 158)**. Todos os camundongos sobreviveram à infecção. Estes resultados indicam que a deleção do composto de B2R e E5R ou B2R, E5R e E3L83N resulta em atenuação adicional dos vírus.

Exemplo 126: A infecção VACVΔE5RΔB2R ou VACVΔE3L83NΔE5RΔB2R de células dendríticas derivadas da medula óssea (BMDCs) induz níveis mais elevados de expressão do gene IFNB tipo I e secreção de proteína IFN-β do que VACVΔB2R ou VACVΔE5R.

[0772] A expressão do gene Vaccinia E5R leva à degradação de cGAS (Exemplos 63 e 64). O gene B2R da vacina codifica uma nuclease que degrada cGAMP, que é um produto de cGAS. Sem estar limitado pela teoria, é hipotetizado que a deleção dupla do gene B2R e E5R do genoma da vaccinia pode levar à indução aumentada da expressão do gene IFNB e à secreção da proteína IFN-β em BMDCs infectados.

[0773] Para testar isso, BMDCs de WT e cGAS$^{-/-}$ foram infectados com VACVΔE3L83NΔE5R, VACVΔE5RΔB2R, VACVΔE3L83NΔE5RΔB2R, VACVΔE3L83N, VACVΔB2R ou VACVΔE5R em um MOI de 10 ou com uma quantidade equivalente de Heat-iMVA. As células foram coletadas 6h após a infecção. Os RNAs foram extraídos. Os níveis de expressão do gene IFNB foram determinados por análises quantitativas de PCR. Os sobrenadantes foram coletados 24 horas após a infecção e os níveis de IFN-β foram medidos por ELISA. Os resultados de RT-PCR mostraram que, enquanto a infecção por WT VACV de BMDCs induziu níveis 225 vezes maiores de expressão do gene IFNB em comparação com o controle sem tratamento, e VACVΔE3L83N, VACVΔB2R, ou VACVΔE5R, VACVΔE3L83NΔE5R induziu infecção Níveis 223, 410-, 3054-, 3117 vezes maiores de expressão do gene IFNB em comparação com o controle sem tratamento, respectivamente. A infecção por VACVΔE5RΔB2R ou VACVΔE3L83NΔE5RΔB2R induziu níveis 9970 e 10383 vezes mais elevados de expressão do gene IFNB em comparação com o controle sem tratamento **(FIG. 159A).** Os resultados de ELISA mostraram que a infecção por VACVΔB2R, VACVΔE5R ou VACVΔE3L83NΔE5R de BMDCs induziu a secreção de proteína IFN-β de BMDCs, resultando em níveis de IFN-β nos sobrenadantes a 22, 232 e 189 pg/ml, respectivamente. A infecção por VACVΔE5RΔB2R ou VACVΔE3L83NΔE5RΔB2R induziu maior nível de secreção de IFN-β com o IFN-β a 700 e 763 pg/ml nos sobrenadantes **(FIG. 159B)**. No cGAS$^{-/-}$ BMDCs, a vaccinia atenuada falha em induzir a expressão do gene IFNB ou a secreção da proteína IFN-β **(FIGs. 159A e 159B)**.

[0774] Estes resultados indicam que a deleção combinada de B2R e E5R induz níveis mais elevados de expressão do gene IFNB e secreção de proteína IFN-β de BMDCs em comparação com a deleção de B2R ou E5R única. E a indução da expressão do gene IFNB e secreção da proteína IFN-β de BMDCs infectados com o mutante vaccinia atenuado é os poxvírus recombinantes da presente tecnologia são úteis em métodos para o tratamento de tumores sólidos.

Exemplo 127: infecção por VACV∆E5R∆B2R ou VACV∆E3L83N∆E5R∆B2R de células dendríticas derivadas da medula óssea (BMDCs) induz níveis mais elevados de fosforilação de STING, TBK1 e IRF3 em comparação com VACV∆B2R ou VACV∆E5R.

[0775] Para testar se as deleções duplas de B2R e E5R do genoma WT VACV ou as deleções triplas de E3L83N, B2R e E5R do genoma WT VACV induziriam uma ativação mais forte da via de sinalização cGAS-STING, os BMDCs foram infectados com VACV, VACV∆ B2R, VACV∆E5R, VACV∆E3L83N∆E5R, VACV∆E5R∆B2R ou VACV∆E3L83N∆E5R∆B2R com um MOI de 10. Os lisados celulares foram coletados 2, 4 e 6h após a infecção. As proteínas foram separadas em gel SDS-PAGE e foram manchadas com anticorpos contra STING fosforilado, TKB1 e IRF3. VACV∆E5R∆B2R ou VACV∆E3L83N∆E5R∆B2R induziu níveis mais elevados de fosforilação de STING, TBK1 e IRF3 em BMDCs infectados em comparação com VACV∆B2R ou VACV∆E5R **(FIG. 160)**. Estes resultados indicam que as deleções duplas de B2R e E5R do genoma WT VACV ou as deleções triplas de E3L83N, B2R e E5R do genoma WT VACV resultam em ativação mais forte da via de sinalização cGAS/STING/TBK1/IRF3.

Exemplo 128: Geração dos vírus vaccinia recombinantes VACVΔE3L83N-∆TK-anti-muCTLA-4-∆E5R-hFlt3L-mOX40L-mIL-12 (OV-VACV∆E5R) ou VACVΔE3L83N-∆TK-anti-multCTLA-4-∆E5R -mOX40L-mIL-12-∆B2R (OV-VACV∆B2R).

[0776] Este exemplo descreve a geração do vírus VACVΔE3L83N-∆TK-anti-muCTLA-4-∆E5R-hFlt3L-mOX40L-mIL-12 ou VACVΔE3L83N-∆TK-anti-muCTLA-4-∆E5R-hFlt3L-mOX40L-mIL-12-∆B2R recombinante.

[0777] A FIG. 161 mostra a estratégia em etapas para gerar o vírus VACV∆E3L83N∆TK∆E5R recombinante que expressa as proteínas anti-muCTLA-4, hFlt3L, mOX40L e mIL12 por meio de de recombinação homóloga primeiro no locus TK e depois no locus E5R do genoma VACV∆E3L83N. O vetor pCB-anti-muCTLA-4 gpt foi usado para inserir um único cassete de

expressão para expressar as cadeias pesadas e leves do anticorpo anti-muCTLA-4 sob o controle do promotor inicial e tardio sintético do vírus vaccinia (PsE/L). A recombinação homóloga que ocorreu nos locais TK-L e TK-R resulta na inserção do cassete de expressão do anticorpo anti-CTLA-4 no locus TK no genoma VACV∆E3L83N, gerando o vírus recombinante VACV∆E3L83N-∆TK-anti- muCTLA-4.

[0778] O vetor pUC57-hFlt3L-mOX40L-mIL12 mCherry foi usado para inserir um único cassete de expressão projetado para expressar a proteína de fusão hFlt3L-mOX40L e a proteína mIL12 separadamente usando o promotor inicial e tardio sintético viral vaccinia (PsE/L) em direções opostas. A sequência de codificação de hFlt3L-mOX40L foi separada por um cassete incluindo um sítio de clivagem de furina seguido por uma sequência Pep2A. A recombinação homóloga nos loci E4L e E6R resulta na inserção do cassete de expressão para hFlt3L-mOX40L e mIL12 no locus E5L do vírus VACV∆E3L83N-∆TK-anti-muCTLA-4. As células BSC40 foram infectadas com VACV∆E3L83N a um MOI de 0,05 durante 1 h, e depois foram transfectadas com o plasmídeo pCB-anti-muCTLA-4 gpt. As células infectadas foram coletadas em 48 h. Os vírus recombinantes foram selecionados por meio de cultura adicional em meio de seleção incluindo MPA, xantina e hipoxantina, e purificados por placa. A análise de PCR foi realizada para verificar a inserção do gene anti-muCTLA-4 no locus TK.

[0779] Para inserir o cassete de expressão hFlt3L-mOX40L-mIL12 no locus E5R do vírus VACV∆E3L83N-∆TK-anti-muCTLA-4, as células BSC40 foram infectadas com VACV∆E3L83N-∆TK-anti-muCTLA-4 em um MOI de 0,05 por 1h e, em seguida, foram transfectados com o plasmídeo pUC57-hFlt3L-mOX40L-mIL12 mCherry. As células infectadas foram coletadas em 48 h. Os vírus recombinantes foram isolados por meio de da purificação de placa por pelo menos 4-5 rodadas, selecionando placas positivas para mCherry. A análise de PCR foi realizada para verificar a inserção do gene hFlt3L-mOX40L-mIL12 no locus E5R.

[0780] Fig.162 mostra a geração do vírus VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-muCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-mOX40L-mIL-12-ΔB2R por meio de da deleção do gene B2R de vírus VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-muCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-mOX40L-mIL-12. O vetor pB2R-FRT GFP foi usado para inserir GFP sob o controle do promotor vaccinia P7.5 no locus B2R do vírus recombinante VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-muCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-mOX40L-mIL-12. As células BSC40 foram infectadas com vírus VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-muCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-mOX40L-mIL-12 a um MOI de 0,05 por 1h e, em seguida, foram transfectadas com o DNA de plasmídeo descrito acima. As células infectadas foram coletadas em 48 h. Os vírus recombinantes foram identificados por sua fluorescência verde com a inserção de GFP nos loci B2R e por mCherry no vírus parental. Os clones positivos foram purificados em placa 4-5 vezes em células BSC40. A análise de PCR foi realizada para confirmar que o vírus recombinante VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-muCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-mOX40L-mIL-12 perdeu o gene B2R.

Exemplo 129: VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-muCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-mOX40L-mIL-12 e VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-muCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-mOX40L-mIL-12-ΔB2R são replicações compentes células BSC40 e células de melanoma B16-F10.

[0781] As capacidades de replicação de VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-muCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-mOX40L-mIL-12 (OV-VACVΔE5R) e VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-muCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-mOX40L-mIL-12-ΔB2R (OV-VACVΔE5RΔB2R) em células BSC40 e células de melanoma B16-F10 murinas foram determinadas infectando-as a um MOI de 0,01. As células foram coletadas em vários pontos de tempo após a infecção e os rendimentos virais (log pfu) foram determinados por titulação em células BSC40. **A FIG. 163** mostra os gráficos de rendimentos virais traçados contra horas após a infecção. VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-muCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-mOX40L-mIL-12 e VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-muCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-mOX40L-mIL-12-ΔB2R são replicações compentes células BSC40 e células de melanoma B16-F10.

Exemplo 130: Infecção por VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-muCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-mOX40L-mIL-12 (OV-VACVΔE5R) e VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-muCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-mOX40L-mIL-12-ΔB2R (OV-VACVΔE5RΔB2R) de BMDCs induz a expressão do gene IFNB tipo I e a secreção da proteína IFN-β.

[0782] Para testar se os vírus recombinantes VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-muCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-mOX40L-mIL-12 (OV-VACVΔE5R) e VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-muCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-mOX40L-mIL-12-ΔB2R (OV-VACVΔE5RΔB2R) induz a produção de IFN tipo I em BMDCs, WT e cGAS$^{-/-}$ BMDCs foram infectados com esses vírus a um MOI de 10. As células foram coletadas 6h após a infecção. Os RNAs foram extraídos. Os níveis de expressão do gene IFNB foram determinados por análises quantitativas de RT-PCR. Os sobrenadantes foram coletados 24 horas após a infecção e os níveis de IFN-β nos sobrenadantes foram medidos por ELISA. Os resultados de RT-PCR mostraram que, enquanto a infecção por WT VACV de BMDCs induziu níveis 225 vezes maiores de expressão do gene IFNB em comparação com o controle sem tratamento, infecção por VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-muCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-mOX40L-mIL-12 ou VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-muCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-mOX40L-mIL-12-ΔB2R induziu níveis 1546 e 5501 vezes mais elevados de expressão do gene IFNB, respectivamente, em comparação com o controle sem infecção (**Fig. 164A)**. A indução da expressão do gene IFNB por OV-VACVΔE5RΔB2R ou OV-VACVΔE5R foi abolida em cGAS$^{-/-}$ BMDCs.

[0783] Os resultados de ELISA mostraram que VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-muCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-mOX40L-mIL-12 ou VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-muCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-mOX-12-mIL-12 A infecção por B2R de BMDCs induziu a secreção de IFN-β a partir de BMDCs (**Fig. 164B)**. Estes resultados indicam que VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-muCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-mOX40L-mIL-12 (OV-VACVΔE5R) ou VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-muCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-mIL-12 -mIL-12-ΔB2R (OV-VACVΔE5RΔB2R) induziu níveis mais elevados de expressão do gene IFNB e secreção de proteína IFN-β do que WT VACV de

BMDCs. Além disso, a infecção por OV-VACV∆E5R∆B2R de BMDCs induz níveis mais elevados de expressão do gene IFNB e secreção de IFN-b em comparação com OV-VACV∆E5R (FIG. 164). Portanto, OV-VACV∆E5R∆B2R é mais imunoativador em comparação com OV-VACV∆E5R.

Exemplo 131: Expressão de anti-muCTLA-4-hFlt3L, mOX40L em células de melanoma B16-F10 infectadas com vírus E3L∆83N-∆TK-anti-muCTLA-4-∆E5R-hFlt3L-mOX40L-mIL12.

[0784] Para determinar se o vírus recombinante VACVΔE3L83N-∆TK-anti-muCTLA-4-∆E5R-hFlt3L-mOX40L-mIL-12 (OV-VACV∆E5R) é capaz de expressar os transgenes desejados, células de melanoma murino B16-F10 foram infectadas com VACVΔE3L83N-∆TK-anti-muCTLA-4-∆E5R-hFlt3L-mOX40L-mIL-12 (OV-VACV∆E5R) a um MOI de 10. Os lisados celulares foram coletados em vários momentos (8, 24 e 48 horas) após a infecção. As análises de Western blot foram realizadas para determinar a expressão das proteínas anti-muCTLA-4 e hFlt3L. Como mostrado na **FIG.165A,** houve expressões abundantes de anticorpo anti-muCTLA-4 e hFlt3L em células B16-F10 infectadas com vírus VACVΔE3L83N-∆TK-anti-muCTLA-4-∆E5R-hFlt3L-mOX40L-mIL-12. Células de melanoma murino B16-F10 também foram infectadas com VACVΔE3L83N-∆TK-anti-muCTLA-4-∆E5R-hFlt3L-mOX40L-mIL-12 a um MOI de 10, e a expressão de mOX40L na superfície celular foi determinada por análise FACS. Como mostrado na **Fig.165B,** 99,5% das células infectadas expressaram mOX40L na superfície celular. Estes resultados demonstram que o poxvírus recombinante da presente tecnologia tem a capacidade de expressar transgenes específicos de interesse em células infectadas.

Exemplo 132: vírus E3L∆83N-∆TK-anti-muCTLA-4-∆E5R-hFlt3L-mOX40L-mIL-12 injetado por via intratumoral tem a capacidade de expressar os transgenes desejados em tumores implantados *in vivo*.

[0785] Um modelo de implantação de tumor unilateral foi usado para avaliar se os vírus recombinantes podem expressar transgenes específicos em

tumores implantados *in vivo*. Células de melanoma B16-F10 (5x10 ^{5} células) foram implantados intradermicamente na pele raspada no flanco direito de camundongos C57BL/6J. Oito dias após a implantação do tumor, os tumores (cerca de 4 mm de diâmetro) foram injetados com o vírus VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-muCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-mOX40L-mIL-12. Amostras de tumor foram coletadas 48 horas após a injeção do vírus. As análises de Western blot mostraram que mIL-12 foi detectado em tumores tratados com o vírus recombinante que expressa mIL-12, mas não em tumores tratados com PBS (**FIG. 165C)**. Estes resultados demonstram que o vírus VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-muCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-mOX40L-mIL-12 recombinante pode expressar transgenes específicos desejados em tumores injetados *in vivo*.

Exemplo 133: Secreção de mIL-12 de células de melanoma B16-F10 murino, células de câncer de mama 4T1 e células de câncer de cólon MC38 por meio de infecção de vírus E3LΔ83N-ΔTK-anti-muCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-mOX40L-mIL-12.

[0786] Para examinar se as células infectadas por vírus recombinantes são capazes de secretar as proteínas desejadas, células de melanoma murino B16-F10, células de câncer de mama 4T1 e células de câncer de cólon MC38 foram falsamente infectadas ou infectadas com VACV ou E3LΔ83N-ΔTK-anti- muCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-mOX40L-mIL-12 (OV-VACVΔE5R) a um MOI de 10. O sobrenadante foi coletado 24 e 48 horas após a infecção. O ELISA foi usado para medir a concentração de mIL-12 segregado no sobrenadante. Como mostrado na **FIG.166**, há altos níveis de proteína mIL-12 nos sobrenadantes de E3LΔ83N-ΔTK-anti-muCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-mOX40L-mIL-12 (OV-VACVΔE5R) células de melanoma B16-F10 infectadas com vírus (Fig. 166A), células de câncer de mama 4T1 (Fig. 166B) e células de câncer de cólon MC38 (Fig. 166C). Estes resultados demonstram que a infecção de células de tumor por OV-VACVΔE5R leva à liberação de mIL-12. Para evitar a toxicidade de mIL-12, a marcação da matriz extracelular foi inserida no terminal C da subunidade p30 de IL12. A sequência de codificação

das subunidades p40 e p30 de mIL12 foi separada por um sítio de clivagem de furina seguido por uma sequência Pep2A. O terminal C da subunidade p30 é marcado com uma sequência de ligação à matriz.

Exemplo 134: injeção intratumoral de E3LΔ83N-ΔTK-anti-muCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-mOX40L-mIL-12 (OV-VACVΔE5R) é mais eficaz do que HT-iMVA em um modelo de implantação de tumor bilateral B16-F10.

[0787] Para testar as *atividades de morte tumoral in vivo* do vírus recombinante E3LΔ83N-ΔTK-anti-muCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-mOX40L-mIL-12, um modelo de implantação tumoral bilateral foi usado. As células de melanoma B16-F10 foram implantadas por via intradermica na pele raspada nos flancos direito ($5x10^5$ células) e esquerdo ($1x10^5$ células) de um camundongo C57BL/6J. Após 7 a 8 dias após a implantação, os tumores maiores no flanco direito (cerca de 3 mm ou maior de diâmetro) foram injetados por via intratumoral duas vezes por semana com PBS, HT-iMVA, E3LΔ83N-ΔTK-anti-muCTLA-4- ΔE5R-hFlt3L-mOX40L-mIL-12 ou E3LΔ83N-ΔTK-anti-muCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-mOX40L-mIL-12 mais injeção intraperitoneal (IP) de anticorpo anti-PD-L1 (250 µg/mouse). Os camundongos foram monitorados quanto à sobrevivência e os tamanhos dos tumores foram medidos duas vezes por semana. **A FIG.167A** mostra o volume do tumor e a **Fig.167B** mostra a curva de sobrevivência de Kaplan-Meier do experimento. **A Fig.167B** mostra que os camundongos com tumores simulados com PBS cresceram muito rapidamente e os camundongos morreram com uma sobrevida média de 14 dias. A injeção de HT-iMVA nos tumores estendeu o dia médio de sobrevivência para 18 dias. A injeção de E3LΔ83N-ΔTK-anti-muCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-mOX40L-mIL-12 aumenta a sobrevida média para 30 dias. A injeção intratumoral de E3LΔ83N-ΔTK-anti-muCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-mOX40L-mIL-12 mais a injeção IP de anticorpo anti-muPD-L1 (250 µg/camundongo) também aumentou a sobrevida média para 30 dias. **FIG.167A** demonstra o volume do tumor medido ao longo do tempo para tumores injetados e tumores não injetados. Estes resultados demonstram que a expressão de anti-muCTLA-4, hFlt3L, mOX40L e mIL-12

pelo vírus E3LΔ83N-ΔTK-anti-muCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-mOX40L-mIL-12 manipulado é capaz de reduzir o volume do tumor e retardar o crescimento do tumor em tumores injetados e não injetados, demonstrando assim um efeito abscopal. Consequentemente, estes resultados demonstram que os poxvírus recombinantes da presente tecnologia são úteis em métodos para o tratamento de tumores sólidos.

Exemplo 135: administração intratumoral de E3LΔ83N-ΔTK-anti-muCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-mOX40L-mIL-12ΔB2R induz respostas de células T sistêmicas antitumorais mais fortes em comparação com E3LΔ83N-ΔTK-anti-muCTLA-4- ΔE5R-hFlt3L-mOX40L-mIL-12 ou Heat-iMVA.

[0788] A infecção de BMDCs com E3LΔ83N-ΔTK-anti-muCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-mOX40L-mIL-12-ΔB2R induz uma produção de IFN tipo I mais forte em comparação com E3LΔ83N-ΔTK-anti-muCTLA- 4-ΔE5R-hFlt3L-mOX40L-mIL-12. Sem estar limitado pela teoria, é hipotetizado que a administração de IT de vírus E3LΔ83N-ΔTK-anti-muCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-mOX40L-mIL-12-ΔB2R induziria respostas imunológicas antitumorais mais fortes. Para testar se a deleção adicional de B2R de E3LΔ83N-ΔTK-anti-muCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-mOX40L-mIL-12 aumentará a eficácia antitumoral, células de melanoma B16-F10 foram implantadas por via intradérmica nos flancos esquerdo e direito de camundongos C57B/6J ($5x10^5$ no flanco direito e $2,5x10^5$ no flanco esquerdo). Sete dias após a implantação do tumor, $2x10^7$ pfu de E3LΔ83N-ΔTK-anti-muCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-mOX40L-mIL-12-ΔB2R, E3LΔ83N-ΔTK-anti-muCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-mOX40L-mIL-12, ou uma quantidade equivalente de Heat-iMVA, ou PBS foi injetado por via intratumoral nos tumores maiores no flanco direito duas vezes, com três dias de intervalo. Os baços foram coletados 3 dias após a segunda injeção, as análises ELISPOT foram realizadas para avaliar as células T específicas do tumor nos baços. O ensaio ELISPOT foi realizado por co-cultura de células B16-F10 irradiadas (150.000) e esplenócitos (1.000.000) em uma placa de 96 cavidades. **FIG.168A** mostra um gráfico de ^{p}ontos de IFN-γ^{+} por 1.000.000 de

esplenócitos. **A FIG. 168B** mostra a imagem de ELISPOT de amostras em triplicado de esplenócitos combinados de camundongos no mesmo grupo de tratamento. Estes resultados mostram que a injeção IT de E3LΔ83N-ΔTK-anti-muCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-mOX40L-mIL-12-ΔB2R gerou as respostas de células T antitumorais mais fortes nos baços de camundongos tratados em comparação com E3L Δ83N-ΔTK-anti-muCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-mOX40L-mIL-12 ou Heat-iMVA.

Exemplo 136: Geração dos vírus vaccinia recombinantes com deleções TK-E3L83N-E5R e expressando anti-huCTLA-4, hFlt3L, hOX40L e hIL-12 (VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hILOX40- 12).

[0789] Este exemplo descreve a geração do vírus VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-IL-12 recombinante.

[0790] A **FIG. 169** mostra a estratégia em etapas para gerar o vírus VACVΔE3L83NΔTKΔE5R recombinante que expressa as proteínas anti-huCTLA-4, hFlt3L, hOX40L e hIL12 por meio de de recombinação homóloga primeiro no locus TK e depois no locus E5R do genoma VACVΔE3L83N. O vetor pCB-anti-huCTLA-4 gpt foi usado para inserir um único cassete de expressão para expressar as cadeias pesadas e leves do anticorpo anti-huCTLA-4 sob o controle do promotor inicial e tardio sintético do vírus vaccinia (PsE/L). A recombinação homóloga que ocorreu nos locais TK-L e TK-R resulta na inserção do cassete de expressão do anticorpo anti-huCTLA-4 no locus TK do genoma VACVΔE3L83N, gerando o vírus recombinante VACVΔE3L83N-ΔTK-anti -huCTLA-4. O vetor pUC57-hFlt3L-hOX40L-hIL12 mCherry foi usado para inserir um único cassete de expressão projetado para expressar a proteína de fusão hFlt3L-hOX40L e a proteína hIL12 separadamente usando o promotor precoce e tardio sintético viral vaccinia (PsE/L) na direção oposta. A sequência de codificação de hFlt3L-hOX40L foi separada por um cassete incluindo um sítio de clivagem de furina seguido por uma sequência Pep2A. A recombinação homóloga nos loci E4L e E6R resulta na inserção do cassete de expressão para hFlt3L-hOX40L e hIL12 no locus E5L do vírus VACVΔE3L83N-

ΔTK-anti-huCTLA-4. As células BSC40 foram infectadas com VACVΔE3L83N a um MOI de 0,05 durante 1 h, e depois foram transfectadas com o plasmídeo pCB-anti-muCTLA-4 gpt. As células infectadas serão coletadas 48h após a infecção do vírus. Os vírus recombinantes serão selecionados por meio de cultura adicional em meio de seleção incluindo MPA, xantina e hipoxantina, e purificados por placa. A análise de PCR foi realizada para verificar a inserção do gene anti-muCTLA-4 no locus TK. Para inserir o cassete de expressão hFlt3L-hOX40L-hIL12 no locus E5R do vírus VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4, as células BSC40 foram infectadas com VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4 em um MOI de 0,05 por 1h e, em seguida, foram transfectados com o plasmídeo pUC57-hFlt3L-hOX40L-hIL12 mCherry. As células infectadas serão coletadas 48h após a infecção do vírus. Os vírus recombinantes serão isolados por meio da purificação de placas, selecionando placas de vírus mCherry positivas. A análise de PCR será realizada para verificar a inserção do gene hFlt3L-hOX40L-hIL12 no locus E5R. Os genes vaccinia B2R, B18R e WR199 serão posteriormente deletados para aumentar a resposta imunológica inata desse vírus.

Exemplo 137: Geração dos vírus mixoma recombinantes MixomaΔM063R e MixomaΔM064R.

[0791] Mixoma M063R (M63R) e M064R (M64R) são ortólogos de vaccinia C7. Para testar se a deleção de M063R ou M064R do genoma parental melhora a capacidade de indução de IFN do vírus Mixoma, os inventores geraram MixomaΔM063R e MixomaΔM064R por meio de recombinações homólogas nos braços de homologia dos plasmídeos transfectados e do genoma viral de mixoma parental **(FIG. 170)**. O vetor pUC57 é usado para inserir um único cassete de expressão projetado para expressar EGFP usando o promotor precoce e tardio sintético viral de vaccinia (PsE/L). A recombinação homóloga que ocorreu nos loci M062R e M064R resulta na inserção do cassete de expressão para EGFP e na deleção de M063. Similarmente, A recombinação homóloga que ocorreu nos loci M063R e M065R

resulta na inserção do cassete de expressão para EGFP e na deleção de M064. Resumidamente, as células BGMK foram infectadas com o vírus mixoma parental MixomaΔM127-mcherry (Mixoma-mcherry) a um MOI de MOI de 0,05 por 1 h, e então foram transfectadas com os DNAs de plasmídeo descritos acima. As células infectadas foram coletadas em 48 h. Os vírus recombinantes foram identificados por sua fluorescência verde com a inserção de EGFP nos loci M063 ou M064 e por mCherry no vírus parental. Os clones positivos duplos foram então purificados 6-8 vezes em células BGMK. A análise de PCR foi realizada para confirmar que os vírus recombinantes MyxomaΔM063R (ΔM63R) e MyxomaΔM064R (ΔM064R) perderam os genes M063R e M064R, respectivamente.

Exemplo 138: MixomaΔM063R e MixomaΔM064R induzem níveis mais elevados de expressão do gene IFNB e secreção de proteínas IFN-β em BMDCs em comparação com o vírus parental.

[0792] Para testar se a deleção do gene M063R ou do gene M064R do vírus mixoma parental (Myxoma-mcherry) induz níveis mais elevados de IFN tipo I, BMDCs (1x10 ^{6}) de camundongos WT C57BL/6J foram infectados com Myxoma-mcherry, MyxomaΔM063R, MyxomaΔM064R ou MVA a um MOI de 10. As células foram coletadas 6h após a infecção. Os sobrenadantes foram coletados 19 horas após a infecção. A expressão do gene IFNB foi determinada por RT-PCR. Os resultados mostram que MyxomaΔM063R e MyxomaΔM064R induzem níveis mais elevados de expressão do gene IFNB em comparação com Myxoma-mcherry, mas níveis mais baixos de IFNB em comparação com MVA em BMDCs **(FIG. 171A)**.

[0793] Os níveis de proteína IFN-ß nos sobrenadantes foram determinados por ELISA **(FIG. 171B)**. Os resultados mostram que tanto a infecção por MyxomaΔM064 quanto MyxomaΔM063 de BMDCs induzem níveis mais elevados de IFN-ß secreção de proteína em comparação com Myxoma-mcherry. Estes resultados indicam que a remoção dos ortólogos de vaccinia C7 do vírus mixoma melhora ainda mais a capacidade de indução de IFN do vírus.

Exemplo 139: administração intratumoral de Myxoma-mcherry ou MyxomaΔM064R induz a ativação de células CD8 e CD4 T em tumores injetados dois dias após o tratamento em um modelo de melanoma B16-f10.

[0794] Para avaliar se a administração de TI do vírus mixoma parental ou MyxomaΔM064R altera o microambiente tumoral imunossupressor, o seguinte experimento foi realizado. Resumidamente, as células de melanoma B16-F10 foram implantadas por via intradermica na pele raspada nos flancos direito ($5x10^5$ células) e esquerdo ($2,5x10^5$ células) de um camundongo C57BL/6J. Sete dias após a implantação, os tumores maiores no flanco direito foram injetados com $4x10^7$ pfu de Myxoma-mcherry, MyxomaΔM064 ou MVAΔE5R ou PBS apenas uma vez. Dois dias após a injeção, os tumores foram coletados e as células foram processadas para marcação de superfície com anti-CD3, CD45, CD4, CD8 e também para coloração de Granzyme Bintracelular. Os infiltrados de células imunológicas vivas nos tumores foram analisados por FACS **(FIG. 172)**. **A FIG. 173A** mostra gráficos de pontos representativos de células Granzyme B^+CD8^+T. IT de Myxoma-mcherry, MyxomΔM064 ou MVAΔE5R resulta na ativação de células $CD8^+$ T nos tumores injetados. **A FIG. 173B** mostra que IT de Myxoma-mcherry, MyxomΔM064 ou MVAΔE5R resulta em números mais elevados de células $CD45^+$ nos tumores injetados em comparação com aqueles tratados com PBS. **A FIG. 173C** mostra IT de Myxoma-mcherry, MyxomaΔM064 ou MVAΔE5R resulta em porcentagens mais altas de células Granzyme B^+CD8^+ nos tumores injetados em comparação com aqueles tratados com PBS. **A FIG. 174A** mostra gráficos de pontos representativos de células Granzyme B^+CD4^+ T. IT de Myxoma-mcherry, MyxomΔM064 ou MVAΔE5R resulta na ativação de células $CD4^+$ T nos tumores injetados. **A FIG. 174B** mostra IT de Myxoma-mcherry, MyxomaΔM064 ou MVAΔE5R resulta em porcentagens mais altas de células Granzyme B^+CD4^+ nos tumores injetados em comparação com aqueles tratados com PBS. Estes resultados demonstram que os poxvírus

recombinantes da presente tecnologia são úteis em métodos para o tratamento de tumores sólidos.

EQUIVALENTES

[0795] A presente tecnologia não deve ser limitada em termos das modalidades particulares descritas neste pedido, que se destinam como ilustrações únicas de aspectos individuais da presente tecnologia. Muitas modificações e variações desta tecnologia presente podem ser feitas sem se afastar de seu âmbito e escopo, como será evidente para aqueles versados na técnica. Métodos e aparelhos funcionalmente equivalentes dentro do escopo da presente tecnologia, além daqueles enumerados neste documento, serão evidentes para aqueles versados na técnica a partir das descrições anteriores. Tais modificações e variações destinam-se a cair dentro do escopo da presente tecnologia. A presente tecnologia deve ser limitada apenas pelos termos das reivindicações anexas, juntamente com o escopo completo de equivalentes aos quais tais reivindicações têm direito. Deve ser entendido que esta tecnologia presente não está limitada a métodos, reagentes, composições de compostos ou sistemas biológicos particulares, que podem, é claro, variar. Também deve ser entendido que a terminologia usada neste documento tem a finalidade de descrever modalidades particulares apenas e não se destina a ser limitante.

[0796] Além disso, onde as características ou aspectos da divulgação são descritos em termos de grupos Markush, aqueles versados na técnica reconhecerão que a divulgação também é assim descrita em termos de qualquer membro individual ou subgrupo de membros do grupo Markush.

[0797] Como será entendido por um versado na técnica, para todos e quaisquer fins, particularmente em termos de fornecer uma descrição escrita, todas as faixas divulgadas neste documento também abrangem todas e quaisquer subfaixas possíveis e combinações de subfaixas dos mesmos. Qualquer faixa listada pode ser facilmente reconhecida como descrevendo suficientemente e permitindo que a mesma faixa seja dividida em pelo menos metades iguais, terços, quartos, quintos, décimos, *etc.* Como um exemplo não

limitativo, cada faixa discutida neste documento pode ser facilmente dividida em um terço inferior, terço médio e terço superior, *etc.* Como também será entendido por um versado na técnica, todas as linguagens, como "até", "pelo menos", "maior que", "menor que" e similares, incluem o número citado e referem-se a faixas que podem ser subsequentemente divididos em subfaixas como discutido acima. Finalmente, como será entendido por um versado na técnica, uma faixa inclui cada membro individual. Assim, por exemplo, um grupo com 1-3 células refere-se a grupos com 1, 2 ou 3 células. Da mesma forma, um grupo com 1-5 células refere-se a grupos com 1, 2, 3, 4 ou 5 células e assim por diante.

[0798] Todas as patentes, pedidos de patentes, pedidos provisórios e publicações mencionados ou citados neste documento são incorporados por referência em sua totalidade, incluindo todas as figuras e tabelas, na medida em que não sejam inconsistentes com os ensinamentos explícitos desta especificação.

[0799] Outras modalidades são estabelecidas nas seguintes reivindicações.

REIVINDICAÇÕES

1. Vírus vaccinia Ankara (MVA) modificado recombinante, caracterizado pelo fato de que compreende um gene C7 mutante e uma molécula de ácido nucleico heteróloga que codifica OX40L (MVAΔC7L-OX40L).

2. Vírus MVAΔC7L-OX40L recombinante, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o vírus compreende ainda um ácido nucleico heterólogo que codifica o ligante de tirosina quinase 3 tipo Fms humano (hFlt3L) (MVAΔC7L-hFlt3L-OX40L).

3. Vírus MVAΔC7L-OX40L recombinante, de acordo com a reivindicação 1 ou reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que o vírus compreende ainda um gene da timidina quinase (TK) mutante.

4. Vírus MVAΔC7L-OX40L recombinante, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que o gene de TK mutante compreende a substituição de pelo menos uma porção do gene por um ou mais cassetes de genes compreendendo uma molécula de ácido nucleico heteróloga.

5. Vírus MVAΔC7L-OX40L recombinante, de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que um ou mais cassetes de genes compreendem a molécula de ácido nucleico heteróloga que codifica OX40L.

6. Vírus MVAΔC7L-OX40L recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-5, caracterizado pelo fato de que o gene C7 mutante compreende uma inserção de um ou mais cassetes de genes compreendendo uma molécula de ácido nucleico heteróloga.

7. Vírus MVAΔC7L-OX40L recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 -5, caracterizado pelo fato de que o gene C7 mutante compreende a substituição de todo ou pelo menos uma porção do gene por um ou mais cassetes de genes compreendendo uma molécula de ácido nucleico heteróloga.

8. Vírus MVAΔC7L-OX40L recombinante, de acordo com a reivindicação 6 ou reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que um ou mais

cassetes de genes compreendem a molécula de ácido nucleico heteróloga que codifica hFlt3L.

9. Vírus MVAΔC7L-OX40L recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 2-8, caracterizado pelo fato de que o gene C7 mutante compreende a substituição de pelo menos uma porção do gene por um ou mais cassetes de genes compreendendo a molécula de ácido nucleico heteróloga que codifica hFlt3L, e em que o vírus compreende adicionalmente um gene de TK mutante que compreende a substituição de pelo menos uma porção do gene de TK por um ou mais cassetes de genes compreendendo a molécula de ácido nucleico heteróloga que codifica OX40L (MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-OX40L).

10. Vírus MVAΔC7L-OX40L recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-9, caracterizado pelo fato de que o OX40L é expresso a partir de dentro de um gene viral de MVA.

11. Vírus MVAΔC7L-OX40L recombinante, de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que o OX40L é expresso a partir de dentro de um gene viral selecionado a partir do grupo que consiste no gene da timidina quinase (TK), o gene C7, o gene C11, o gene K3, o gene F1, o gene F2, o gene F4, o gene F6, o gene F8, o gene F9, o gene F11, o gene F14.5, o gene J2, o gene A46, o gene E3L, o gene B18R (WR200), o O gene E5R, o gene K7R, o gene C12L, o gene B8R, o gene B14R, o gene N1L, o gene K1L, o gene C16, o gene M1L, o gene N2L e o gene WR199.

12. Vírus MVAΔC7L-OX40L recombinante, de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que o OX40L é expresso a partir de dentro de um gene TK.

13. Vírus MVAΔC7L-OX40L recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 3-10, caracterizado pelo fato de que o OX40L é expresso a partir de dentro de um gene TK e o hFlt3L é expresso de dentro do gene C7.

14. Vírus MVAΔC7L-OX40L recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-13, caracterizado pelo fato de que o vírus compreende ainda uma molécula de ácido nucleico heteróloga que codifica um ou mais dentre hIL-2, hIL-12, hIL-15, hIL-15/IL-15Rα, hIL-18, hIL-21, anti-huCTLA-4, anti-huPD-1, anti-huPD-L1, GITRL, 4-1BBL ou CD40L e/ou uma deleção de qualquer um ou mais dentre E3L (ΔE3L), E3LΔ83N, B2R (ΔB2R), B19R (B18R; ΔWR200), IL18BP, E5R, K7R, C12L, B8R, B14R, N1L, C11R, K1L, M1L, N2L ou WR199.

15. Vírus MVAΔC7L-OX40L recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-14, caracterizado pelo fato de que o vírus MVA recombinante exibe uma ou mais das seguintes características:

indução de níveis aumentados de células T efetoras em células de tumor em comparação com células de tumor infectadas com o vírus MVAΔC7L correspondente;

indução de aumento da produção esplênica de células T efetoras em comparação com o vírus MVAΔC7L correspondente; e

redução do volume do tumor em células de tumor em contato com o vírus MVAΔC7L-OX40L recombinante em comparação com as células de tumor em contato com o vírus MVAΔC7L correspondente.

16. Vírus MVAΔC7L-OX40L recombinante, de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pelo fato de que as células de tumor compreendem células de melanoma.

17. Composição imunogênica, caracterizada pelo fato de que compreende o vírus MVAΔC7L-OX40L recombinante definido de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-16.

18. Composição imunogênica, de acordo com a reivindicação 17, caracterizada pelo fato de que compreende ainda um veículo farmaceuticamente aceitável.

19. Composição imunogênica, de acordo com a reivindicação 17 ou reivindicação 18, caracterizada pelo fato de que compreende ainda um adjuvante farmaceuticamente aceitável.

20. Método para tratar um tumor sólido em um indivíduo em necessidade, o método caracterizado pelo fato de que compreende a administração a um tumor de uma composição compreendendo uma quantidade eficaz do vírus MVAΔC7L-OX40L recombinante, definido de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-16, ou a composição imunogênica definida de qualquer uma das reivindicações 17-19.

21. Método, de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo fato de que o tratamento compreende um ou mais dentre os seguintes: induzir uma resposta imunológica no indivíduo contra o tumor ou aumentar ou promover uma resposta imunológica contínua contra o tumor no indivíduo, reduzir o tamanho do tumor, erradicar o tumor, inibir o crescimento do tumor, inibir o crescimento metastático do tumor, induzir apoptose de células de tumor ou prolongar a sobrevivência do indivíduo.

22. Método, de acordo com a reivindicação 21, caracterizado pelo fato de que induzir, aumentar ou a promover a resposta imunológica compreende um ou mais dentre os seguintes:

níveis aumentados de células T efetoras em células tumorais em comparação com células de tumor infectadas com o vírus MVAΔC7L correspondente; e

aumento da produção esplênica de células T efetoras em comparação com o vírus MVAΔC7L correspondente.

23. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 20-22, caracterizado pelo fato de que a composição é administrada por injeção intratumoral ou intravenosa ou uma combinação simultânea ou sequencial de injeção intratumoral e intravenosa.

24. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 20-23, caracterizado pelo fato de que o tumor é melanoma, cólon, mama, bexiga ou carcinoma da próstata.

25. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 20-24, caracterizado pelo fato de que a composição compreende ainda um ou mais dentre os agentes selecionados a partir de: um ou mais agentes de bloqueio de ponto de verificação imunológico; um ou mais medicamentos anticâncer; fingolimode (FTY720); e qualquer combinação dos mesmos.

26. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 20-24, caracterizado pelo fato de que o método compreende ainda administrar separada, sequencial ou simultaneamente ao indivíduo um ou mais agentes selecionados a partir de: um ou mais agentes de bloqueio de ponto de verificação imunológico; um ou mais medicamentos anticâncer, fingolimode (FTY720); e qualquer combinação dos mesmos.

27. Método, de acordo com a reivindicação 25 ou 26, caracterizado pelo fato de que:

o um ou mais agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico são selecionados a partir do grupo que consiste em anticorpo anti-PD-L1, anticorpo anti-PD-1, anticorpo anti-CTLA-4, ipilimumabe, nivolumabe, pidilizumabe, lambrolizumabe, pembrolizumabe, atezolizumabe, avelumabe, durvalumabe, MPDL3280A, BMS-936559, MEDI-4736, MSB 00107180, LAG-3, TIM3, B7-H3, B7-H4, TIGIT, AMP-224, MDX-1105, arelumabe, tremelimumabe, IMP321, MGA271, BMS-986016, lirilumabe, urelumabe, PF-05082566, IPH2101, MEDI-6469, CP-870.893, mogamulizumabe, varlilumabe, galiximabe, AMP-514, AUNP 12, Indoximode, NLG-919, INCB024360, CD80, DLBCL ICOS, PDR001 e qualquer combinação dos mesmos; e/ou

o um ou mais medicamentos anticâncer são selecionados a partir do grupo que consiste em um inibidor de Mek (U0126, selumitinibe (AZD6244), PD98059, trametinibe, cobimetinibe), um inibidor de EGFR (lapatinibe (LPN), erlotinibe (ERL)), um inibidor de HER2 (lapatinibe (LPN), Trastuzumabe), um

inibidor de Raf (sorafenibe (SFN)), um inibidor de BRAF (dabrafenibe, vemurafenibe), um anticorpo anti-OX40, um anticorpo agonista GITR, um anticorpo anti-CSFR, um inibidor de CSFR, paclitaxel, agonista de TLR9 (CpG) e um inibidor de VEGF (bevacizumabw), e qualquer combinação dos mesmos.

28. Método, de acordo com a reivindicação 27, caracterizado pelo fato de que um ou mais agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico compreendem o anticorpo anti-PD-L1.

29. Método, de acordo com a reivindicação 27, caracterizado pelo fato de que um ou mais agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico compreendem o anticorpo. anti-PD-1.

30. Método, de acordo com a reivindicação 27, caracterizado pelo fato de que um ou mais agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico compreendem o anticorpo anti-CTLA-4.

31. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 25-27, caracterizado pelo fato de que a combinação de MVAΔC7L-OX40L ou MVAΔC7L-hFlt3L-OX40L com o agente de bloqueio do ponto de verificação imunológico, medicamento anticâncer e/ou fingolimode (FTY720) tem um efeito sinérgico no tratamento do tumor em comparação com a administração de MVAΔC7L-OX40L ou MVAΔC7L-hFlt3L-OX40L ou do agente de bloqueio do ponto de verificação imunológico, medicamento anticâncer ou fingolimode (FTY720) sozinho.

32. Método de estimulação de uma resposta imunológica, caracterizado pelo fato de que compreende administrar a um indivíduo de uma quantidade eficaz do vírus, definido de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 16, ou a composição imunogênica, definida de acordo com qualquer uma das reivindicações de 17 a 19.

33. Método, de acordo com qualquer a reivindicação 32, caracterizado pelo fato de que o método compreende ainda administrar separada, sequencial ou simultaneamente ao indivíduo um ou mais agentes selecionados a partir de: um ou mais agentes de bloqueio de ponto de

verificação imunológico; um ou mais medicamentos anticâncer, fingolimode (FTY720); e qualquer combinação dos mesmos.

34. Método, de acordo com a reivindicação 33, caracterizado pelo fato de que:

o um ou mais agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico são selecionados a partir do grupo que consiste em anticorpo anti-PD-L1, anticorpo anti-PD-1, anticorpo anti-CTLA-4, ipilimumabe, nivolumabe, pidilizumabe, lambrolizumabe, pembrolizumabe, atezolizumabe, avelumabe, durvalumabe, MPDL3280A, BMS-936559, MEDI-4736, MSB 00107180, LAG-3, TIM3, B7-H3, B7-H4, TIGIT, AMP-224, MDX-1105, arelumabe, tremelimumabe, IMP321, MGA271, BMS-986016, lirilumabe, urelumabe, PF-05082566, IPH2101, MEDI-6469, CP-870.893, mogamulizumabe, varlilumabe, galiximabe, AMP-514, AUNP 12, Indoximode, NLG-919, INCB024360, CD80, DLBCL ICOS, PDR001 e qualquer combinação dos mesmos; e/ou

o um ou mais medicamentos anticâncer são selecionados a partir do grupo que consiste em um inibidor de Mek (U0126, selumitinibe (AZD6244), PD98059, trametinibe, cobimetinibe), um inibidor de EGFR (lapatinibe (LPN), erlotinibe (ERL)), um inibidor de HER2 (lapatinibe (LPN), Trastuzumabe), um inibidor de Raf (sorafenibe (SFN)), um inibidor de BRAF (dabrafenibe, vemurafenibe), um anticorpo anti-OX40, um anticorpo agonista GITR, um anticorpo anti-CSFR, um inibidor de CSFR, paclitaxel, agonista de TLR9 (CpG) e um inibidor de VEGF (bevacizumabw), e qualquer combinação dos mesmos.

35. Método, de acordo com a reivindicação 34, caracterizado pelo fato de que um ou mais agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico compreendem o anticorpo anti-PD-L1.

36. Método, de acordo com a reivindicação 34, caracterizado pelo fato de que um ou mais agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico compreendem o anticorpo anti-PD-1.

37. Método, de acordo com a reivindicação 34, caracterizado pelo fato de que um ou mais agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico compreendem o anticorpo anti-CTLA-4.

38. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 32-34, caracterizado pelo fato de que a combinação de MVAΔC7L-OX40L ou MVAΔC7L-hFlt3L-OX40L com o agente de bloqueio do ponto de verificação imunológico, medicamento anticâncer e/ou fingolimode (FTY720) tem um efeito sinérgico na estimulação de resposta imunológica em comparação com a administração de MVAΔC7L-OX40L ou MVAΔC7L-hFlt3L-OX40L ou do agente de bloqueio do ponto de verificação imunológico, medicamento anticâncer ou fingolimode (FTY720) sozinho.

39. Vírus vaccinia Ankara (MVA) modificado recombinante, caracterizado pelo fato de que compreende um gene E3 mutante e uma molécula de ácido nucleico heteróloga que codifica OX40L (MVAΔE3L-OX40L).

40. Vírus MVAΔE3L-OX40L recombinante, de acordo com a reivindicação 39, caracterizado pelo fato de que o vírus compreende ainda um gene da timidina quinase (TK) mutante.

41. Vírus MVAΔE3L-OX40L recombinante, de acordo com a reivindicação 40, caracterizado pelo fato de que o gene de TK mutante compreende a substituição de pelo menos uma porção do gene por um ou mais cassetes de genes compreendendo uma molécula de ácido nucleico heteróloga.

42. Vírus MVAΔE3L-OX40L recombinante, de acordo com a reivindicação 41, caracterizado pelo fato de que um ou mais cassetes de genes compreendem a molécula de ácido nucleico heteróloga que codifica OX40L.

43. Vírus MVAΔE3L-OX40L recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 39-42, caracterizado pelo fato de que o OX40L é expresso a partir de dentro de um gene viral de MVA.

44. Vírus MVAΔE3L-OX40L recombinante, de acordo com a reivindicação 43, caracterizado pelo fato de que o OX40L é expresso a partir de

dentro de um gene viral selecionado a partir do grupo que consiste no gene da timidina quinase (TK), o gene C7, o gene C11, o gene K3, o gene F1, o gene F2, o gene F4, o gene F6, o gene F8, o gene F9, o gene F11, o gene F14.5, o gene J2, o gene A46, o gene E3L, o gene B18R (WR200), o O gene E5R, o gene K7R, o gene C12L, o gene B8R, o gene B14R, o gene N1L, o gene K1L, o gene C16, o gene M1L, o gene N2L e o gene WR199.

45. Vírus MVAΔE3L-OX40L recombinante, de acordo com a reivindicação 44, caracterizado pelo fato de que o OX40L é expresso a partir de dentro de um gene TK.

46. Vírus MVAΔE3L-OX40L recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 39-45, caracterizado pelo fato de que o vírus compreende ainda uma molécula de ácido nucleico heteróloga que codifica um ou mais dentre hFlt3L, hIL-2, hIL-12, hIL-15, hIL-15/IL-15Rα, hIL-18, hIL-21, anti-huCTLA-4, anti-huPD-1, anti-huPD-L1, GITRL, 4-1BBL ou CD40L e/ou uma deleção de qualquer um ou mais dentre E3LΔ83N, B2R (ΔB2R), B19R (B18R; ΔWR200), E5R, K7R, C12L (IL18BP), B8R, B14R, N1L, C11R, K1L, M1L, N2L ou WR199.

47. Vírus MVAΔE3L-OX40L recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 39-46, caracterizado pelo fato de que o vírus MVA recombinante exibe uma ou mais das seguintes características:

indução de níveis aumentados de células T efetoras em células tumorais em comparação com células de tumor infectadas com o vírus MVAΔE3L correspondente;

indução de aumento da produção esplênica de células T efetoras em comparação com o vírus MVAΔE3L correspondente; e

redução do volume do tumor em células de tumor em contato com o vírus MVAΔE3L-OX40L recombinante em comparação com as células de tumor em contato com o vírus MVAΔE3L correspondente.

48. Vírus MVAΔE3L-OX40L recombinante, de acordo com a reivindicação 47, caracterizado pelo fato de que as células de tumor compreendem células de melanoma.

49. Composição imunogênica, caracterizada pelo fato de que compreende o vírus MVAΔE3L-OX40L recombinante definido de acordo com qualquer uma das reivindicações 39-48.

50. Composição imunogênica, de acordo com a reivindicação 49, caracterizada pelo fato de que compreende ainda um veículo farmaceuticamente aceitável.

51. Composição imunogênica, de acordo com a reivindicação 49 ou reivindicação 50, caracterizada pelo fato de que compreende ainda um adjuvante farmaceuticamente aceitável.

52. Método para tratar um tumor sólido em um indivíduo em necessidade, o método caracterizado pelo fato de que compreende a administração a um tumor de uma composição compreendendo uma quantidade eficaz do vírus MVAΔE3L-OX40L recombinante, definido de acordo com qualquer uma das reivindicações 39-48, ou a composição imunogênica definida de qualquer uma das reivindicações 49-51.

53. Método, de acordo com a reivindicação 52, caracterizado pelo fato de que o tratamento compreende um ou mais dentre os seguintes: induzir uma resposta imunológica no indivíduo contra o tumor ou aumentar ou promover uma resposta imunológica contínua contra o tumor no indivíduo, reduzir o tamanho do tumor, erradicar o tumor, inibir o crescimento do tumor, inibir o crescimento metastático do tumor, induzir apoptose de células de tumor ou prolongar a sobrevivência do indivíduo.

54. Método, de acordo com a reivindicação 53, caracterizado pelo fato de que induzir, aumentar ou a promover a resposta imunológica compreende um ou mais dentre os seguintes:

níveis aumentados de células T efetoras em células tumorais em comparação com células de tumor infectadas com o vírus MVAΔE3L correspondente; e

aumento da produção esplênica de células T efetoras em comparação com o vírus MVAΔE3L correspondente.

55. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 52-54, caracterizado pelo fato de que a composição é administrada por injeção intratumoral ou intravenosa ou uma combinação simultânea ou sequencial de injeção intratumoral e intravenosa.

56. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 52-55, caracterizado pelo fato de que o tumor é melanoma, cólon, mama, bexiga ou carcinoma da próstata.

57. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 52-56, caracterizado pelo fato de que a composição compreende ainda um ou mais dentre os agentes selecionados a partir de: um ou mais agentes de bloqueio de ponto de verificação imunológico; um ou mais medicamentos anticâncer; fingolimode (FTY720); e qualquer combinação dos mesmos.

58. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 52-56, caracterizado pelo fato de que o método compreende ainda administrar separada, sequencial ou simultaneamente ao indivíduo um ou mais agentes selecionados a partir de: um ou mais agentes de bloqueio de ponto de verificação imunológico; um ou mais medicamentos anticâncer, fingolimode (FTY720); e qualquer combinação dos mesmos.

59. Método, de acordo com a reivindicação 57 ou 58, caracterizado pelo fato de que:

o um ou mais agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico são selecionados a partir do grupo que consiste em anticorpo anti-PD-L1, anticorpo anti-PD-1, anticorpo anti-CTLA-4, ipilimumabe, nivolumabe, pidilizumabe, lambrolizumabe, pembrolizumabe, atezolizumabe, avelumabe, durvalumabe, MPDL3280A, BMS-936559, MEDI-4736, MSB 00107180, LAG-3,

TIM3, B7-H3, B7-H4, TIGIT, AMP-224, MDX-1105, arelumabe, tremelimumabe, IMP321, MGA271, BMS-986016, lirilumabe, urelumabe, PF-05082566, IPH2101, MEDI-6469, CP-870.893, mogamulizumabe, varlilumabe, galiximabe, AMP-514, AUNP 12, Indoximode, NLG-919, INCB024360, CD80, DLBCL ICOS, PDR001 e qualquer combinação dos mesmos; e/ou

o um ou mais medicamentos anticâncer são selecionados a partir do grupo que consiste em um inibidor de Mek (U0126, selumitinibe (AZD6244), PD98059, trametinibe, cobimetinibe), um inibidor de EGFR (lapatinibe (LPN), erlotinibe (ERL)), um inibidor de HER2 (lapatinibe (LPN), Trastuzumabe), um inibidor de Raf (sorafenibe (SFN)), um inibidor de BRAF (dabrafenibe, vemurafenibe), um anticorpo anti-OX40, um anticorpo agonista GITR, um anticorpo anti-CSFR, um inibidor de CSFR, paclitaxel, agonista de TLR9 (CpG) e um inibidor de VEGF (bevacizumabw), e qualquer combinação dos mesmos.

60. Método, de acordo com a reivindicação 59, caracterizado pelo fato de que um ou mais agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico compreendem o anticorpo anti-PD-L1.

61. Método, de acordo com a reivindicação 59, caracterizado pelo fato de que um ou mais agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico compreendem o anticorpo anti-PD-1.

62. Método, de acordo com a reivindicação 59, caracterizado pelo fato de que um ou mais agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico compreendem o anticorpo anti-CTLA-4.

63. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 57-59, caracterizado pelo fato de que a combinação de MVAΔC7L-OX40L com o agente de bloqueio do ponto de verificação imunológico, medicamento anticâncer e/ou fingolimode (FTY720) tem um efeito sinérgico no tratamento do tumor em comparação com a administração de MVAΔC7L-OX40L ou do agente de bloqueio do ponto de verificação imunológico, medicamento anticâncer ou fingolimode (FTY720) sozinho.

64. Método de estimulação de uma resposta imunológica, caracterizado pelo fato de que compreende administrar a um indivíduo de uma quantidade eficaz do vírus, definido de acordo com qualquer uma das reivindicações 39-48, ou a composição imunogênica, definida de acordo com qualquer uma das reivindicações de 49-51.

65. Método, de acordo com qualquer a reivindicação 64, caracterizado pelo fato de que o método compreende ainda administrar separada, sequencial ou simultaneamente ao indivíduo um ou mais agentes selecionados a partir de: um ou mais agentes de bloqueio de ponto de verificação imunológico; um ou mais medicamentos anticâncer, fingolimode (FTY720); e qualquer combinação dos mesmos.

66. Método, de acordo com a reivindicação 65, caracterizado pelo fato de que:

o um ou mais agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico são selecionados a partir do grupo que consiste em anticorpo anti-PD-L1, anticorpo anti-PD-1, anticorpo anti-CTLA-4, ipilimumabe, nivolumabe, pidilizumabe, lambrolizumabe, pembrolizumabe, atezolizumabe, avelumabe, durvalumabe, MPDL3280A, BMS-936559, MEDI-4736, MSB 00107180, LAG-3, TIM3, B7-H3, B7-H4, TIGIT, AMP-224, MDX-1105, arelumabe, tremelimumabe, IMP321, MGA271, BMS-986016, lirilumabe, urelumabe, PF-05082566, IPH2101, MEDI-6469, CP-870.893, mogamulizumabe, varlilumabe, galiximabe, AMP-514, AUNP 12, Indoximode, NLG-919, INCB024360, CD80, DLBCL ICOS, PDR001 e qualquer combinação dos mesmos; e/ou

o um ou mais medicamentos anticâncer são selecionados a partir do grupo que consiste em um inibidor de Mek (U0126, selumitinibe (AZD6244), PD98059, trametinibe, cobimetinibe), um inibidor de EGFR (lapatinibe (LPN), erlotinibe (ERL)), um inibidor de HER2 (lapatinibe (LPN), Trastuzumabe), um inibidor de Raf (sorafenibe (SFN)), um inibidor de BRAF (dabrafenibe, vemurafenibe), um anticorpo anti-OX40, um anticorpo agonista GITR, um

anticorpo anti-CSFR, um inibidor de CSFR, paclitaxel, agonista de TLR9 (CpG) e um inibidor de VEGF (bevacizumabw), e qualquer combinação dos mesmos.

67. Método, de acordo com a reivindicação 66, caracterizado pelo fato de que um ou mais agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico compreendem o anticorpo anti-PD-L1.

68. Método, de acordo com a reivindicação 66, caracterizado pelo fato de que um ou mais agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico compreendem o anticorpo anti-PD-1.

69. Método, de acordo com a reivindicação 66, caracterizado pelo fato de que um ou mais agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico compreendem o anticorpo anti-CTLA-4.

70. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 65-69, caracterizado pelo fato de que a combinação de MVAΔC7L-OX40L com o agente de bloqueio do ponto de verificação imunológico, medicamento anticâncer e/ou fingolimode (FTY720) tem um efeito sinérgico na estimulação de resposta imunológica em comparação com a administração de MVAΔC7L-OX40L ou do agente de bloqueio do ponto de verificação imunológico, medicamento anticâncer ou fingolimode (FTY720) sozinho.

71. Vírus vaccinia Ankara (VACV) recombinante, caracterizado pelo fato de que compreende um gene C7 mutante e uma molécula de ácido nucleico heteróloga que codifica OX40L (VACVΔC7L-OX40L).

72. Vírus VACVΔC7L-OX40L recombinante, de acordo com a reivindicação 71, caracterizado pelo fato de que o vírus compreende ainda um ácido nucleico heterólogo que codifica o ligante de tirosina quinase 3 tipo Fms humano (hFlt3L) (VACVΔC7L-hFlt3L-OX40L).

73. Vírus VACVΔC7L-OX40L recombinante, de acordo com a reivindicação 71 ou reivindicação 72, caracterizado pelo fato de que o vírus compreende ainda um gene da timidina quinase (TK) mutante.

74. Vírus VACVΔC7L-OX40L recombinante, de acordo com a reivindicação 73, caracterizado pelo fato de que o gene de TK mutante

compreende a substituição de pelo menos uma porção do gene por um ou mais cassetes de genes compreendendo uma molécula de ácido nucleico heteróloga.

75. Vírus VACVΔC7L-OX40L recombinante, de acordo com a reivindicação 74, caracterizado pelo fato de que um ou mais cassetes de genes compreendem a molécula de ácido nucleico heteróloga que codifica OX40L.

76. Vírus VACVΔC7L-OX40L recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 71-75, caracterizado pelo fato de que o gene C7 mutante compreende uma inserção de um ou mais cassetes de genes compreendendo uma molécula de ácido nucleico heteróloga.

77. Vírus VACVΔC7L-OX40L recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 71 -75, caracterizado pelo fato de que o gene C7 mutante compreende a substituição de todo ou pelo menos uma porção do gene por um ou mais cassetes de genes compreendendo uma molécula de ácido nucleico heteróloga.

78. Vírus VACVΔC7L-OX40L recombinante, de acordo com a reivindicação 76 ou reivindicação 77, caracterizado pelo fato de que um ou mais cassetes de genes compreendem a molécula de ácido nucleico heteróloga que codifica hFlt3L.

79. Vírus VACVΔC7L-OX40L recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 72-78, caracterizado pelo fato de que o gene C7 mutante compreende a substituição de pelo menos uma porção do gene por um ou mais cassetes de genes compreendendo a molécula de ácido nucleico heteróloga que codifica hFlt3L, e em que o vírus compreende adicionalmente um gene de TK mutante que compreende a substituição de pelo menos uma porção do gene de TK por um ou mais cassetes de genes compreendendo a molécula de ácido nucleico heteróloga que codifica OX40L (VACVΔC7L-hFlt3L-TK(-)-OX40L).

80. Vírus VACVΔC7L-OX40L recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 71-79, caracterizado pelo fato de que o OX40L é expresso a partir de dentro de um gene viral de vaccinia.

81. Vírus VACVΔC7L-OX40L recombinante, de acordo com a reivindicação 80, caracterizado pelo fato de que o OX40L é expresso a partir de dentro de um gene viral selecionado a partir do grupo que consiste no gene da timidina quinase (TK), o gene C7, o gene C11, o gene K3, o gene F1, o gene F2, o gene F4, o gene F6, o gene F8, o gene F9, o gene F11, o gene F14.5, o gene J2, o gene A46, o gene E3L, o gene B18R (WR200), o O gene E5R, o gene K7R, o gene C12L, o gene B8R, o gene B14R, o gene N1L, o gene K1L, o gene C16, o gene M1L, o gene N2L e o gene WR199.

82. Vírus VACVΔC7L-OX40L recombinante, de acordo com a reivindicação 81, caracterizado pelo fato de que o OX40L é expresso a partir de dentro de um gene TK.

83. Vírus VACVΔC7L-OX40L recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 73-80, caracterizado pelo fato de que o OX40L é expresso a partir de dentro de um gene TK e o hFlt3L é expresso de dentro do gene C7.

84. Vírus VACVΔC7L-OX40L recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 71-83, caracterizado pelo fato de que o vírus compreende ainda uma molécula de ácido nucleico heteróloga que codifica um ou mais dentre hIL-2, hIL-12, hIL-15, hIL-15/IL-15Rα, hIL-18, hIL-21, anti-huCTLA-4, anti-huPD-1, anti-huPD-L1, GITRL, 4-1BBL ou CD40L e/ou uma deleção de qualquer um ou mais dentre E3L (ΔE3L), E3LΔ83N, B2R (ΔB2R), B19R (B18R; ΔWR200), E5R, K7R, C12L, IL18BP, B8R, B14R, N1L, C11R, K1L, M1L, N2L ou WR199.

85. Vírus VACVΔC7L-OX40L recombinante, de acordo com a reivindicação 83, caracterizado pelo fato de que o vírus compreende ainda um ácido nucleico heterólogo que codifica hIL-12 e um ácido nucleico heterólogo que codifica anti-huCTLA-4 (VACVΔC7L-anti-huCTLA-4-hFlt3L-OX40L-hIL-12).

86. Vírus VACVΔC7L-OX40L recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 71-85, caracterizado pelo fato de que o vírus VACVΔC7L-OX40L recombinante exibe uma ou mais das seguintes características:

indução de níveis aumentados de células T efetoras em células tumorais em comparação com células de tumor infectadas com o vírus VACVΔC7L correspondente;

indução de aumento da produção esplênica de células T efetoras em comparação com o vírus VACVΔC7L correspondente; e

redução do volume do tumor em células de tumor em contato com o vírus VACVΔC7L-OX40L recombinante em comparação com as células de tumor em contato com o vírus VACVΔC7L correspondente.

87. Vírus VACVΔC7L-OX40L recombinante, de acordo com a reivindicação 86, caracterizado pelo fato de que as células de tumor compreendem células de melanoma.

88. Composição imunogênica, caracterizada pelo fato de que compreende o vírus VACVΔC7L-OX40L recombinante definido de acordo com qualquer uma das reivindicações 71-87.

89. Composição imunogênica, de acordo com a reivindicação 88, caracterizada pelo fato de que compreende ainda um veículo farmaceuticamente aceitável.

90. Composição imunogênica, de acordo com a reivindicação 88 ou reivindicação 89, caracterizada pelo fato de que compreende ainda um adjuvante farmaceuticamente aceitável.

91. Método para tratar um tumor sólido em um indivíduo em necessidade, o método caracterizado pelo fato de que compreende a administração a um tumor de uma composição compreendendo uma quantidade eficaz do vírus VACVΔC7L-OX40L recombinante, definido de acordo com qualquer uma das reivindicações 71-87, ou a composição imunogênica definida de qualquer uma das reivindicações 88-90.

92. Método, de acordo com a reivindicação 91, caracterizado pelo fato de que o tratamento compreende um ou mais dentre os seguintes: induzir uma resposta imunológica no indivíduo contra o tumor ou aumentar ou promover uma resposta imunológica contínua contra o tumor no indivíduo, reduzir o tamanho do tumor, erradicar o tumor, inibir o crescimento do tumor, inibir o crescimento metastático do tumor, induzir apoptose de células de tumor ou prolongar a sobrevivência do indivíduo.

93. Método, de acordo com a reivindicação 92, caracterizado pelo fato de que induzir, aumentar ou a promover a resposta imunológica compreende um ou mais dentre os seguintes:

níveis aumentados de células T efetoras em células tumorais em comparação com células de tumor infectadas com o vírus VACVΔC7L correspondente; e

aumento da produção esplênica de células T efetoras em comparação com o vírus VACVΔC7L correspondente.

94. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 91-93, caracterizado pelo fato de que a composição é administrada por injeção intratumoral ou intravenosa ou uma combinação simultânea ou sequencial de injeção intratumoral e intravenosa.

95. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 91-94, caracterizado pelo fato de que o tumor é melanoma, cólon, mama, bexiga ou carcinoma da próstata.

96. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 91-95, caracterizado pelo fato de que a composição compreende ainda um ou mais dentre os agentes selecionados a partir de: um ou mais agentes de bloqueio de ponto de verificação imunológico; um ou mais medicamentos anticâncer; fingolimode (FTY720); e qualquer combinação dos mesmos.

97. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 91-95, caracterizado pelo fato de que o método compreende ainda administrar separada, sequencial ou simultaneamente ao indivíduo um ou mais agentes

selecionados a partir de: um ou mais agentes de bloqueio de ponto de verificação imunológico; um ou mais medicamentos anticâncer, fingolimode (FTY720); e qualquer combinação dos mesmos.

98. Método, de acordo com a reivindicação 96 ou 97, caracterizado pelo fato de que:

o um ou mais agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico são selecionados a partir do grupo que consiste em anticorpo anti-PD-L1, anticorpo anti-PD-1, anticorpo anti-CTLA-4, ipilimumabe, nivolumabe, pidilizumabe, lambrolizumabe, pembrolizumabe, atezolizumabe, avelumabe, durvalumabe, MPDL3280A, BMS-936559, MEDI-4736, MSB 00107180, LAG-3, TIM3, B7-H3, B7-H4, TIGIT, AMP-224, MDX-1105, arelumabe, tremelimumabe, IMP321, MGA271, BMS-986016, lirilumabe, urelumabe, PF-05082566, IPH2101, MEDI-6469, CP-870.893, mogamulizumabe, varlilumabe, galiximabe, AMP-514, AUNP 12, Indoximode, NLG-919, INCB024360, CD80, DLBCL ICOS, PDR001 e qualquer combinação dos mesmos; e/ou

o um ou mais medicamentos anticâncer são selecionados a partir do grupo que consiste em um inibidor de Mek (U0126, selumitinibe (AZD6244), PD98059, trametinibe, cobimetinibe), um inibidor de EGFR (lapatinibe (LPN), erlotinibe (ERL)), um inibidor de HER2 (lapatinibe (LPN), Trastuzumabe), um inibidor de Raf (sorafenibe (SFN)), um inibidor de BRAF (dabrafenibe, vemurafenibe), um anticorpo anti-OX40, um anticorpo agonista GITR, um anticorpo anti-CSFR, um inibidor de CSFR, paclitaxel, agonista de TLR9 (CpG) e um inibidor de VEGF (bevacizumabe), e qualquer combinação dos mesmos.

99. Método, de acordo com a reivindicação 98, caracterizado pelo fato de que um ou mais agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico compreendem o anticorpo anti-PD-L1.

100. Método, de acordo com a reivindicação 98, caracterizado pelo fato de que um ou mais agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico compreendem o anticorpo anti-PD-1.

101. Método, de acordo com a reivindicação 98, caracterizado pelo fato de que um ou mais agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico compreendem o anticorpo anti-CTLA-4.

102. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 96-101, caracterizado pelo fato de que a combinação de VACVΔC7L-OX40L ou VACVΔC7L-hFlt3L-OX40L com o agente de bloqueio do ponto de verificação imunológico, medicamento anticâncer e/ou fingolimode (FTY720) tem um efeito sinérgico no tratamento do tumor em comparação com a administração de VACVΔC7L-OX40L ou VACVΔC7L-hFlt3L-OX40L ou do agente de bloqueio do ponto de verificação imunológico, medicamento anticâncer ou fingolimode (FTY720) sozinho.

103. Método de estimulação de uma resposta imunológica, caracterizado pelo fato de que compreende administrar a um indivíduo de uma quantidade eficaz do vírus, definido de acordo com qualquer uma das reivindicações 71-87, ou a composição imunogênica, definida de acordo com qualquer uma das reivindicações de 88-90.

104. Método, de acordo com qualquer a reivindicação 103, caracterizado pelo fato de que o método compreende ainda administrar separada, sequencial ou simultaneamente ao indivíduo um ou mais agentes selecionados a partir de: um ou mais agentes de bloqueio de ponto de verificação imunológico; um ou mais medicamentos anticâncer, fingolimode (FTY720); e qualquer combinação dos mesmos.

105. Método, de acordo com a reivindicação 104, caracterizado pelo fato de que:

o um ou mais agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico são selecionados a partir do grupo que consiste em anticorpo anti-PD-L1, anticorpo anti-PD-1, anticorpo anti-CTLA-4, ipilimumabe, nivolumabe, pidilizumabe, lambrolizumabe, pembrolizumabe, atezolizumabe, avelumabe, durvalumabe, MPDL3280A, BMS-936559, MEDI-4736, MSB 00107180, LAG-3, TIM3, B7-H3, B7-H4, TIGIT, AMP-224, MDX-1105, arelumabe, tremelimumabe,

IMP321, MGA271, BMS-986016, lirilumabe, urelumabe, PF-05082566, IPH2101, MEDI-6469, CP-870.893, mogamulizumabe, varlilumabe, galiximabe, AMP-514, AUNP 12, Indoximode, NLG-919, INCB024360, CD80, DLBCL ICOS, PDR001 e qualquer combinação dos mesmos; e/ou

o um ou mais medicamentos anticâncer são selecionados a partir do grupo que consiste em um inibidor de Mek (U0126, selumitinibe (AZD6244), PD98059, trametinibe, cobimetinibe), um inibidor de EGFR (lapatinibe (LPN), erlotinibe (ERL)), um inibidor de HER2 (lapatinibe (LPN), Trastuzumabe), um inibidor de Raf (sorafenibe (SFN)), um inibidor de BRAF (dabrafenibe, vemurafenibe), um anticorpo anti-OX40, um anticorpo agonista GITR, um anticorpo anti-CSFR, um inibidor de CSFR, paclitaxel, agonista de TLR9 (CpG) e um inibidor de VEGF (bevacizumabe), e qualquer combinação dos mesmos.

106. Método, de acordo com a reivindicação 105, caracterizado pelo fato de que um ou mais agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico compreendem o anticorpo anti-PD-L1.

107. Método, de acordo com a reivindicação 105, caracterizado pelo fato de que um ou mais agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico compreendem o anticorpo anti-PD-1.

108. Método, de acordo com a reivindicação 105, caracterizado pelo fato de que um ou mais agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico compreendem o anticorpo anti-CTLA-4.

109. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 103-108, caracterizado pelo fato de que a combinação de VACVΔC7L-OX40L ou VACVΔC7L-hFlt3L-OX40L com o agente de bloqueio do ponto de verificação imunológico, medicamento anticâncer e/ou fingolimode (FTY720) tem um efeito sinérgico na estimulação de resposta imunológica em comparação com a administração de VACVΔC7L-OX40L ou VACVΔC7L-hFlt3L-OX40L ou do agente de bloqueio do ponto de verificação imunológico, medicamento anticâncer ou fingolimode (FTY720) sozinho.

110. Sequência de ácido nucleico do vírus vaccinia Ankara (MVA) modificado recombinante, caracterizado pelo fato de que a sequência de ácido nucleico entre as posições 75.560 e 76.093, ou uma porção da mesma, da SEQ ID NO: 1 é substituída por uma sequência de ácido nucleico heteróloga que compreende uma estrutura de leitura aberta que codifica OX40L e em que o MVA compreende ainda um mutante C7.

111. MVA recombinante, de acordo com a reivindicação 110, caracterizado pelo fato de que a sequência de ácido nucleico entre as posições 18.407 e 18.859, ou uma porção da mesma, de SEQ ID NO: 1 é substituída por uma sequência de ácido nucleico heteróloga compreendendo uma estrutura de leitura aberta que codifica o ligante de tirosina quinase 3 tipo Fms humano (hFlt3L).

112. Sequência de ácido nucleico do vírus vaccinia Ankara (MVA) modificado recombinante, caracterizado pelo fato de que a sequência de ácido nucleico entre as posições 75.798 a 75.868, ou uma porção da mesma, da SEQ ID NO: 1 é substituída por uma sequência de ácido nucleico heteróloga compreendendo uma estrutura de leitura aberta que codifica OX40L ou codifica ligante de tirosina quinase 3 tipo Fms humano (hFlt3L), e em que o MVA compreende ainda um mutante E3.

113. Sequência de ácido nucleico do vírus vaccinia (VACV) recombinante, caracterizado pelo fato de que a sequência de ácido nucleico entre as posições 80.962 e 81.032, ou uma porção da mesma, de SEQ ID NO: 2 é substituída por uma sequência de ácido nucleico heteróloga que compreende uma estrutura de leitura aberta que codifica OX40L e em que o VACV compreende ainda um mutante C7.

114. VACV recombinante, de acordo com a reivindicação 113, caracterizado pelo fato de que a sequência de ácido nucleico entre as posições 15.716 e 16.168, ou uma porção da mesma, de SEQ ID NO: 2 é substituída por uma sequência de ácido nucleico heteróloga compreendendo uma estrutura de

leitura aberta que codifica o ligante de tirosina quinase 3 tipo Fms humano (hFlt3L).

115. Sequência de ácido nucleico que codifica o vírus MVAΔC7L-OX40L recombinante caracterizado pelo fato de que é definido de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-16.

116. Sequência de ácido nucleico que codifica o vírus MVAΔE3L-OX40L recombinante caracterizado pelo fato de que é definido de acordo com qualquer uma das reivindicações 39-48.

117. Sequência de ácido nucleico que codifica o vírus VACVΔC7L-OX40L recombinante caracterizado pelo fato de que é definido de acordo com qualquer uma das reivindicações 71-87.

118. Kit, caracterizado pelo fato de que compreende o vírus MVAΔC7L-OX40L recombinante, definido de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 16, ou a composição imunogênica, definida de acordo com qualquer uma das reivindicações 17 a 19, e as instruções de uso.

119. Kit, caracterizado pelo fato de que compreende o vírus MVAΔE3L-OX40L recombinante, definido de acordo com qualquer uma das reivindicações 39-48, ou a composição imunogênica, definida de acordo com qualquer uma das reivindicações 49-51, e as instruções de uso.

120. Kit, caracterizado pelo fato de que compreende o vírus VACVΔC7L-OX40L recombinante, definido de acordo com qualquer uma das reivindicações 71-87, ou a composição imunogênica, definida de acordo com qualquer uma das reivindicações 88-90, e as instruções de uso.

121. Vírus MVAΔC7L-OX40L recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-16, caracterizado pelo fato de que o gene C7 mutante é pelo menos parcialmente deletado, não é expresso, é expresso em níveis tão baixos que não tem efeito, ou expresso como uma proteína não funcional.

122. Vírus MVAΔC7L-OX40L recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 3-16, caracterizado pelo fato de que o gene

TK mutante é pelo menos parcialmente deletado, não é expresso, é expresso em níveis tão baixos que não tem efeito, ou expresso como uma proteína não funcional.

123. Vírus MVAΔE3L-OX40L recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 39-48, caracterizado pelo fato de que o gene E3 mutante é pelo menos parcialmente deletado, não é expresso, é expresso em níveis tão baixos que não tem efeito, ou expresso como uma proteína não funcional.

124. Vírus MVAΔE3L-OX40L recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 40-48, caracterizado pelo fato de que o gene TK mutante é pelo menos parcialmente deletado, não é expresso, é expresso em níveis tão baixos que não tem efeito, ou expresso como uma proteína não funcional.

125. Vírus VACVΔC7L-OX40L recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 71-87, caracterizado pelo fato de que o gene C7 mutante é pelo menos parcialmente deletado, não é expresso, é expresso em níveis tão baixos que não tem efeito, ou expresso como uma proteína não funcional.

126. Vírus VACVΔC7L-OX40L recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 73-87, caracterizado pelo fato de que o gene TK mutante é pelo menos parcialmente deletado, não é expresso, é expresso em níveis tão baixos que não tem efeito, ou expresso como uma proteína não funcional.

127. Método para tratar um tumor sólido em um indivíduo em necessidade, o método caracterizado pelo fato de que compreende administrar ao indivíduo de um antígeno e uma quantidade terapeuticamente eficaz de um adjuvante compreendendo um vírus vaccinia Ankara (MVA) modificado recombinante compreendendo um gene C7 mutante e um ácido nucleico heterólogo que codifica OX40L (MVAΔC7L-OX40L).

128. Método, de acordo com a reivindicação 127, caracterizado pelo fato de que o vírus MVAΔC7L-OX40L compreende ainda um ácido nucleico heterólogo que codifica o ligante de tirosina quinase 3 tipo Fms humano (hFlt3L) (MVAΔC7L-hFlt3L-OX40L).

129. Método, de acordo com a reivindicação 127 ou reivindicação 128, caracterizado pelo fato de que o vírus compreende ainda um gene da timidina quinase (TK) mutante.

130. Método, de acordo com a reivindicação 129, caracterizado pelo fato de que o gene de TK mutante compreende a substituição de pelo menos uma porção do gene por um ou mais cassetes de genes compreendendo uma molécula de ácido nucleico heteróloga.

131. Método, de acordo com a reivindicação 130, caracterizado pelo fato de que um ou mais cassetes de genes compreendem a molécula de ácido nucleico heteróloga que codifica OX40L.

132. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 127-131, caracterizado pelo fato de que o gene C7 mutante compreende uma inserção de um ou mais cassetes de genes compreendendo uma molécula de ácido nucleico heteróloga.

133. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 127 - 131, caracterizado pelo fato de que o gene C7 mutante compreende a substituição de todo ou pelo menos uma porção do gene por um ou mais cassetes de genes compreendendo um ácido nucleico heterólogo.

134. Método, de acordo com a reivindicação 132 ou 133, caracterizado pelo fato de que um ou mais cassetes de genes compreendem a molécula de ácido nucleico heteróloga que codifica hFlt3L.

135. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 128-134, caracterizado pelo fato de que o gene C7 mutante compreende a substituição de pelo menos uma porção do gene por um ou mais cassetes de genes compreendendo a molécula de ácido nucleico heteróloga que codifica hFlt3L, e em que o vírus compreende adicionalmente um gene de TK mutante

que compreende a substituição de pelo menos uma porção do gene de TK por um ou mais cassetes de genes compreendendo a molécula de ácido nucleico heteróloga que codifica OX40L (MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-OX40L).

136. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 127-135, caracterizado pelo fato de que o OX40L é expresso a partir de dentro de um gene viral de MVA.

137. Método, de acordo com a reivindicação 136, caracterizado pelo fato de que o OX40L é expresso a partir de dentro de um gene viral selecionado a partir do grupo que consiste no gene da timidina quinase (TK), o gene C7, o gene C11, o gene K3, o gene F1, o gene F2, o gene F4, o gene F6, o gene F8, o gene F9, o gene F11, o gene F14.5, o gene J2, o gene A46, o gene E3L, o gene B18R (WR200), o O gene E5R, o gene K7R, o gene C12L, o gene B8R, o gene B14R, o gene N1L, o gene K1L, o gene C16, o gene M1L, o gene N2L e o gene WR199.

138. Método, de acordo com a reivindicação 137, caracterizado pelo fato de que o OX40L é expresso a partir de dentro de um gene TK.

139. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 129-136, caracterizado pelo fato de que o OX40L é expresso a partir de dentro de um gene TK e o hFlt3L é expresso de dentro do gene C7.

140. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 127-139, caracterizado pelo fato de que o vírus compreende ainda uma molécula de ácido nucleico heteróloga que codifica um ou mais dentre hIL-2, hIL-12, hIL-15, hIL-15/IL-15Rα, hIL-18, hIL-21, anti-huCTLA-4, anti-huPD-1, anti-huPD-L1, GITRL, 4-1BBL ou CD40L e/ou uma deleção de qualquer um ou mais dentre E3L (ΔE3L), E3LΔ83N, B2R (ΔB2R), B19R (B18R; ΔWR200), IL18BP, E5R, K7R, C12L, B8R, B14R, N1L, C11R, K1L, M1L, N2L ou WR199.

141. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 127-140, caracterizado pelo fato de que o antígeno é selecionado a partir do grupo que consiste em antígenos de diferenciação de tumor, antígenos de testículo de câncer, neoantígenos, antígenos virais no caso de tumores associados à

infecção por vírus oncogênicos, GPA33, HER2/neu, GD2, MAGE-1, MAGE-3, BAGE, GAGE-1, GAGE-2, MUM-1, CDK4, N-acetilglucosaminiltransferase, p15, gp75, beta-catenina, ErbB2, antígeno de câncer 125 (CA-125), antígeno carcinoembrionário (CEA), RAGE, MART (antígeno de melanoma), MUC-1, MUC-2, MUC-3, MUC-4, MUC-5ac, MUC-16, MUC-17, tirosinase, proteínas relacionadas à tirosinase 1 e 2, Pmel 17 (gp100), sequência de íntron V GnT-V (sequência de íntron V de N-acetilglucoaminiltransferase V), câncer de próstata psm, PRAME (antígeno de melanoma), β-catenina, EBNA (antígeno nuclear do vírus Epstein-Barr) 1-6, p53, kras, proteína de resistência pulmonar (LRP) Bcl-2, antígeno específico da próstata (PSA), Ki-67, CEACAM6, antígeno específico do cólon-p (CSAp), NY-ESO-1, vírus do papiloma humano E6 e E7, e qualquer combinação dos mesmos.

142. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 127-141, caracterizado pelo fato de que a etapa de administrar compreende administrar o antígeno e adjuvante em uma ou mais doses e/ou em que o antígeno e o adjuvante são administrados separadamente, sequencialmente ou simultaneamente.

143. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 127-142, caracterizado pelo fato de que compreende ainda administrar ao indivíduo um agente de bloqueio de ponto de verificação imunológico selecionados a partir do grupo que consiste em anticorpo anti-PD-1, anticorpo anti-PD-L1, anticorpo anti-CTLA-4, ipilimumabe, nivolumabe, pidilizumabe, lambrolizumabe, pembrolizumabe, atezolizumabe, avelumabe, durvalumabe, MPDL3280A, BMS-936559, MEDI-4736, MSB 00107180, LAG-3, TIM3, B7-H3, B7-H4, TIGIT, AMP-224, MDX-1105, arelumabe, tremelimumabe, IMP321, MGA271, BMS-986016, lirilumabe, urelumabe, PF-05082566, IPH2101, MEDI-6469, CP-870.893, mogamulizumabe, varlilumabe, galiximabe, AMP-514, AUNP 12, Indoximode, NLG-919, INCB024360, CD80, DLBCL ICOS, PDR001 e qualquer combinação dos mesmos; e/ou

144. Método, de acordo com a reivindicação 143, caracterizado pelo fato de que o antígeno e o adjuvante são administrados ao indivíduo separadamente, sequencialmente ou simultaneamente com a administração do agente de bloqueio do ponto de verificação imunológico.

145. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 127-144, caracterizado pelo fato de que o tratamento compreende um ou mais dentre os seguintes: induzir uma resposta imunológica no indivíduo contra o tumor ou aumentar ou promover uma resposta imunológica contínua contra o tumor no indivíduo, reduzir o tamanho do tumor, erradicar o tumor, inibir o crescimento do tumor, inibir o crescimento metastático do tumor, induzir apoptose de células de tumor ou prolongar a sobrevivência do indivíduo.

146. Método, de acordo com a reivindicação 145, caracterizado pelo fato de que induzir, aumentar ou a promover a resposta imunológica compreende um ou mais dentre os seguintes:

níveis aumentados de expressão de interferon gama (IFN-γ) em células T no baço, drenagem de nódulos linfáticos e/ou soro em comparação com uma amostra de controle não tratada;

níveis aumentados de células T específicas do antígeno no baço, drenagem dos nódulos linfáticos e/ou soro em comparação com uma amostra de controle não tratada; e

níveis aumentados de imunoglobulina específica do antígeno no soro em comparação com uma amostra de controle não tratada.

147. Método, de acordo com a reivindicação 146, caracterizado pelo fato de que a imunoglobulina específica do antígeno é IgG1 ou IgG2.

148. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 127-147, caracterizado pelo fato de que o antígeno e o adjuvante são formulados para serem administrados por via intratumoral, intramuscular, intradérmica ou subcutânea.

149. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 127-148, caracterizado pelo fato de que o tumor é selecionado do grupo que

consiste em melanoma, câncer colorretal, câncer de mama, câncer de bexiga, câncer de próstata, câncer de pulmão, câncer de pâncreas, câncer de ovário, carcinoma de células escamosas da pele, carcinoma de células de Merkel, câncer gástrico, câncer de fígado e sarcoma.

150. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 127-149, caracterizado pelo fato de que o vírus MVAΔC7L-OX40L é administrado em uma dosagem por administração de cerca de 10^5 a cerca de 10^{10} unidades formadoras de placas (pfu).

151. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 127-150, caracterizado pelo fato de o indivíduo é humano.

152. Composição imunogênica, caracterizada pelo fato de que compreende um antígeno e o adjuvante, definido de acordo com qualquer uma das reivindicações 127-140.

153. Composição imunogênica, de acordo com a reivindicação 152, caracterizada pelo fato de que compreende ainda um veículo farmaceuticamente aceitável.

154. Composição imunogênica, de acordo com a reivindicação 152 ou reivindicação 153,, caracterizado pelo fato de que o antígeno é selecionado a partir do grupo que consiste em antígenos de diferenciação de tumor, antígenos de testículo de câncer, neoantígenos, antígenos virais no caso de tumores associados à infecção por vírus oncogênicos, GPA33, HER2/neu, GD2, MAGE-1, MAGE-3, BAGE, GAGE-1, GAGE-2, MUM-1, CDK4, N-acetilglucosaminiltransferase, p15, gp75, beta-catenina, ErbB2, antígeno de câncer 125 (CA-125), antígeno carcinoembrionário (CEA), RAGE, MART (antígeno de melanoma), MUC-1, MUC-2, MUC-3, MUC-4, MUC-5ac, MUC-16, MUC-17, tirosinase, proteínas relacionadas à tirosinase 1 e 2, Pmel 17 (gp100), sequência de íntron V GnT-V (sequência de íntron V de N-acetilglucoaminiltransferase V), câncer de próstata psm, PRAME (antígeno de melanoma), β-catenina, EBNA (antígeno nuclear do vírus Epstein-Barr) 1-6, p53, kras, proteína de resistência pulmonar (LRP) Bcl-2, antígeno específico da

próstata (PSA), Ki-67, CEACAM6, antígeno específico do cólon-p (CSAp), NY-ESO-1, vírus do papiloma humano E6 e E7, e qualquer combinação dos mesmos.

155. Composição imunogênica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 152-154, caracterizado pelo fato de que compreende ainda um agente de bloqueio de ponto de verificação imunológico selecionados a partir do grupo que consiste em anticorpo anti-PD-1, anticorpo anti-PD-L1, anticorpo anti-CTLA-4, ipilimumabe, nivolumabe, pidilizumabe, lambrolizumabe, pembrolizumabe, atezolizumabe, avelumabe, durvalumabe, MPDL3280A, BMS-936559, MEDI-4736, MSB 00107180, LAG-3, TIM3, B7-H3, B7-H4, TIGIT, AMP-224, MDX-1105, arelumabe, tremelimumabe, IMP321, MGA271, BMS-986016, lirilumabe, urelumabe, PF-05082566, IPH2101, MEDI-6469, CP-870.893, mogamulizumabe, varlilumabe, galiximabe, AMP-514, AUNP 12, Indoximode, NLG-919, INCB024360, CD80, DLBCL ICOS, PDR001 e qualquer combinação dos mesmos; e/ou

156. Kit caracterizado pelo fato de que compreende instruções de uso, um recipiente e uma porção separada de cada um de: (a) um antígeno; e (b) um adjuvante, definido de acordo com qualquer uma das reivindicações 127-140.

157. Kit, de acordo com a reivindicação 152 156, caracterizado pelo fato de que o antígeno é selecionado a partir do grupo que consiste em antígenos de diferenciação de tumor, antígenos de testículo de câncer, neoantígenos, antígenos virais no caso de tumores associados à infecção por vírus oncogênicos, GPA33, HER2/neu, GD2, MAGE-1, MAGE-3, BAGE, GAGE-1, GAGE-2, MUM-1, CDK4, N-acetilglucosaminiltransferase, p15, gp75, beta-catenina, ErbB2, antígeno de câncer 125 (CA-125), antígeno carcinoembrionário (CEA), RAGE, MART (antígeno de melanoma), MUC-1, MUC-2, MUC-3, MUC-4, MUC-5ac, MUC-16, MUC-17, tirosinase, proteínas relacionadas à tirosinase 1 e 2, Pmel 17 (gp100), sequência de íntron V GnT-V (sequência de íntron V de N-acetilglucoaminiltransferase V), câncer de próstata

psm, PRAME (antígeno de melanoma), β-catenina, EBNA (antígeno nuclear do vírus Epstein-Barr) 1-6, p53, kras, proteína de resistência pulmonar (LRP) Bcl-2, antígeno específico da próstata (PSA), Ki-67, CEACAM6, antígeno específico do cólon-p (CSAp), NY-ESO-1, vírus do papiloma humano E6 e E7, e qualquer combinação dos mesmos.

158. Kit de acordo com a reivindicação 156 ou 157, caracterizado pelo fato de que compreende ainda (c) um agente de bloqueio de ponto de verificação imunológico selecionados a partir do grupo que consiste em anticorpo anti-PD-1, anticorpo anti-PD-L1, anticorpo anti-CTLA-4, ipilimumabe, nivolumabe, pidilizumabe, lambrolizumabe, pembrolizumabe, atezolizumabe, avelumabe, durvalumabe, MPDL3280A, BMS-936559, MEDI-4736, MSB 00107180, LAG-3, TIM3, B7-H3, B7-H4, TIGIT, AMP-224, MDX-1105, arelumabe, tremelimumabe, IMP321, MGA271, BMS-986016, lirilumabe, urelumabe, PF-05082566, IPH2101, MEDI-6469, CP-870.893, mogamulizumabe, varlilumabe, galiximabe, AMP-514, AUNP 12, Indoximode, NLG-919, INCB024360, CD80, DLBCL ICOS, PDR001 e qualquer combinação dos mesmos; e/ou

159. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 141-151, caracterizado pelo fato de que o antígeno é um neoantígeno selecionado a partir do grupo que consiste em M27 (REGVELCPGNKYEMRRHGTTHSLVIHD) (SEQ ID NO: 17), M30 (PSKPSFQEFVDWENVSPELNSTDQPFL) (SEQ ID NO: 18), M48 (SHCHWNDLAVIPAGVVHNWDFEPRKVS) (SEQ ID NO: 19), e as combinações dos mesmos.

160. Composição imunogênica, de acordo com a reivindicação 154 ou reivindicação 155, caracterizada pelo fato de que o antígeno é um neoantígeno selecionado a partir do grupo que consiste em M27 (REGVELCPGNKYEMRRHGTTHSLVIHD) (SEQ ID NO: 17), M30 (PSKPSFQEFVDWENVSPELNSTDQPFL) (SEQ ID NO: 18), M48

(SHCHWNDLAVIPAGVVHNWDFEPRKVS) (SEQ ID NO: 19), e as combinações dos mesmos.

161. Kit, de acordo com a reivindicação 157 ou reivindicação 158, caracterizada pelo fato de que o antígeno é um neoantígeno selecionado a partir do grupo que consiste em M27 (REGVELCPGNKYEMRRHGTTHSLVIHD) (SEQ ID NO: 17), M30 (PSKPSFQEFVDWENVSPELNSTDQPFL) (SEQ ID NO: 18), M48 (SHCHWNDLAVIPAGVVHNWDFEPRKVS) (SEQ ID NO: 19), e as combinações dos mesmos.

162. Vírus vaccinia Ankara modificado (MVA), geneticamente modificado caracterizado pelo fato de que compreende um gene E5R mutante (MVAΔE5R).

163. Vírus MVAΔE5R, de acordo com a reivindicação 162, caracterizado pelo fato de que o vírus compreende ainda uma molécula de ácido nucleico heteróloga que codifica um ou mais dentre OX40L, hFlt3L, hIL-2, hIL-12, hIL-15, hIL-15/IL-15Rα, hIL-18, hIL-21, anti-huCTLA-4, anti-huPD-1, anti-huPD-L1, GITRL, 4-1BBL, ou CD40L, e/ou uma deleção de acordo com qualquer um ou mais dentre timidina quinase (TK) C7 (ΔC7L), E3L (ΔE3L), E3LΔ83N, B2R (ΔB2R), B19R (B18R; ΔWR200), IL18BP, K7R, C12L, B8R, B14R, N1L, C11R, K1L, M1L, N2L, ou WR199.

164. Vírus MVAΔE5R, de acordo com a reivindicação 163, caracterizado pelo fato de que o gene de E5R mutante compreende a substituição de pelo menos uma porção do gene por um ou mais cassetes de genes compreendendo uma molécula de ácido nucleico heteróloga.

165. Vírus MVAΔE5R, de acordo com a reivindicação 164, caracterizado pelo fato de que um ou mais cassetes de genes compreendem a molécula de ácido nucleico heteróloga que codifica OX40L (MVAΔE5R-OX40L).

166. Vírus MVAΔE5R-OX40L, de acordo com a reivindicação 165, caracterizado pelo fato de que um ou mais cassetes de genes compreende

ainda uma molécula de ácido nucleico heterólogo que codifica o ligante de tirosina quinase 3 tipo Fms humano (hFlt3L) (MVAΔE5R-OX40L-hFlt3L).

167. Vírus MVAΔE5R-OX40L-hFlt3L, de acordo com a reivindicação 166, caracterizado pelo fato de que o vírus compreende ainda um gene C11R mutante (MVAΔE5R-OX40L-hFlt3L-ΔC11R).

168. Vírus, de acordo com a reivindicação 167, caracterizado pelo fato de que o gene C11R mutante compreende uma inserção de um ou mais cassetes de genes compreendendo uma molécula de ácido nucleico heteróloga.

169. Vírus, de acordo com a reivindicação 168, caracterizado pelo fato de que o gene de C11R mutante compreende a substituição de pelo menos uma porção do gene por um ou mais cassetes de genes compreendendo uma molécula de ácido nucleico heteróloga.

170. MVAΔE5R-OX40L-hFlt3L, de acordo com qualquer uma das reivindicações 166-169, caracterizado pelo fato de que o vírus compreende ainda um gene WR199 mutante (MVAΔE5R-OX40L-hFlt3L-ΔWR199).

171. Vírus, de acordo com a reivindicação 170, caracterizado pelo fato de que o gene WR199 mutante compreende uma inserção de um ou mais cassetes de genes compreendendo uma molécula de ácido nucleico heteróloga.

172. Vírus, de acordo com a reivindicação 170, caracterizado pelo fato de que o gene de WR199 mutante compreende a substituição de pelo menos uma porção do gene por um ou mais cassetes de genes compreendendo uma molécula de ácido nucleico heteróloga.

173. Vírus MVAΔE5R, de acordo com a reivindicação 164, caracterizado pelo fato de que um ou mais cassetes de genes compreende uma molécula de ácido nucleico heterólogo que codifica o ligante de tirosina quinase 3 tipo Fms humano (hFlt3L) (MVAΔE5R-hFlt3L).

174. Vírus MVAΔE5R, de acordo com a qualquer uma das reivindicações 163-173, caracterizado pelo fato de que o ácido nucleico

heterólogo é expresso a partir de dentro de um gene viral selecionado a partir do grupo que consiste no gene da timidina quinase (TK), o gene C7, o gene C11, o gene K3, o gene F1, o gene F2, o gene F4, o gene F6, o gene F8, o gene F9, o gene F11, o gene F14.5, o gene J2, o gene A46, o gene E3L, o gene B18R (WR200), o O gene E5R, o gene K7R, o gene C12L, o gene B8R, o gene B14R, o gene N1L, o gene K1L, o gene C16, o gene M1L, o gene N2L e o gene WR199.

175. Vírus MVAΔE5R, de acordo com a qualquer uma das reivindicações 162 -174, caracterizado pelo fato de que o vírus compreende ainda um gene da timidina quinase (TK) mutante.

176. Vírus MVAΔE5R, de acordo com a reivindicação 175, caracterizado pelo fato de que o gene de TK mutante compreende a substituição de pelo menos uma porção do gene por um ou mais cassetes de genes compreendendo uma molécula de ácido nucleico heteróloga.

177. Vírus MVAΔE5R, de acordo com a qualquer uma das reivindicações 162 -176, caracterizado pelo fato de que o vírus compreende ainda um gene C7 mutante.

178. Vírus, de acordo com a reivindicação 177, caracterizado pelo fato de que o gene C7 mutante compreende uma inserção de um ou mais cassetes de genes compreendendo uma molécula de ácido nucleico heteróloga.

179. Vírus, de acordo com a reivindicação 178, caracterizado pelo fato de que o gene de C7 mutante compreende a substituição de pelo menos uma porção do gene por um ou mais cassetes de genes compreendendo uma molécula de ácido nucleico heteróloga.

180. Vírus MVAΔE5R, de acordo com qualquer uma das reivindicações 162-176, caracterizado pelo fato de que o vírus compreende ainda um gene E3L mutante (ΔE3L).

181. Vírus, de acordo com a reivindicação 180, caracterizado pelo fato de que o gene E3L mutante compreende uma inserção de um ou mais

cassetes de genes compreendendo uma molécula de ácido nucleico heteróloga.

182. Vírus, de acordo com a reivindicação 181, caracterizado pelo fato de que o gene de E3L mutante compreende a substituição de pelo menos uma porção do gene por um ou mais cassetes de genes compreendendo uma molécula de ácido nucleico heteróloga.

183. Vírus, de acordo com a reivindicação 181 ou reivindicação 182, caracterizado pelo fato de que um ou mais cassetes de genes compreendem a molécula de ácido nucleico heteróloga que codifica OX40L.

184. Vírus, de acordo com a reivindicação 183, caracterizado pelo fato de que um ou mais cassetes de genes compreende ainda uma molécula de ácido nucleico heterólogo que codifica o ligante de tirosina quinase 3 tipo Fms humano (hFlt3L).

185. Vírus, de acordo com a reivindicação 181 ou reivindicação 182, caracterizado pelo fato de que um ou mais cassetes de genes compreende uma de ácido nucleico heterólogo que codifica o ligante de tirosina quinase 3 tipo Fms humano (hFlt3L).

186. Composição imunogênica, caracterizada pelo fato de que compreende o vírus MVAΔE5R como definido em qualquer uma das reivindicações 162-185.

187. Composição imunogênica, de acordo com a reivindicação 186, caracterizada pelo fato de que compreende ainda um veículo farmaceuticamente aceitável.

188. Composição imunogênica, de acordo com a reivindicação 186 ou reivindicação 187, caracterizada pelo fato de que compreende ainda um adjuvante farmaceuticamente aceitável.

189. Método para tratar um tumor sólido em um indivíduo em necessidade, o método caracterizado pelo fato de que compreende a administração a um tumor de uma composição compreendendo uma quantidade eficaz do vírus MVAΔE5R, definido de acordo com qualquer uma

das reivindicações 162-1785, ou a composição imunogênica definida de qualquer uma das reivindicações 186-188.

190. Método, de acordo com a reivindicação 189, caracterizado pelo fato de que o tratamento compreende um ou mais dentre os seguintes: induzir uma resposta imunológica no indivíduo contra o tumor ou aumentar ou promover uma resposta imunológica contínua contra o tumor no indivíduo, reduzir o tamanho do tumor, erradicar o tumor, inibir o crescimento do tumor, inibir o crescimento metastático do tumor, induzir apoptose de células de tumor ou prolongar a sobrevivência do indivíduo.

191. Método, de acordo com a reivindicação 189 ou reivindicação 190, caracterizado pelo fato de que a composição é administrada por injeção intratumoral ou intravenosa ou uma combinação simultânea ou sequencial de injeção intratumoral e intravenosa.

192. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 189-191, caracterizado pelo fato de que o tumor é melanoma, cólon, mama, bexiga, carcinoma da próstata ou doença de Paget extramamária (EMPD).

193. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 177-192, caracterizado pelo fato de que a composição compreende ainda um ou mais dentre os agentes selecionados a partir de: um ou mais agentes de bloqueio de ponto de verificação imunológico; um ou mais medicamentos anticâncer; fingolimode (FTY720); e qualquer combinação dos mesmos.

194. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 177-192, caracterizado pelo fato de que o método compreende ainda administrar separada, sequencial ou simultaneamente ao indivíduo um ou mais agentes selecionados a partir de: um ou mais agentes de bloqueio de ponto de verificação imunológico; um ou mais medicamentos anticâncer, fingolimode (FTY720); e qualquer combinação dos mesmos.

195. Método, de acordo com a reivindicação 193 ou 194, caracterizado pelo fato de que:

o um ou mais agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico são selecionados a partir do grupo que consiste em anticorpo anti-PD-L1, anticorpo anti-PD-1, anticorpo anti-CTLA-4, ipilimumabe, nivolumabe, pidilizumabe, lambrolizumabe, pembrolizumabe, atezolizumabe, avelumabe, durvalumabe, MPDL3280A, BMS-936559, MEDI-4736, MSB 00107180, LAG-3, TIM3, B7-H3, B7-H4, TIGIT, AMP-224, MDX-1105, arelumabe, tremelimumabe, IMP321, MGA271, BMS-986016, lirilumabe, urelumabe, PF-05082566, IPH2101, MEDI-6469, CP-870.893, mogamulizumabe, varlilumabe, galiximabe, AMP-514, AUNP 12, Indoximode, NLG-919, INCB024360, CD80, DLBCL ICOS, PDR001 e qualquer combinação dos mesmos; e/ou

o um ou mais medicamentos anticâncer são selecionados a partir do grupo que consiste em um inibidor de Mek (U0126, selumitinibe (AZD6244), PD98059, trametinibe, cobimetinibe), um inibidor de EGFR (lapatinibe (LPN), erlotinibe (ERL)), um inibidor de HER2 (lapatinibe (LPN), Trastuzumabe), um inibidor de Raf (sorafenibe (SFN)), um inibidor de BRAF (dabrafenibe, vemurafenibe), um anticorpo anti-OX40, um anticorpo agonista GITR, um anticorpo anti-CSFR, um inibidor de CSFR, paclitaxel, agonista de TLR9 (CpG) e um inibidor de VEGF (bevacizumabe), e qualquer combinação dos mesmos.

196. Método, de acordo com a reivindicação 195, caracterizado pelo fato de que um ou mais agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico compreendem o anticorpo anti-PD-L1.

197. Método, de acordo com a reivindicação 195, caracterizado pelo fato de que um ou mais agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico compreendem o anticorpo anti-PD-1.

198. Método, de acordo com a reivindicação 195, caracterizado pelo fato de que um ou mais agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico compreendem o anticorpo anti-CTLA-4.

199. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 193-195, caracterizado pelo fato de que a combinação de vírus MVAΔE5R com o agente de bloqueio do ponto de verificação imunológico, medicamento

anticâncer e/ou fingolimode (FTY720) tem um efeito sinérgico no tratamento do tumor em comparação com a administração de vírus MVAΔE5R ou do agente de bloqueio do ponto de verificação imunológico, medicamento anticâncer ou fingolimode (FTY720) sozinho.

200. Método de estimulação de uma resposta imunológica, caracterizado pelo fato de que compreende administrar a um indivíduo de uma quantidade eficaz do vírus, definido de acordo com qualquer uma das reivindicações 162-185, ou a composição imunogênica, definida de acordo com qualquer uma das reivindicações de 186-188.

201. Método, de acordo com qualquer a reivindicação 200, caracterizado pelo fato de que o método compreende ainda administrar separada, sequencial ou simultaneamente ao indivíduo um ou mais agentes selecionados a partir de: um ou mais agentes de bloqueio de ponto de verificação imunológico; um ou mais medicamentos anticâncer, fingolimode (FTY720); e qualquer combinação dos mesmos.

202. Método, de acordo com a reivindicação 201, caracterizado pelo fato de que:

o um ou mais agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico são selecionados a partir do grupo que consiste em anticorpo anti-PD-L1, anticorpo anti-PD-1, anticorpo anti-CTLA-4, ipilimumabe, nivolumabe, pidilizumabe, lambrolizumabe, pembrolizumabe, atezolizumabe, avelumabe, durvalumabe, MPDL3280A, BMS-936559, MEDI-4736, MSB 00107180, LAG-3, TIM3, B7-H3, B7-H4, TIGIT, AMP-224, MDX-1105, arelumabe, tremelimumabe, IMP321, MGA271, BMS-986016, lirilumabe, urelumabe, PF-05082566, IPH2101, MEDI-6469, CP-870.893, mogamulizumabe, varlilumabe, galiximabe, AMP-514, AUNP 12, Indoximode, NLG-919, INCB024360, CD80, DLBCL ICOS, PDR001 e qualquer combinação dos mesmos; e/ou

o um ou mais medicamentos anticâncer são selecionados a partir do grupo que consiste em um inibidor de Mek (U0126, selumitinibe (AZD6244), PD98059, trametinibe, cobimetinibe), um inibidor de EGFR (lapatinibe (LPN),

erlotinibe (ERL)), um inibidor de HER2 (lapatinibe (LPN), Trastuzumabe), um inibidor de Raf (sorafenibe (SFN)), um inibidor de BRAF (dabrafenibe, vemurafenibe), um anticorpo anti-OX40, um anticorpo agonista GITR, um anticorpo anti-CSFR, um inibidor de CSFR, paclitaxel, agonista de TLR9 (CpG) e um inibidor de VEGF (bevacizumabe), e qualquer combinação dos mesmos.

203. Método, de acordo com a reivindicação 202, caracterizado pelo fato de que um ou mais agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico compreendem o anticorpo anti-PD-L1.

204. Método, de acordo com a reivindicação 202, caracterizado pelo fato de que um ou mais agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico compreendem o anticorpo anti-PD-1.

205. Método, de acordo com a reivindicação 202, caracterizado pelo fato de que um ou mais agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico compreendem o anticorpo anti-CTLA-4.

206. Método, de acordo com a reivindicação 201 ou reivindicação 202, caracterizado pelo fato de que a combinação do vírus MVAΔE5R com o agente de bloqueio do ponto de verificação imunológico, medicamento anticâncer e/ou fingolimode (FTY720) tem um efeito sinérgico na estimulação de uma resposta imunológica em comparação com a administração do vírus MVAΔE5R ou do agente de bloqueio do ponto de verificação imunológico, medicamento anticâncer ou fingolimode (FTY720) sozinho.

207. Ácido nucleico caracterizado pelo fato de que codifica o vírus MVAΔE5R como definido em qualquer uma das reivindicações 162-185.

208. Kit, caracterizado pelo fato de que compreende um vírus MVAΔE5R, definido de acordo com qualquer uma das reivindicações 162-185 e instruções de uso.

209. Vírus vaccinia (VACV) caracterizado pelo fato de ser geneticamente modificado para compreender um gene E5R mutante (VACVΔE5R).

210. Vírus VACVΔE5R, de acordo com a reivindicação 209, caracterizado pelo fato de que o vírus compreende ainda uma molécula de ácido nucleico heteróloga que codifica um ou mais dentre OX40L, hFlt3L, hIL-2, hIL-12, hIL-15, hIL-15/IL-15Rα, hIL-18, hIL-21, anti-huCTLA-4, anti-huPD-1, anti-huPD-L1, GITRL, 4-1BBL, ou CD40L, e/ou uma deleção de acordo com qualquer um ou mais dentre timidina quinase (TK) C7 (ΔC7L), E3L (ΔE3L), E3LΔ83N, B2R (ΔB2R), B19R (B18R; ΔWR200), IL18BP, K7R, C12L, B8R, B14R, N1L, C11R, K1L, M1L, N2L, ou WR199.

211. Vírus VACVΔE5R, de acordo com a reivindicação 210, caracterizado pelo fato de que o gene de E5R mutante compreende a substituição de pelo menos uma porção do gene por um ou mais cassetes de genes compreendendo uma molécula de ácido nucleico heteróloga.

212. Vírus VACVΔE5R, de acordo com a reivindicação 211, caracterizado pelo fato de que um ou mais cassetes de genes compreendem a molécula de ácido nucleico heteróloga que codifica OX40L (VACVΔE5R-OX40L).

213. Vírus VACVΔE5R-OX40L, de acordo com a reivindicação 212, caracterizado pelo fato de que um ou mais cassetes de genes compreende ainda uma molécula de ácido nucleico heterólogo que codifica o ligante de tirosina quinase 3 tipo Fms humano (hFlt3L) (VACVΔE5R-OX40L-hFlt3L).

214. Vírus VACVΔE5R, de acordo com a reivindicação 211, caracterizado pelo fato de que um ou mais cassetes de genes compreende uma molécula de ácido nucleico heterólogo que codifica o ligante de tirosina quinase 3 tipo Fms humano (hFlt3L) (VACVΔE5R-hFlt3L).

215. Vírus VACVΔE5R, de acordo com a qualquer uma das reivindicações 210-214, caracterizado pelo fato de que o ácido nucleico heterólogo é expresso a partir de dentro de um gene viral selecionado a partir do grupo que consiste no gene da timidina quinase (TK), o gene C7, o gene C11, o gene K3, o gene F1, o gene F2, o gene F4, o gene F6, o gene F8, o gene F9, o gene F11, o gene F14.5, o gene J2, o gene A46, o gene E3L, o

gene B18R (WR200), o O gene E5R, o gene K7R, o gene C12L, o gene B8R, o gene B14R, o gene N1L, o gene K1L, o gene C16, o gene M1L, o gene N2L e o gene WR199.

216. Vírus VACVΔE5R, de acordo com a qualquer uma das reivindicações 209 -215, caracterizado pelo fato de que o vírus compreende ainda um gene da timidina quinase (TK) mutante.

217. Vírus VACVΔE5R, de acordo com a reivindicação 216, caracterizado pelo fato de que o gene de TK mutante compreende a substituição de pelo menos uma porção do gene por um ou mais cassetes de genes compreendendo uma molécula de ácido nucleico heteróloga.

218. Vírus VACVΔE5R, de acordo com a qualquer uma das reivindicações 209 -215, caracterizado pelo fato de que o vírus compreende ainda um gene C7 mutante.

219. Vírus, de acordo com a reivindicação 218, caracterizado pelo fato de que o gene C7 mutante compreende uma inserção de um ou mais cassetes de genes compreendendo uma molécula de ácido nucleico heteróloga.

220. Vírus, de acordo com a reivindicação 219, caracterizado pelo fato de que o gene de C7 mutante compreende a substituição de pelo menos uma porção do gene por um ou mais cassetes de genes compreendendo uma molécula de ácido nucleico heteróloga.

221. Composição imunogênica, caracterizada pelo fato de que compreende o vírus VACVΔE5R como definido em qualquer uma das reivindicações 209-220.

222. Composição imunogênica, de acordo com a reivindicação 221, caracterizada pelo fato de que compreende ainda um veículo farmaceuticamente aceitável.

223. Composição imunogênica, de acordo com a reivindicação 221 ou reivindicação 222, caracterizada pelo fato de que compreende ainda um adjuvante farmaceuticamente aceitável.

224. Método para tratar um tumor sólido em um indivíduo em necessidade, o método caracterizado pelo fato de que compreende a administração a um tumor de uma composição compreendendo uma quantidade eficaz do vírus VACVΔE5R, definido de acordo com qualquer uma das reivindicações 209-220, ou a composição imunogênica definida de qualquer uma das reivindicações 221-223.

225. Método, de acordo com a reivindicação 224, caracterizado pelo fato de que o tratamento compreende um ou mais dentre os seguintes: induzir uma resposta imunológica no indivíduo contra o tumor ou aumentar ou promover uma resposta imunológica contínua contra o tumor no indivíduo, reduzir o tamanho do tumor, erradicar o tumor, inibir o crescimento do tumor, inibir o crescimento metastático do tumor, induzir apoptose de células de tumor ou prolongar a sobrevivência do indivíduo.

226. Método, de acordo com a reivindicação 224 ou reivindicação 225, caracterizado pelo fato de que a composição é administrada por injeção intratumoral ou intravenosa ou uma combinação simultânea ou sequencial de injeção intratumoral e intravenosa.

227. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 224-225, caracterizado pelo fato de que o tumor é melanoma, cólon, mama, bexiga ou carcinoma da próstata.

228. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 224-227, caracterizado pelo fato de que a composição compreende ainda um ou mais dentre os agentes selecionados a partir de: um ou mais agentes de bloqueio de ponto de verificação imunológico; um ou mais medicamentos anticâncer; fingolimode (FTY720); e qualquer combinação dos mesmos.

229. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 224-227, caracterizado pelo fato de que o método compreende ainda administrar separada, sequencial ou simultaneamente ao indivíduo um ou mais agentes selecionados a partir de: um ou mais agentes de bloqueio de ponto de

verificação imunológico; um ou mais medicamentos anticâncer, fingolimode (FTY720); e qualquer combinação dos mesmos.

230. Método, de acordo com a reivindicação 228 ou 229, caracterizado pelo fato de que:

o um ou mais agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico são selecionados a partir do grupo que consiste em anticorpo anti-PD-L1, anticorpo anti-PD-1, anticorpo anti-CTLA-4, ipilimumabe, nivolumabe, pidilizumabe, lambrolizumabe, pembrolizumabe, atezolizumabe, avelumabe, durvalumabe, MPDL3280A, BMS-936559, MEDI-4736, MSB 00107180, LAG-3, TIM3, B7-H3, B7-H4, TIGIT, AMP-224, MDX-1105, arelumabe, tremelimumabe, IMP321, MGA271, BMS-986016, lirilumabe, urelumabe, PF-05082566, IPH2101, MEDI-6469, CP-870.893, mogamulizumabe, varlilumabe, galiximabe, AMP-514, AUNP 12, Indoximode, NLG-919, INCB024360, CD80, DLBCL ICOS, PDR001 e qualquer combinação dos mesmos; e/ou

o um ou mais medicamentos anticâncer são selecionados a partir do grupo que consiste em um inibidor de Mek (U0126, selumitinibe (AZD6244), PD98059, trametinibe, cobimetinibe), um inibidor de EGFR (lapatinibe (LPN), erlotinibe (ERL)), um inibidor de HER2 (lapatinibe (LPN), Trastuzumabe), um inibidor de Raf (sorafenibe (SFN)), um inibidor de BRAF (dabrafenibe, vemurafenibe), um anticorpo anti-OX40, um anticorpo agonista GITR, um anticorpo anti-CSFR, um inibidor de CSFR, paclitaxel, agonista de TLR9 (CpG) e um inibidor de VEGF (bevacizumabe), e qualquer combinação dos mesmos.

231. Método, de acordo com a reivindicação 230, caracterizado pelo fato de que um ou mais agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico compreendem o anticorpo anti-PD-L1.

232. Método, de acordo com a reivindicação 230, caracterizado pelo fato de que um ou mais agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico compreendem o anticorpo anti-PD-1.

233. Método, de acordo com a reivindicação 230, caracterizado pelo fato de que um ou mais agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico compreendem o anticorpo anti-CTLA-4.

234. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 228-230, caracterizado pelo fato de que a combinação de vírus VACVΔE5R com o agente de bloqueio do ponto de verificação imunológico, medicamento anticâncer e/ou fingolimode (FTY720) tem um efeito sinérgico no tratamento do tumor em comparação com a administração de vírus VACVΔE5R ou do agente de bloqueio do ponto de verificação imunológico, medicamento anticâncer ou fingolimode (FTY720) sozinho.

235. Método de estimulação de uma resposta imunológica, caracterizado pelo fato de que compreende administrar a um indivíduo de uma quantidade eficaz do vírus, definido de acordo com qualquer uma das reivindicações 209-220, ou a composição imunogênica, definida de acordo com qualquer uma das reivindicações de 221-223.

236. Método, de acordo com qualquer a reivindicação 235, caracterizado pelo fato de que o método compreende ainda administrar separada, sequencial ou simultaneamente ao indivíduo um ou mais agentes selecionados a partir de: um ou mais agentes de bloqueio de ponto de verificação imunológico; um ou mais medicamentos anticâncer, fingolimode (FTY720); e qualquer combinação dos mesmos.

237. Método, de acordo com a reivindicação 236, caracterizado pelo fato de que:

o um ou mais agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico são selecionados a partir do grupo que consiste em anticorpo anti-PD-L1, anticorpo anti-PD-1, anticorpo anti-CTLA-4, ipilimumabe, nivolumabe, pidilizumabe, lambrolizumabe, pembrolizumabe, atezolizumabe, avelumabe, durvalumabe, MPDL3280A, BMS-936559, MEDI-4736, MSB 00107180, LAG-3, TIM3, B7-H3, B7-H4, TIGIT, AMP-224, MDX-1105, arelumabe, tremelimumabe, IMP321, MGA271, BMS-986016, lirilumabe, urelumabe, PF-05082566,

IPH2101, MEDI-6469, CP-870.893, mogamulizumabe, varlilumabe, galiximabe, AMP-514, AUNP 12, Indoximode, NLG-919, INCB024360, CD80, DLBCL ICOS, PDR001 e qualquer combinação dos mesmos; e/ou

o um ou mais medicamentos anticâncer são selecionados a partir do grupo que consiste em um inibidor de Mek (U0126, selumitinibe (AZD6244), PD98059, trametinibe, cobimetinibe), um inibidor de EGFR (lapatinibe (LPN), erlotinibe (ERL)), um inibidor de HER2 (lapatinibe (LPN), Trastuzumabe), um inibidor de Raf (sorafenibe (SFN)), um inibidor de BRAF (dabrafenibe, vemurafenibe), um anticorpo anti-OX40, um anticorpo agonista GITR, um anticorpo anti-CSFR, um inibidor de CSFR, paclitaxel, agonista de TLR9 (CpG) e um inibidor de VEGF (bevacizumabe), e qualquer combinação dos mesmos.

238. Método, de acordo com a reivindicação 237, caracterizado pelo fato de que um ou mais agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico compreendem o anticorpo anti-PD-L1.

239. Método, de acordo com a reivindicação 237, caracterizado pelo fato de que um ou mais agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico compreendem o anticorpo anti-PD-1.

240. Método, de acordo com a reivindicação 237, caracterizado pelo fato de que um ou mais agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico compreendem o anticorpo anti-CTLA-4.

241. Método, de acordo com a reivindicação 236 ou reivindicação 237, caracterizado pelo fato de que a combinação do vírus VACVΔE5R com o agente de bloqueio do ponto de verificação imunológico, medicamento anticâncer e/ou fingolimode (FTY720) tem um efeito sinérgico na estimulação de uma resposta imunológica em comparação com a administração do vírus VACVΔE5R ou do agente de bloqueio do ponto de verificação imunológico, medicamento anticâncer ou fingolimode (FTY720) sozinho.

242. Ácido nucleico caracterizado pelo fato de que codifica o vírus VACVΔE5R como definido em qualquer uma das reivindicações 209-220.

243. Kit, caracterizado pelo fato de que compreende um vírus VACVΔE5R, definido de acordo com qualquer uma das reivindicações 209-220 e instruções de uso.

244. Vírus myxoma (MYXV) caracterizado pelo fato de ser geneticamente modificado para compreender um gene M31R mutante (MYXVΔM31R).

245. Vírus MYXVΔM31R, de acordo com a reivindicação 244, caracterizado pelo fato de que o vírus compreende ainda uma molécula de ácido nucleico heteróloga que codifica um ou mais dentre OX40L, hFlt3L, hIL-2, hIL-12, hIL-15, hIL-15/IL-15Rα, hIL-18, hIL-21, anti-huCTLA-4, anti-huPD-1, anti-huPD-L1, GITRL, 4-1BBL, ou CD40L, e/ou uma deleção de acordo com qualquer um ou mais dentre myxoma ortólogo de vírus vaccinia timidina quinase (TK) C7 (ΔC7L), E3L (ΔE3L), E3LΔ83N, B2R (ΔB2R), B19R (B18R; ΔWR200), IL18BP, K7R, C12L, B8R, B14R, N1L, C11R, K1L, M1L, N2L, ou WR199.

246. Vírus MYXVΔM31R, de acordo com a reivindicação 244 ou reivindicação 245, caracterizado pelo fato de que o gene de M31R mutante compreende a substituição de pelo menos uma porção do gene por um ou mais cassetes de genes compreendendo uma molécula de ácido nucleico heteróloga.

247. Vírus MYXVΔM31R, de acordo com a reivindicação 246, caracterizado pelo fato de que um ou mais cassetes de genes compreendem a molécula de ácido nucleico heteróloga que codifica OX40L (MYXVΔM31R-OX40L).

248. Vírus MYXVΔM31R-OX40L, de acordo com a reivindicação 247, caracterizado pelo fato de que um ou mais cassetes de genes compreende ainda uma molécula de ácido nucleico heterólogo que codifica o ligante de tirosina quinase 3 tipo Fms humano (hFlt3L) (MYXVΔM31R-OX40L-hFlt3L).

249. Vírus MYXVΔM31R, de acordo com a reivindicação 246, caracterizado pelo fato de que um ou mais cassetes de genes compreende uma molécula de ácido nucleico heterólogo que codifica o ligante de tirosina quinase 3 tipo Fms humano (hFlt3L) (MYXVΔM31R-hFlt3L).

250. Vírus MYXVΔM31R, de acordo com a qualquer uma das reivindicações 245-249, caracterizado pelo fato de que o ácido nucleico heterólogo é expresso a partir de dentro de um myxoma ortólogo de gene viral vaccinia selecionado a partir do grupo que consiste no gene da timidina quinase (TK), o gene C7, o gene C11, o gene K3, o gene F1, o gene F2, o gene F4, o gene F6, o gene F8, o gene F9, o gene F11, o gene F14.5, o gene J2, o gene A46, o gene E3L, o gene B18R (WR200), o O gene E5R, o gene K7R, o gene C12L, o gene B8R, o gene B14R, o gene N1L, o gene K1L, o gene C16, o gene M1L, o gene N2L e o gene WR199.

251. Vírus MYXVΔM31R, de acordo com a qualquer uma das reivindicações 244 -250, caracterizado pelo fato de que o vírus compreende ainda um myxoma ortólogo mutante do gene da timidina quinase (TK) mutante.

252. Vírus MYXVΔM31R, de acordo com a reivindicação 251, caracterizado pelo fato de que o gene de TK mutante compreende a substituição de pelo menos uma porção do gene por um ou mais cassetes de genes compreendendo uma molécula de ácido nucleico heteróloga.

253. Vírus MYXVΔM31R, de acordo com a qualquer uma das reivindicações 244 -252, caracterizado pelo fato de que o vírus compreende ainda um myxoma ortólogo mutante do gene C7 mutante de vírus vaccinia.

254. Vírus, de acordo com a reivindicação 253, caracterizado pelo fato de que o gene C7 mutante compreende uma inserção de um ou mais cassetes de genes compreendendo uma molécula de ácido nucleico heteróloga.

255. Vírus, de acordo com a reivindicação 254, caracterizado pelo fato de que o gene de C7 mutante compreende a substituição de pelo menos

uma porção do gene por um ou mais cassetes de genes compreendendo uma molécula de ácido nucleico heteróloga.

256. Composição imunogênica, caracterizada pelo fato de que compreende o vírus MYXVΔM31R como definido em qualquer uma das reivindicações 244-255.

257. Composição imunogênica, de acordo com a reivindicação 256, caracterizada pelo fato de que compreende ainda um veículo farmaceuticamente aceitável.

258. Composição imunogênica, de acordo com a reivindicação 256 ou reivindicação 257, caracterizada pelo fato de que compreende ainda um adjuvante farmaceuticamente aceitável.

259. Método para tratar um tumor sólido em um indivíduo em necessidade, o método caracterizado pelo fato de que compreende a administração a um tumor de uma composição compreendendo uma quantidade eficaz do vírus MYXVΔM31R, definido de acordo com qualquer uma das reivindicações 244-255, ou a composição imunogênica definida de qualquer uma das reivindicações 256-258.

260. Método, de acordo com a reivindicação 259, caracterizado pelo fato de que o tratamento compreende um ou mais dentre os seguintes: induzir uma resposta imunológica no indivíduo contra o tumor ou aumentar ou promover uma resposta imunológica contínua contra o tumor no indivíduo, reduzir o tamanho do tumor, erradicar o tumor, inibir o crescimento do tumor, inibir o crescimento metastático do tumor, induzir apoptose de células de tumor ou prolongar a sobrevivência do indivíduo.

261. Método, de acordo com a reivindicação 259 ou reivindicação 260, caracterizado pelo fato de que a composição é administrada por injeção intratumoral ou intravenosa ou uma combinação simultânea ou sequencial de injeção intratumoral e intravenosa.

262. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 259-261, caracterizado pelo fato de que o tumor é melanoma, cólon, mama, bexiga ou carcinoma da próstata.

263. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 259-262, caracterizado pelo fato de que a composição compreende ainda um ou mais dentre os agentes selecionados a partir de: um ou mais agentes de bloqueio de ponto de verificação imunológico; um ou mais medicamentos anticâncer; fingolimode (FTY720); e qualquer combinação dos mesmos.

264. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 259-262, caracterizado pelo fato de que o método compreende ainda administrar separada, sequencial ou simultaneamente ao indivíduo um ou mais agentes selecionados a partir de: um ou mais agentes de bloqueio de ponto de verificação imunológico; um ou mais medicamentos anticâncer, fingolimode (FTY720); e qualquer combinação dos mesmos.

265. Método, de acordo com a reivindicação 263 ou 264, caracterizado pelo fato de que:

o um ou mais agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico são selecionados a partir do grupo que consiste em anticorpo anti-PD-L1, anticorpo anti-PD-1, anticorpo anti-CTLA-4, ipilimumabe, nivolumabe, pidilizumabe, lambrolizumabe, pembrolizumabe, atezolizumabe, avelumabe, durvalumabe, MPDL3280A, BMS-936559, MEDI-4736, MSB 00107180, LAG-3, TIM3, B7-H3, B7-H4, TIGIT, AMP-224, MDX-1105, arelumabe, tremelimumabe, IMP321, MGA271, BMS-986016, lirilumabe, urelumabe, PF-05082566, IPH2101, MEDI-6469, CP-870.893, mogamulizumabe, varlilumabe, galiximabe, AMP-514, AUNP 12, Indoximode, NLG-919, INCB024360, CD80, DLBCL ICOS, PDR001 e qualquer combinação dos mesmos; e/ou

o um ou mais medicamentos anticâncer são selecionados a partir do grupo que consiste em um inibidor de Mek (U0126, selumitinibe (AZD6244), PD98059, trametinibe, cobimetinibe), um inibidor de EGFR (lapatinibe (LPN), erlotinibe (ERL)), um inibidor de HER2 (lapatinibe (LPN), Trastuzumabe), um

inibidor de Raf (sorafenibe (SFN)), um inibidor de BRAF (dabrafenibe, vemurafenibe), um anticorpo anti-OX40, um anticorpo agonista GITR, um anticorpo anti-CSFR, um inibidor de CSFR, paclitaxel, agonista de TLR9 (CpG) e um inibidor de VEGF (bevacizumabe), e qualquer combinação dos mesmos.

266. Método, de acordo com a reivindicação 265, caracterizado pelo fato de que um ou mais agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico compreendem o anticorpo anti-PD-L1.

267. Método, de acordo com a reivindicação 265, caracterizado pelo fato de que um ou mais agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico compreendem o anticorpo anti-PD-1.

268. Método, de acordo com a reivindicação 265, caracterizado pelo fato de que um ou mais agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico compreendem o anticorpo anti-CTLA-4.

269. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 263-265, caracterizado pelo fato de que a combinação de vírus MYXVΔM31R com o agente de bloqueio do ponto de verificação imunológico, medicamento anticâncer e/ou fingolimode (FTY720) tem um efeito sinérgico no tratamento do tumor em comparação com a administração de vírus MYXVΔM31R ou do agente de bloqueio do ponto de verificação imunológico, medicamento anticâncer ou fingolimode (FTY720) sozinho.

270. Método de estimulação de uma resposta imunológica, caracterizado pelo fato de que compreende administrar a um indivíduo de uma quantidade eficaz do vírus, definido de acordo com qualquer uma das reivindicações 244-255, ou a composição imunogênica, definida de acordo com qualquer uma das reivindicações de 256-258.

271. Método, de acordo com qualquer a reivindicação 270, caracterizado pelo fato de que o método compreende ainda administrar separada, sequencial ou simultaneamente ao indivíduo um ou mais agentes selecionados a partir de: um ou mais agentes de bloqueio de ponto de

verificação imunológico; um ou mais medicamentos anticâncer, fingolimode (FTY720); e qualquer combinação dos mesmos.

272. Método, de acordo com a reivindicação 271, caracterizado pelo fato de que:

o um ou mais agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico são selecionados a partir do grupo que consiste em anticorpo anti-PD-L1, anticorpo anti-PD-1, anticorpo anti-CTLA-4, ipilimumabe, nivolumabe, pidilizumabe, lambrolizumabe, pembrolizumabe, atezolizumabe, avelumabe, durvalumabe, MPDL3280A, BMS-936559, MEDI-4736, MSB 00107180, LAG-3, TIM3, B7-H3, B7-H4, TIGIT, AMP-224, MDX-1105, arelumabe, tremelimumabe, IMP321, MGA271, BMS-986016, lirilumabe, urelumabe, PF-05082566, IPH2101, MEDI-6469, CP-870.893, mogamulizumabe, varlilumabe, galiximabe, AMP-514, AUNP 12, Indoximode, NLG-919, INCB024360, CD80, DLBCL ICOS, PDR001 e qualquer combinação dos mesmos; e/ou

o um ou mais medicamentos anticâncer são selecionados a partir do grupo que consiste em um inibidor de Mek (U0126, selumitinibe (AZD6244), PD98059, trametinibe, cobimetinibe), um inibidor de EGFR (lapatinibe (LPN), erlotinibe (ERL)), um inibidor de HER2 (lapatinibe (LPN), Trastuzumabe), um inibidor de Raf (sorafenibe (SFN)), um inibidor de BRAF (dabrafenibe, vemurafenibe), um anticorpo anti-OX40, um anticorpo agonista GITR, um anticorpo anti-CSFR, um inibidor de CSFR, paclitaxel, agonista de TLR9 (CpG) e um inibidor de VEGF (bevacizumabe), e qualquer combinação dos mesmos.

273. Método, de acordo com a reivindicação 272, caracterizado pelo fato de que um ou mais agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico compreendem o anticorpo anti-PD-L1.

274. Método, de acordo com a reivindicação 272, caracterizado pelo fato de que um ou mais agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico compreendem o anticorpo anti-PD-1.

275. Método, de acordo com a reivindicação 272, caracterizado pelo fato de que um ou mais agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico compreendem o anticorpo anti-CTLA-4.

276. Método, de acordo com a reivindicação 271 ou reivindicação 272, caracterizado pelo fato de que a combinação do vírus MYXVΔM31R com o agente de bloqueio do ponto de verificação imunológico, medicamento anticâncer e/ou fingolimode (FTY720) tem um efeito sinérgico na estimulação de uma resposta imunológica em comparação com a administração do vírus MYXVΔM31R ou do agente de bloqueio do ponto de verificação imunológico, medicamento anticâncer ou fingolimode (FTY720) sozinho.

277. Ácido nucleico caracterizado pelo fato de que codifica o vírus MYXVΔM31R como definido em qualquer uma das reivindicações 244-255.

278. Kit, caracterizado pelo fato de que compreende um vírus MYXVΔM31R, definido de acordo com qualquer uma das reivindicações 244-255 e instruções de uso.

279. Vírus vaccinia (VACV) caracterizado pelo fato de ser geneticamente modificado para compreender um gene B2R mutante (VACVΔB2R).

280. Vírus VACVΔB2R, de acordo com a reivindicação 279, caracterizado pelo fato de que o vírus compreende ainda uma molécula de ácido nucleico heteróloga que codifica um ou mais dentre OX40L, hFlt3L, hIL-2, hIL-12, hIL-15, hIL-15/IL-15Rα, hIL-18, hIL-21, anti-huCTLA-4, anti-huPD-1, anti-huPD-L1, GITRL, 4-1BBL, ou CD40L, e/ou uma deleção de acordo com qualquer um ou mais dentre timidina quinase (TK), C7 (ΔC7L), E3L (ΔE3L), E3LΔ83N, B19R (B18R; ΔWR200), IL18BP, K7R, C12L, B8R, B14R, N1L, C11R, K1L, M1L, N2L, ou WR199.

281. Vírus VACVΔB2R de acordo com a reivindicação 280, caracterizado pelo fato de que o vírus é selecionado a partir de um ou mais dentre VACVΔE3L83NΔB2R, VACVΔE5RΔB2R, VACVΔE3L83NΔE5RΔB2R, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-hIL-12-ΔB2R.

282. Vírus VACVΔB2R, de acordo com a reivindicação 281, caracterizado pelo fato de que o gene de B2R mutante compreende a substituição de pelo menos uma porção do gene por um ou mais cassetes de genes compreendendo uma molécula de ácido nucleico heteróloga.

283. Vírus VACVΔB2R, de acordo com a reivindicação 282, caracterizado pelo fato de que um ou mais cassetes de genes compreendem a molécula de ácido nucleico heteróloga que codifica OX40L (VACVΔB2R-OX40L).

284. Vírus VACVΔB2R-OX40L, de acordo com a reivindicação 282 ou reivindicação 283, caracterizado pelo fato de que um ou mais cassetes de genes compreende ainda uma molécula de ácido nucleico heterólogo que codifica o ligante de tirosina quinase 3 tipo Fms humano (hFlt3L) (VACVΔB2R-OX40L-hFlt3L).

285. Vírus VACVΔB2R, de acordo com a reivindicação 282, caracterizado pelo fato de que um ou mais cassetes de genes compreende uma molécula de ácido nucleico heterólogo que codifica o ligante de tirosina quinase 3 tipo Fms humano (hFlt3L) (VACVΔB2R-hFlt3L).

286. Vírus VACVΔB2R, de acordo com a qualquer uma das reivindicações 280-285, caracterizado pelo fato de que o ácido nucleico heterólogo é expresso a partir de dentro de um gene viral selecionado a partir do grupo que consiste no gene da timidina quinase (TK), o gene C7, o gene C11, o gene K3, o gene F1, o gene F2, o gene F4, o gene F6, o gene F8, o gene F9, o gene F11, o gene F14.5, o gene J2, o gene A46, o gene E3L, o gene B18R (WR200), o O gene E5R, o gene K7R, o gene C12L, o gene B8R, o gene B14R, o gene N1L, o gene K1L, o gene C16, o gene M1L, o gene N2L e o gene WR199.

287. Composição imunogênica, caracterizada pelo fato de que compreende o vírus VACVΔB2R como definido em qualquer uma das reivindicações 279-286.

288. Composição imunogênica, de acordo com a reivindicação 287, caracterizada pelo fato de que compreende ainda um veículo farmaceuticamente aceitável.

289. Composição imunogênica, de acordo com a reivindicação 287 ou reivindicação 288, caracterizada pelo fato de que compreende ainda um adjuvante farmaceuticamente aceitável.

290. Método para tratar um tumor sólido em um indivíduo em necessidade, o método caracterizado pelo fato de que compreende a administração a um tumor de uma composição compreendendo uma quantidade eficaz do vírus VACVΔB2R, definido de acordo com qualquer uma das reivindicações 279-286, ou a composição imunogênica definida de qualquer uma das reivindicações 287-289.

291. Método, de acordo com a reivindicação 290, caracterizado pelo fato de que o tratamento compreende um ou mais dentre os seguintes: induzir uma resposta imunológica no indivíduo contra o tumor ou aumentar ou promover uma resposta imunológica contínua contra o tumor no indivíduo, reduzir o tamanho do tumor, erradicar o tumor, inibir o crescimento do tumor, inibir o crescimento metastático do tumor, induzir apoptose de células de tumor ou prolongar a sobrevivência do indivíduo.

292. Método, de acordo com a reivindicação 290 ou reivindicação 291, caracterizado pelo fato de que a composição é administrada por injeção intratumoral ou intravenosa ou uma combinação simultânea ou sequencial de injeção intratumoral e intravenosa.

293. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 290-292, caracterizado pelo fato de que o tumor é melanoma, cólon, mama, bexiga ou carcinoma da próstata.

294. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 290-293, caracterizado pelo fato de que a composição compreende ainda um ou mais dentre os agentes selecionados a partir de: um ou mais agentes de

bloqueio de ponto de verificação imunológico; um ou mais medicamentos anticâncer; fingolimode (FTY720); e qualquer combinação dos mesmos.

295. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 290-293, caracterizado pelo fato de que o método compreende ainda administrar separada, sequencial ou simultaneamente ao indivíduo um ou mais agentes selecionados a partir de: um ou mais agentes de bloqueio de ponto de verificação imunológico; um ou mais medicamentos anticâncer, fingolimode (FTY720); e qualquer combinação dos mesmos.

296. Método, de acordo com a reivindicação 294 ou 295, caracterizado pelo fato de que:

o um ou mais agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico são selecionados a partir do grupo que consiste em anticorpo anti-PD-L1, anticorpo anti-PD-1, anticorpo anti-CTLA-4, ipilimumabe, nivolumabe, pidilizumabe, lambrolizumabe, pembrolizumabe, atezolizumabe, avelumabe, durvalumabe, MPDL3280A, BMS-936559, MEDI-4736, MSB 00107180, LAG-3, TIM3, B7-H3, B7-H4, TIGIT, AMP-224, MDX-1105, arelumabe, tremelimumabe, IMP321, MGA271, BMS-986016, lirilumabe, urelumabe, PF-05082566, IPH2101, MEDI-6469, CP-870.893, mogamulizumabe, varlilumabe, galiximabe, AMP-514, AUNP 12, Indoximode, NLG-919, INCB024360, CD80, DLBCL ICOS, PDR001 e qualquer combinação dos mesmos; e/ou

o um ou mais medicamentos anticâncer são selecionados a partir do grupo que consiste em um inibidor de Mek (U0126, selumitinibe (AZD6244), PD98059, trametinibe, cobimetinibe), um inibidor de EGFR (lapatinibe (LPN), erlotinibe (ERL)), um inibidor de HER2 (lapatinibe (LPN), Trastuzumabe), um inibidor de Raf (sorafenibe (SFN)), um inibidor de BRAF (dabrafenibe, vemurafenibe), um anticorpo anti-OX40, um anticorpo agonista GITR, um anticorpo anti-CSFR, um inibidor de CSFR, paclitaxel, agonista de TLR9 (CpG) e um inibidor de VEGF (bevacizumabe), e qualquer combinação dos mesmos.

297. Método, de acordo com a reivindicação 296, caracterizado pelo fato de que um ou mais agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico compreendem o anticorpo anti-PD-L1.

298. Método, de acordo com a reivindicação 296, caracterizado pelo fato de que um ou mais agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico compreendem o anticorpo anti-PD-1.

299. Método, de acordo com a reivindicação 296, caracterizado pelo fato de que um ou mais agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico compreendem o anticorpo anti-CTLA-4.

300. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 294-296, caracterizado pelo fato de que a combinação de vírus VACVΔB2R com o agente de bloqueio do ponto de verificação imunológico, medicamento anticâncer e/ou fingolimode (FTY720) tem um efeito sinérgico no tratamento do tumor em comparação com a administração de vírus VACVΔE5R ou do agente de bloqueio do ponto de verificação imunológico, medicamento anticâncer ou fingolimode (FTY720) sozinho.

301. Método de estimulação de uma resposta imunológica, caracterizado pelo fato de que compreende administrar a um indivíduo de uma quantidade eficaz do vírus, definido de acordo com qualquer uma das reivindicações 279-286, ou a composição imunogênica, definida de acordo com qualquer uma das reivindicações de 287-289.

302. Método, de acordo com qualquer a reivindicação 301, caracterizado pelo fato de que o método compreende ainda administrar separada, sequencial ou simultaneamente ao indivíduo um ou mais agentes selecionados a partir de: um ou mais agentes de bloqueio de ponto de verificação imunológico; um ou mais medicamentos anticâncer, fingolimode (FTY720); e qualquer combinação dos mesmos.

303. Método, de acordo com a reivindicação 302, caracterizado pelo fato de que:

o um ou mais agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico são selecionados a partir do grupo que consiste em anticorpo anti-PD-L1, anticorpo anti-PD-1, anticorpo anti-CTLA-4, ipilimumabe, nivolumabe, pidilizumabe, lambrolizumabe, pembrolizumabe, atezolizumabe, avelumabe, durvalumabe, MPDL3280A, BMS-936559, MEDI-4736, MSB 00107180, LAG-3, TIM3, B7-H3, B7-H4, TIGIT, AMP-224, MDX-1105, arelumabe, tremelimumabe, IMP321, MGA271, BMS-986016, lirilumabe, urelumabe, PF-05082566, IPH2101, MEDI-6469, CP-870.893, mogamulizumabe, varlilumabe, galiximabe, AMP-514, AUNP 12, Indoximode, NLG-919, INCB024360, CD80, DLBCL ICOS, PDR001 e qualquer combinação dos mesmos; e/ou

o um ou mais medicamentos anticâncer são selecionados a partir do grupo que consiste em um inibidor de Mek (U0126, selumitinibe (AZD6244), PD98059, trametinibe, cobimetinibe), um inibidor de EGFR (lapatinibe (LPN), erlotinibe (ERL)), um inibidor de HER2 (lapatinibe (LPN), Trastuzumabe), um inibidor de Raf (sorafenibe (SFN)), um inibidor de BRAF (dabrafenibe, vemurafenibe), um anticorpo anti-OX40, um anticorpo agonista GITR, um anticorpo anti-CSFR, um inibidor de CSFR, paclitaxel, agonista de TLR9 (CpG) e um inibidor de VEGF (bevacizumabe), e qualquer combinação dos mesmos.

304. Método, de acordo com a reivindicação 303, caracterizado pelo fato de que um ou mais agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico compreendem o anticorpo anti-PD-L1.

305. Método, de acordo com a reivindicação 303, caracterizado pelo fato de que um ou mais agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico compreendem o anticorpo anti-PD-1.

306. Método, de acordo com a reivindicação 303, caracterizado pelo fato de que um ou mais agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico compreendem o anticorpo anti-CTLA-4.

307. Método, de acordo com a reivindicação 302 ou reivindicação 303, caracterizado pelo fato de que a combinação do vírus VACVΔB2R com o agente de bloqueio do ponto de verificação imunológico, medicamento

anticâncer e/ou fingolimode (FTY720) tem um efeito sinérgico na estimulação de uma resposta imunológica em comparação com a administração do vírus VACVΔB2R ou do agente de bloqueio do ponto de verificação imunológico, medicamento anticâncer ou fingolimode (FTY720) sozinho.

308. Ácido nucleico caracterizado pelo fato de que codifica o vírus VACVΔB2R como definido em qualquer uma das reivindicações 279-286.

309. Kit, caracterizado pelo fato de que compreende um vírus VACVΔB2R, definido de acordo com qualquer uma das reivindicações 279-286 e instruções de uso.

310. Vírus mixoma (MYXV) caracterizado pelo fato de ser geneticamente modificado para compreender um ou mais mutantes selecionados a partir de (i) um gene M63R mutante (MYXVΔM63R); (ii) um gene M64R mutante (MYXVΔM64R); e (iii) um gene M62R mutante (MYXVΔM62R).

311. Vírus MYXV, de acordo com a reivindicação 310, caracterizado pelo fato de que o vírus compreende ainda uma molécula de ácido nucleico heteróloga que codifica um ou mais dentre OX40L, hFlt3L, hIL-2, hIL-12, hIL-15, hIL-15/IL-15Rα, hIL-18, hIL-21, anti-huCTLA-4, anti-huPD-1, anti-huPD-L1, GITRL, 4-1BBL, ou CD40L, e/ou uma deleção de acordo com qualquer um ou mais dentre myxoma ortólogo de vírus vaccinia timidina quinase (TK) C7 (ΔC7L), E3L (ΔE3L), E3LΔ83N, B2R (ΔB2R), B19R (B18R; ΔWR200), IL18BP, K7R, C12L, B8R, B14R, N1L, C11R, K1L, M1L, N2L, ou WR199.

312. Vírus MYXV, de acordo com a reivindicação 310 ou reivindicação 311, caracterizado pelo fato de que o gene de M63R mutante, gene M64R e/ou gene M62R compreende a substituição de pelo menos uma porção do gene por um ou mais cassetes de genes compreendendo uma molécula de ácido nucleico heteróloga.

313. Vírus MYXV, de acordo com a reivindicação 311 ou reivindicação 312, caracterizado pelo fato de que o ácido nucleico heterólogo é expresso a partir de dentro de um myxoma ortólogo de gene viral vaccinia

selecionado a partir do grupo que consiste no gene da timidina quinase (TK), o gene C7, o gene C11, o gene K3, o gene F1, o gene F2, o gene F4, o gene F6, o gene F8, o gene F9, o gene F11, o gene F14.5, o gene J2, o gene A46, o gene E3L, o gene B2R, o gene B18R (WR200), o gene E5R, o gene K7R, o gene C12L, o gene B8R, o gene B14R, o gene N1L, o gene K1L, o gene C16, o gene M1L, o gene N2L e o gene WR199.

314. Composição imunogênica, caracterizada pelo fato de que compreende o vírus MYXV como definido em qualquer uma das reivindicações 310-313.

315. Composição imunogênica, de acordo com a reivindicação 314, caracterizada pelo fato de que compreende ainda um veículo farmaceuticamente aceitável.

316. Composição imunogênica, de acordo com a reivindicação 314 ou reivindicação 315, caracterizada pelo fato de que compreende ainda um adjuvante farmaceuticamente aceitável.

317. Método para tratar um tumor sólido em um indivíduo em necessidade, o método caracterizado pelo fato de que compreende a administração a um tumor de uma composição compreendendo uma quantidade eficaz do vírus MYXV, definido de acordo com qualquer uma das reivindicações 310-313, ou a composição imunogênica definida de qualquer uma das reivindicações 314-316.

318. Método, de acordo com a reivindicação 317, caracterizado pelo fato de que o tratamento compreende um ou mais dentre os seguintes: induzir uma resposta imunológica no indivíduo contra o tumor ou aumentar ou promover uma resposta imunológica contínua contra o tumor no indivíduo, reduzir o tamanho do tumor, erradicar o tumor, inibir o crescimento do tumor, inibir o crescimento metastático do tumor, induzir apoptose de células de tumor ou prolongar a sobrevivência do indivíduo.

319. Método, de acordo com a reivindicação 317 ou reivindicação 318, caracterizado pelo fato de que a composição é administrada por injeção

intratumoral ou intravenosa ou uma combinação simultânea ou sequencial de injeção intratumoral e intravenosa.

320. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 317-319, caracterizado pelo fato de que o tumor é melanoma, cólon, mama, bexiga ou carcinoma da próstata.

321. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 317-320, caracterizado pelo fato de que a composição compreende ainda um ou mais dentre os agentes selecionados a partir de: um ou mais agentes de bloqueio de ponto de verificação imunológico; um ou mais medicamentos anticâncer; fingolimode (FTY720); e qualquer combinação dos mesmos.

322. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 317-321, caracterizado pelo fato de que o método compreende ainda administrar separada, sequencial ou simultaneamente ao indivíduo um ou mais agentes selecionados a partir de: um ou mais agentes de bloqueio de ponto de verificação imunológico; um ou mais medicamentos anticâncer, fingolimode (FTY720); e qualquer combinação dos mesmos.

323. Método, de acordo com a reivindicação 321 ou 322, caracterizado pelo fato de que:

o um ou mais agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico são selecionados a partir do grupo que consiste em anticorpo anti-PD-L1, anticorpo anti-PD-1, anticorpo anti-CTLA-4, ipilimumabe, nivolumabe, pidilizumabe, lambrolizumabe, pembrolizumabe, atezolizumabe, avelumabe, durvalumabe, MPDL3280A, BMS-936559, MEDI-4736, MSB 00107180, LAG-3, TIM3, B7-H3, B7-H4, TIGIT, AMP-224, MDX-1105, arelumabe, tremelimumabe, IMP321, MGA271, BMS-986016, lirilumabe, urelumabe, PF-05082566, IPH2101, MEDI-6469, CP-870.893, mogamulizumabe, varlilumabe, galiximabe, AMP-514, AUNP 12, Indoximode, NLG-919, INCB024360, CD80, DLBCL ICOS, PDR001 e qualquer combinação dos mesmos; e/ou

o um ou mais medicamentos anticâncer são selecionados a partir do grupo que consiste em um inibidor de Mek (U0126, selumitinibe (AZD6244),

PD98059, trametinibe, cobimetinibe), um inibidor de EGFR (lapatinibe (LPN), erlotinibe (ERL)), um inibidor de HER2 (lapatinibe (LPN), Trastuzumabe), um inibidor de Raf (sorafenibe (SFN)), um inibidor de BRAF (dabrafenibe, vemurafenibe), um anticorpo anti-OX40, um anticorpo agonista GITR, um anticorpo anti-CSFR, um inibidor de CSFR, paclitaxel, agonista de TLR9 (CpG) e um inibidor de VEGF (bevacizumabe), e qualquer combinação dos mesmos.

324. Método, de acordo com a reivindicação 323, caracterizado pelo fato de que um ou mais agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico compreendem o anticorpo anti-PD-L1.

325. Método, de acordo com a reivindicação 323, caracterizado pelo fato de que um ou mais agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico compreendem o anticorpo anti-PD-1.

326. Método, de acordo com a reivindicação 323, caracterizado pelo fato de que um ou mais agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico compreendem o anticorpo anti-CTLA-4.

327. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 321-323, caracterizado pelo fato de que a combinação de vírus MYXVΔM62R, MYXVΔM63R, e/ou MYXVΔM64R com o agente de bloqueio do ponto de verificação imunológico, medicamento anticâncer e/ou fingolimode (FTY720) tem um efeito sinérgico no tratamento do tumor em comparação com a administração de vírus MYXVΔM62R, MYXVΔM63R, e/ou MYXVΔM64R ou do agente de bloqueio do ponto de verificação imunológico, medicamento anticâncer ou fingolimode (FTY720) sozinho.

328. Método de estimulação de uma resposta imunológica, caracterizado pelo fato de que compreende administrar a um indivíduo de uma quantidade eficaz do vírus, definido de acordo com qualquer uma das reivindicações 310-313, ou a composição imunogênica, definida de acordo com qualquer uma das reivindicações de 314-316.

329. Método, de acordo com qualquer a reivindicação 328, caracterizado pelo fato de que o método compreende ainda administrar

separada, sequencial ou simultaneamente ao indivíduo um ou mais agentes selecionados a partir de: um ou mais agentes de bloqueio de ponto de verificação imunológico; um ou mais medicamentos anticâncer, fingolimode (FTY720); e qualquer combinação dos mesmos.

330. Método, de acordo com a reivindicação 329, caracterizado pelo fato de que:

o um ou mais agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico são selecionados a partir do grupo que consiste em anticorpo anti-PD-L1, anticorpo anti-PD-1, anticorpo anti-CTLA-4, ipilimumabe, nivolumabe, pidilizumabe, lambrolizumabe, pembrolizumabe, atezolizumabe, avelumabe, durvalumabe, MPDL3280A, BMS-936559, MEDI-4736, MSB 00107180, LAG-3, TIM3, B7-H3, B7-H4, TIGIT, AMP-224, MDX-1105, arelumabe, tremelimumabe, IMP321, MGA271, BMS-986016, lirilumabe, urelumabe, PF-05082566, IPH2101, MEDI-6469, CP-870.893, mogamulizumabe, varlilumabe, galiximabe, AMP-514, AUNP 12, Indoximode, NLG-919, INCB024360, CD80, DLBCL ICOS, PDR001 e qualquer combinação dos mesmos; e/ou

o um ou mais medicamentos anticâncer são selecionados a partir do grupo que consiste em um inibidor de Mek (U0126, selumitinibe (AZD6244), PD98059, trametinibe, cobimetinibe), um inibidor de EGFR (lapatinibe (LPN), erlotinibe (ERL)), um inibidor de HER2 (lapatinibe (LPN), Trastuzumabe), um inibidor de Raf (sorafenibe (SFN)), um inibidor de BRAF (dabrafenibe, vemurafenibe), um anticorpo anti-OX40, um anticorpo agonista GITR, um anticorpo anti-CSFR, um inibidor de CSFR, paclitaxel, agonista de TLR9 (CpG) e um inibidor de VEGF (bevacizumabe), e qualquer combinação dos mesmos.

331. Método, de acordo com a reivindicação 330, caracterizado pelo fato de que um ou mais agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico compreendem o anticorpo anti-PD-L1.

332. Método, de acordo com a reivindicação 330, caracterizado pelo fato de que um ou mais agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico compreendem o anticorpo anti-PD-1.

333. Método, de acordo com a reivindicação 330, caracterizado pelo fato de que um ou mais agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico compreendem o anticorpo anti-CTLA-4.

334. Método, de acordo com a reivindicação 329 ou reivindicação 330, caracterizado pelo fato de que a combinação do vírus MYXV com o agente de bloqueio do ponto de verificação imunológico, medicamento anticâncer e/ou fingolimode (FTY720) tem um efeito sinérgico na estimulação de uma resposta imunológica em comparação com a administração do vírus MYXV ou do agente de bloqueio do ponto de verificação imunológico, medicamento anticâncer ou fingolimode (FTY720) sozinho.

335. Ácido nucleico caracterizado pelo fato de que codifica o vírus MYXV como definido em qualquer uma das reivindicações 310-313.

336. Kit, caracterizado pelo fato de que compreende um vírus MYXV, definido de acordo com qualquer uma das reivindicações 310-313 e instruções de uso.

337. Vírus MVAΔE5R, de acordo com qualquer uma das reivindicações 180-185, caracterizado pelo fato de que o vírus compreende ainda uma molécula de ácido nucleico heteróloga que codifica hIL-12.

338. Vírus MVAΔE5R, de acordo com a reivindicação 337, caracterizado pelo fato de que o vírus compreende MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40LΔWR199-hIL-12.

339. Vírus MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40LΔWR199-hIL-12, de acordo com a reivindicação 338, caracterizado pelo fato de que o vírus compreende ainda um gene C11R mutante (MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40LΔWR199-hIL-12ΔC11R).

340. Vírus MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40LΔWR199-hIL-12, de acordo com a reivindicação 339, caracterizado pelo fato de que o vírus compreende ainda uma molécula de ácido nucleico que codifica hIL-15/IL-15Rα.

341. Vírus VACVΔE5R-OX40L-hFlt3L, de acordo com a reivindicação 213, caracterizado pelo fato de que o vírus compreende ainda um mutante ΔE3L83N, um mutante timidina quinase (ΔTK), um mutante B2R (ΔB2R), um mutante WR199 (ΔWR199) e um mutante WR200) (ΔSR200) e compreendendo uma molécula de ácido nucleico que codifica anti-CTLA-4 e uma molécula de ácido nucleico que codifica IL-12 (VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200).

342. Vírus VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200, de acordo com a reivindicação 341, caracterizado pelo fato de que compreende ainda uma molécula de ácido nucleico que codifica hIL-15/IL-15Rα (VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200- hIL-15/IL-15Rα).

343. Vírus VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200, de acordo com a reivindicação 341, caracterizado pelo fato de que compreende ainda um gene C11R mutante (ΔC11R) (VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200ΔC11R).

344. Vírus VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200ΔC11R, de acordo com a reivindicação 343, caracterizado pelo fato de que compreende uma molécula de ácido nucleico que codifica hIL-15/IL-15Rα (VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200- hIL-15/IL-15Rα ΔC11R).

345. Vírus MYXV, de acordo com a reivindicação 310 ou reivindicação 311, caracterizado pelo fato de que o vírus é geneticamente modificado para compreender um gene M62R mutante (ΔM62R), um gene M63R mutante (ΔM63R) e um gene M64R mutante (ΔM64R) (MYXVΔM62RΔM63RΔM64R).

346. Poxvírus recombinante caracterizado por ser selecionado a partir do grupo que consiste em: MVAΔE3L-OX40L, MVAΔC7L-OX40L, MVAΔC7L-hFlt3L-OX40L, MVAΔC7LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-

OX40L, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-OX40L-ΔC11R, VACVΔC7L- OX40L, VACVΔC7L-hFlt3L-OX40L, VACVΔE5R, VACV-TK--anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L, VACVΔB2R, VACVE3LΔ83NΔB2R, VACVΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83NΔE5RΔB2R, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12-ΔB2R, MYXVΔM31R, MYXVΔM31R-hFlt3L-OX40L, MYXVΔM63R, MYXVΔM64R, MVAΔWR199, MVAΔE5R-hFlt3L-OX40L- ΔWR199, MVA∆E3L∆E5R-hFlt3L-mOX40L∆WR199-hIL-12, MVA∆E3L∆E5R-hFlt3L-mOX40L∆WR199-hIL-12∆C11R, MVA∆E3L∆E5R-hFlt3L-mO1940 12∆C11R-hIL-15/IL-15α, VACVΔE5R-IL-15/IL-15Rα, VACVΔE5R-IL-15/IL-15Rα-OX40L, VACV∆E3L83N-∆TK-anti-huCTLA-4-∆E5R- hFlt3L-hOX40L-hIL-12∆B2R∆WR199ΔWR200, VACV∆E3L83N-∆TK-anti-huCTLA-4-∆E5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12∆B2R∆WR199ΔWR200-hIL-15/15/IL E3L83N-∆TK-anti-huCTLA-4-∆E5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12∆B2R∆WR199ΔWR200∆C11R, VACV∆E3L83N-∆TK- anti-huCTLA-4-∆E5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12∆B2R∆WR199ΔWR200-hIL-15/IL-15Rα∆C11R, MYXV∆M63R∆M64R, MYXV∆M62R, MYXV∆M62R∆M63R∆M64R, MYXVΔM31R, MYXV∆M62R∆M63R∆M64R∆M31R, MYXV∆M63R∆M64R-hFlt3L-OX40L, MYXV∆M62R∆M63R∆M64R-hFlt3L-OX40L, MYXV∆M62R∆M63R∆M64 ∆M62R∆M63R∆M64R∆M31R-hFlt3L-OX40L-IL-12, MYXV∆M62R∆M63R∆M64R∆M31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-IL-15/IL-15Rα, MYXV∆M62R∆M63R∆M64R ∆M31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-anti-CTLA-4 e MYXV∆M62R∆M63R∆M64R∆M31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-IL-15/IL-15Rα-anti-CTLA-4.

347. Sequência de ácido nucleico caracterizado pelo fato de que codifica o poxvírus recombinante, definido de acordo com a reivindicação 346.

348. Kit, caracterizado pelo fato de que compreende o poxvírus recombinante, definido de acordo com a reivindicação 346.

349. Composição imunogênica, caracterizada pelo fato de que compreende o poxvírus recombinante, definido de acordo com a reivindicação 346.

350. Composição imunogênica, de acordo com a reivindicação 349, caracterizada pelo fato de que compreende ainda um veículo farmaceuticamente aceitável.

351. Composição imunogênica, de acordo com a reivindicação 349 ou reivindicação 350, caracterizada pelo fato de que compreende ainda um adjuvante farmaceuticamente aceitável.

352. Método para tratar um tumor sólido em um indivíduo em necessidade, o método caracterizado pelo fato de que compreende a administração a um tumor de uma composição compreendendo uma quantidade eficaz do poxvírus recombinante, definido de acordo com a reivindicação 349, ou a composição imunogênica definida de qualquer uma das reivindicações 349-351.

353. Método, de acordo com a reivindicação 352, caracterizado pelo fato de que o tratamento compreende um ou mais dentre os seguintes: induzir uma resposta imunológica no indivíduo contra o tumor ou aumentar ou promover uma resposta imunológica contínua contra o tumor no indivíduo, reduzir o tamanho do tumor, erradicar o tumor, inibir o crescimento do tumor, inibir o crescimento metastático do tumor, induzir apoptose de células de tumor ou prolongar a sobrevivência do indivíduo.

354. Método, de acordo com a reivindicação 352 ou reivindicação 353, caracterizado pelo fato de que a composição é administrada por injeção intratumoral ou intravenosa ou uma combinação simultânea ou sequencial de injeção intratumoral e intravenosa.

355. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 352-354, caracterizado pelo fato de que o tumor é melanoma, cólon, mama, bexiga ou carcinoma da próstata.

356. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 352-355, caracterizado pelo fato de que a composição compreende ainda um ou mais dentre os agentes selecionados a partir de: um ou mais agentes de bloqueio de ponto de verificação imunológico; um ou mais medicamentos anticâncer; fingolimode (FTY720); e qualquer combinação dos mesmos.

357. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 352-356, caracterizado pelo fato de que o método compreende ainda administrar separada, sequencial ou simultaneamente ao indivíduo um ou mais agentes selecionados a partir de: um ou mais agentes de bloqueio de ponto de verificação imunológico; um ou mais medicamentos anticâncer, fingolimode (FTY720); e qualquer combinação dos mesmos.

358. Método, de acordo com a reivindicação 356 ou 357, caracterizado pelo fato de que:

o um ou mais agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico são selecionados a partir do grupo que consiste em anticorpo anti-PD-L1, anticorpo anti-PD-1, anticorpo anti-CTLA-4, ipilimumabe, nivolumabe, pidilizumabe, lambrolizumabe, pembrolizumabe, atezolizumabe, avelumabe, durvalumabe, MPDL3280A, BMS-936559, MEDI-4736, MSB 00107180, LAG-3, TIM3, B7-H3, B7-H4, TIGIT, AMP-224, MDX-1105, arelumabe, tremelimumabe, IMP321, MGA271, BMS-986016, lirilumabe, urelumabe, PF-05082566, IPH2101, MEDI-6469, CP-870.893, mogamulizumabe, varlilumabe, galiximabe, AMP-514, AUNP 12, Indoximode, NLG-919, INCB024360, CD80, DLBCL ICOS, PDR001 e qualquer combinação dos mesmos; e/ou

o um ou mais medicamentos anticâncer são selecionados a partir do grupo que consiste em um inibidor de Mek (U0126, selumitinibe (AZD6244), PD98059, trametinibe, cobimetinibe), um inibidor de EGFR (lapatinibe (LPN), erlotinibe (ERL)), um inibidor de HER2 (lapatinibe (LPN), Trastuzumabe), um inibidor de Raf (sorafenibe (SFN)), um inibidor de BRAF (dabrafenibe, vemurafenibe), um anticorpo anti-OX40, um anticorpo agonista GITR, um

anticorpo anti-CSFR, um inibidor de CSFR, paclitaxel, agonista de TLR9 (CpG) e um inibidor de VEGF (bevacizumabw), e qualquer combinação dos mesmos.

359. Método, de acordo com a reivindicação 358, caracterizado pelo fato de que um ou mais agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico compreendem o anticorpo anti-PD-L1.

360. Método, de acordo com a reivindicação 358, caracterizado pelo fato de que um ou mais agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico compreendem o anticorpo. anti-PD-1.

361. Método, de acordo com a reivindicação 358, caracterizado pelo fato de que um ou mais agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico compreendem o anticorpo anti-CTLA-4.

362. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 356-358, caracterizado pelo fato de que a combinação de poxvírus recombinante com o agente de bloqueio do ponto de verificação imunológico, medicamento anticâncer e/ou fingolimode (FTY720) tem um efeito sinérgico no tratamento do tumor em comparação com a administração de poxvírus recombinante ou do agente de bloqueio do ponto de verificação imunológico, medicamento anticâncer ou fingolimode (FTY720) sozinho.

363. Método para estimular uma resposta imunológica, caracterizado pelo fato de que compreende a administração a um indivíduo de uma quantidade eficaz do vírus, de acordo com a reivindicação 346, ou a composição imunogênica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 349-351.

364. Método, de acordo com qualquer a reivindicação 363, caracterizado pelo fato de que o método compreende ainda administrar separada, sequencial ou simultaneamente ao indivíduo um ou mais agentes selecionados a partir de: um ou mais agentes de bloqueio de ponto de verificação imunológico; um ou mais medicamentos anticâncer, fingolimode (FTY720); e qualquer combinação dos mesmos.

365. Método, de acordo com a reivindicação 364, caracterizado pelo fato de que:

o um ou mais agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico são selecionados a partir do grupo que consiste em anticorpo anti-PD-L1, anticorpo anti-PD-1, anticorpo anti-CTLA-4, ipilimumabe, nivolumabe, pidilizumabe, lambrolizumabe, pembrolizumabe, atezolizumabe, avelumabe, durvalumabe, MPDL3280A, BMS-936559, MEDI-4736, MSB 00107180, LAG-3, TIM3, B7-H3, B7-H4, TIGIT, AMP-224, MDX-1105, arelumabe, tremelimumabe, IMP321, MGA271, BMS-986016, lirilumabe, urelumabe, PF-05082566, IPH2101, MEDI-6469, CP-870.893, mogamulizumabe, varlilumabe, galiximabe, AMP-514, AUNP 12, Indoximode, NLG-919, INCB024360, CD80, DLBCL ICOS, PDR001 e qualquer combinação dos mesmos; e/ou

o um ou mais medicamentos anticâncer são selecionados a partir do grupo que consiste em um inibidor de Mek (U0126, selumitinibe (AZD6244), PD98059, trametinibe, cobimetinibe), um inibidor de EGFR (lapatinibe (LPN), erlotinibe (ERL)), um inibidor de HER2 (lapatinibe (LPN), Trastuzumabe), um inibidor de Raf (sorafenibe (SFN)), um inibidor de BRAF (dabrafenibe, vemurafenibe), um anticorpo anti-OX40, um anticorpo agonista GITR, um anticorpo anti-CSFR, um inibidor de CSFR, paclitaxel, agonista de TLR9 (CpG) e um inibidor de VEGF (bevacizumabw), e qualquer combinação dos mesmos.

366. Método, de acordo com a reivindicação 365, caracterizado pelo fato de que um ou mais agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico compreendem o anticorpo anti-PD-L1.

367. Método, de acordo com a reivindicação 365, caracterizado pelo fato de que um ou mais agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico compreendem o anticorpo anti-PD-1.

368. Método, de acordo com a reivindicação 365, caracterizado pelo fato de que um ou mais agentes de bloqueio do ponto de verificação imunológico compreendem o anticorpo anti-CTLA-4.

369. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 363-365, caracterizado pelo fato de que a combinação de poxvírus recombinante com o agente de bloqueio do ponto de verificação imunológico, medicamento anticâncer e/ou fingolimode (FTY720) tem um efeito sinérgico na estimulação de resposta imunológica em comparação com a administração de poxvírus recombinante ou do agente de bloqueio do ponto de verificação imunológico.

370. Poxvírus recombinante, de acordo com a reivindicação 346, caracterizado pelo fato de que quando o poxvírus é selecionado a partir de VACV-TK--anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL- 12, VACVE3LΔ83N-ΔTK-anti-CTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-OX40L-IL-12-ΔB2R, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL2-12 WR199ΔWR200, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200-hIL-15/IL-15Rα, VACVΔE3L83N-ΔTKLA-anti -ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR200ΔC11R, VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-hOX40L-hIL-12ΔB2RΔWR199ΔWR199ΔWR hIL-15/IL-15RαΔC11R, MYXVΔM63RΔM64R, MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R-hFlt3L-OX40L-IL-12-anti-CTLA-4, ou MYXVΔM62RΔM63RΔM64RΔM31R -hFlt3L-OX40L-IL-12-IL-15/IL-15Rα-anti-CTLA-4, o vírus pode ser projetado para expressar anticorpo anti-PD1, anticorpo anti-PDL1 ou uma combinação de anti-CTLA-4 e anticorpo anti-PD1 no lugar ou em adição à expressão de anti-CTLA-4.

FIG. 1

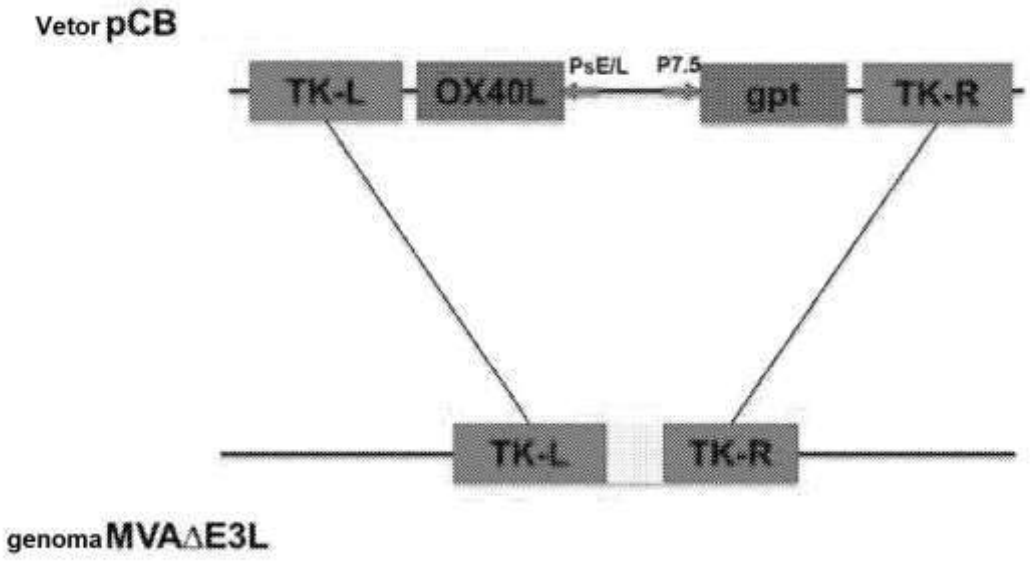


FIG. 2A

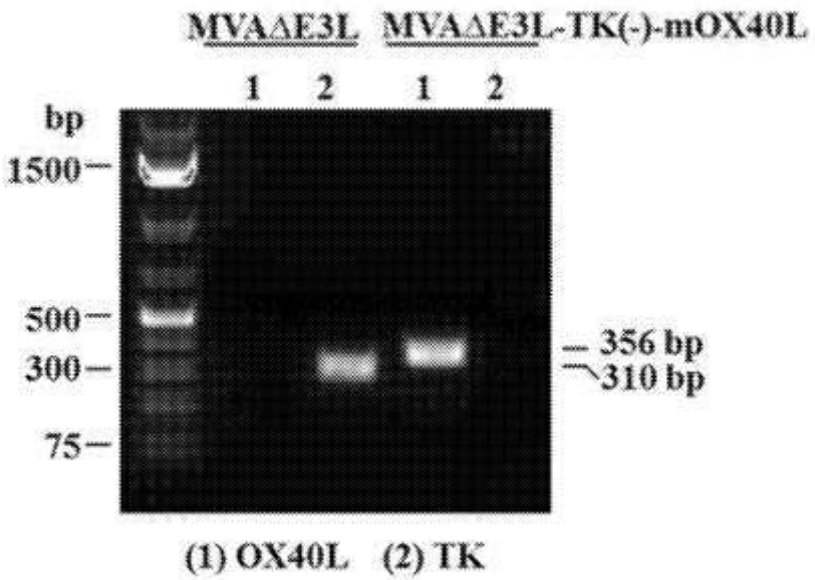

MVAΔE3L
MVAΔE3L-TK(-)-mOX40L
1
2
1
2
bp
1500
500
300
75
356 bp
310 bp
(1) OX40L (2) TK

FIG. 2B

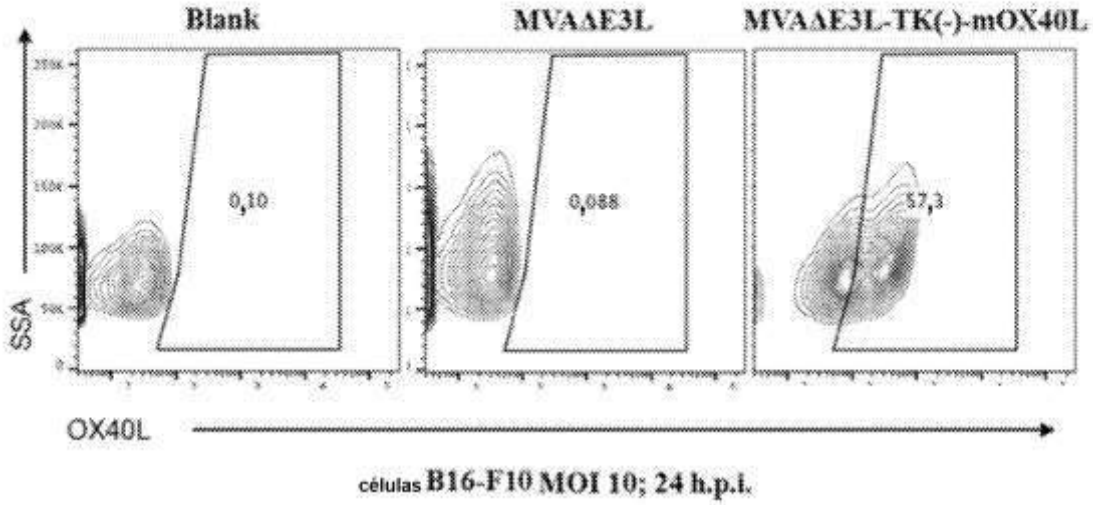

Blank
MVAΔE3L
MVAΔE3L-TK(-)-mOX40L
0,10
0,088
57,3
SSA
OX40L
células B16-F10 MOI 10; 24 h.p.i.

FIG. 3A

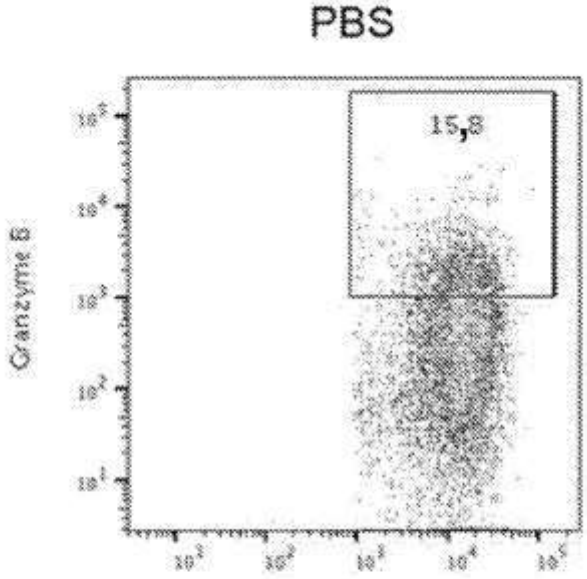


FIG. 3B

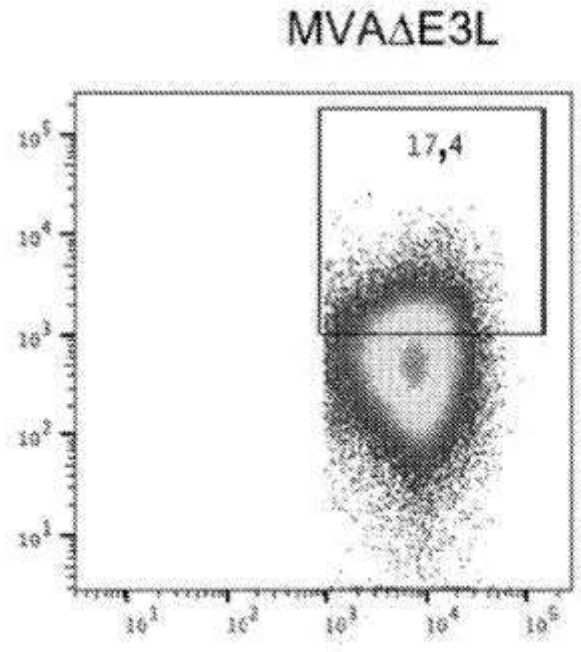


FIG. 3C

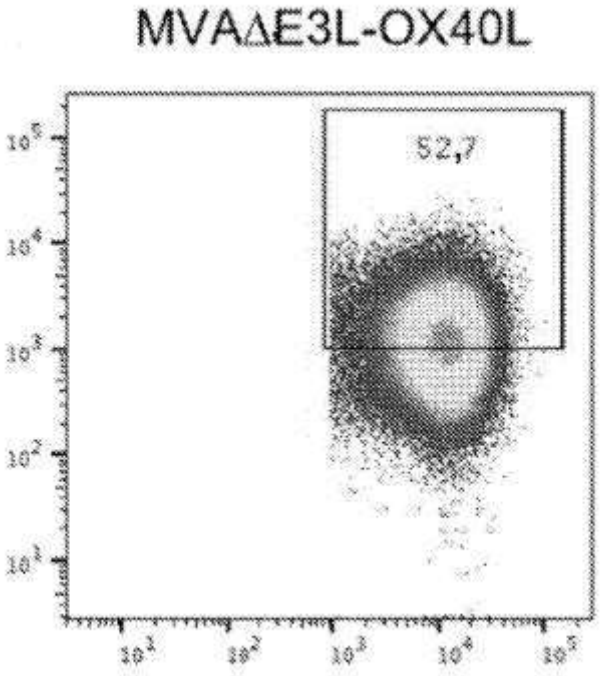

MVAΔE3L-OX40L
52,7

FIG. 3D

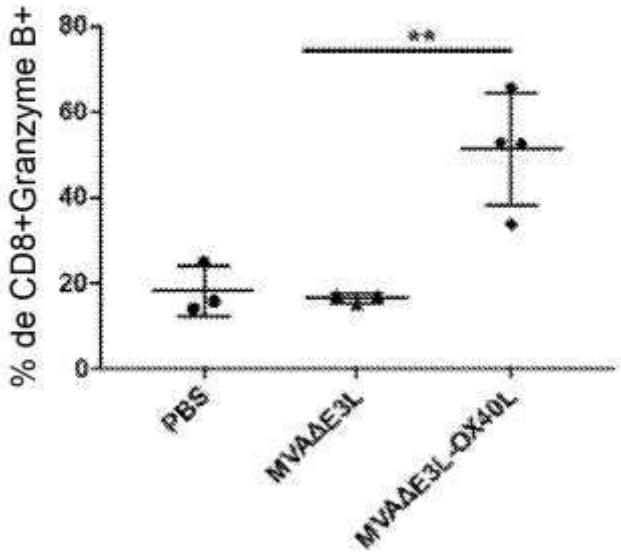

% de CD8+Granzyme B+
80
60
40
20
0
**
PBS
MVAΔE3L
MVAΔE3L-OX40L

FIG. 3E

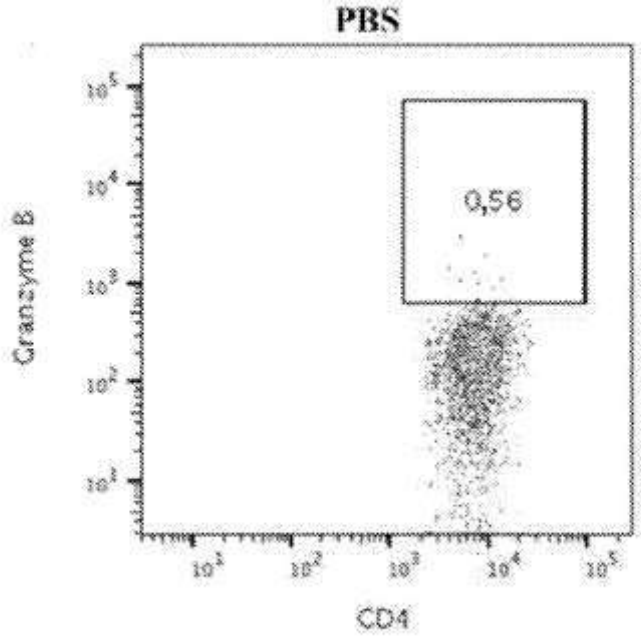


FIG. 3F

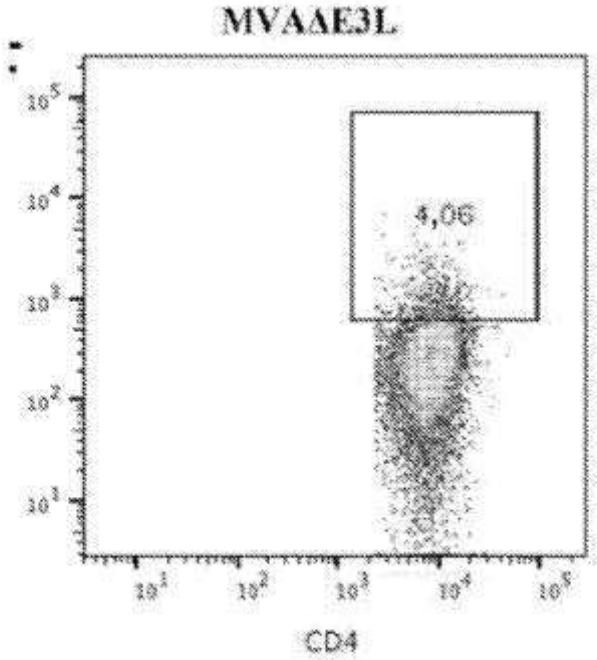


FIG. 3G

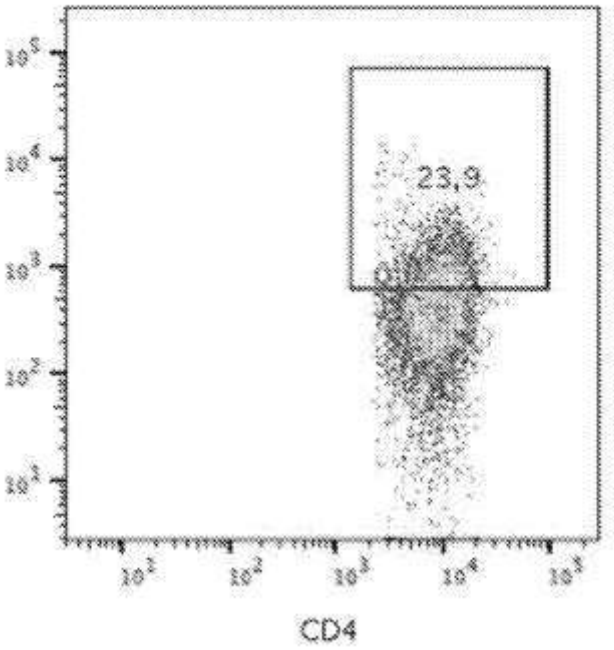

23,9
CD4

FIG. 3H

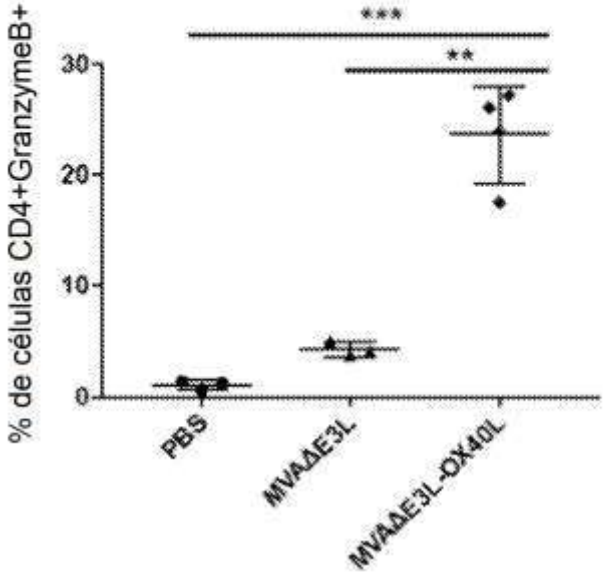

***
**
% de células CD4+GranzymeB+
30
20
10
0
PBS
MVAΔE3L
MVAΔE3L-OX40L

FIG. 4A

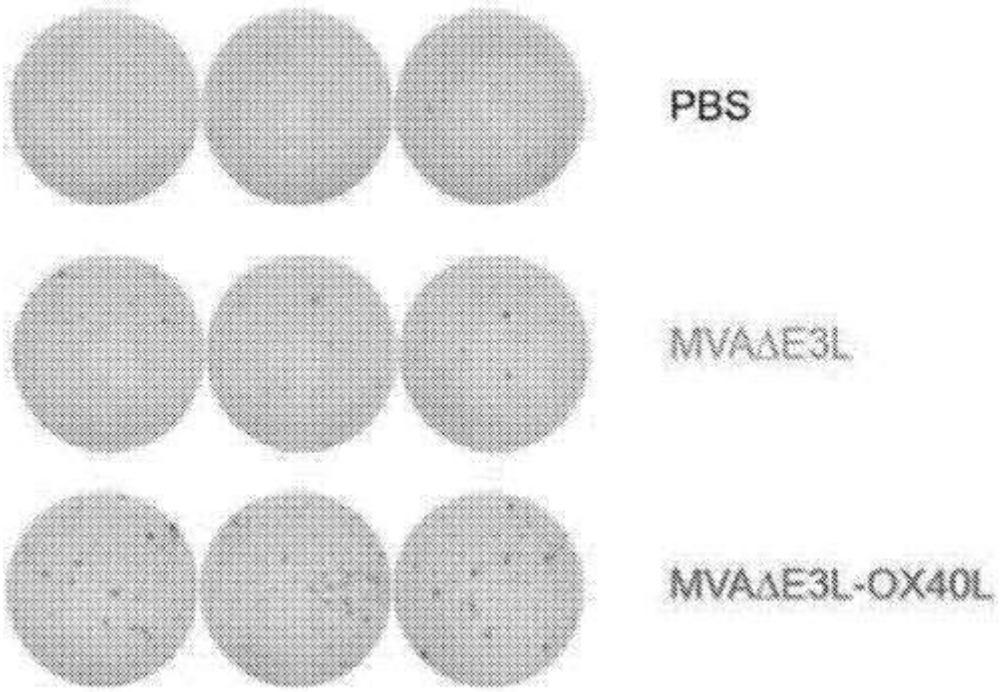

PBS
MVAΔE3L
MVAΔE3L-OX40L

FIG. 4B

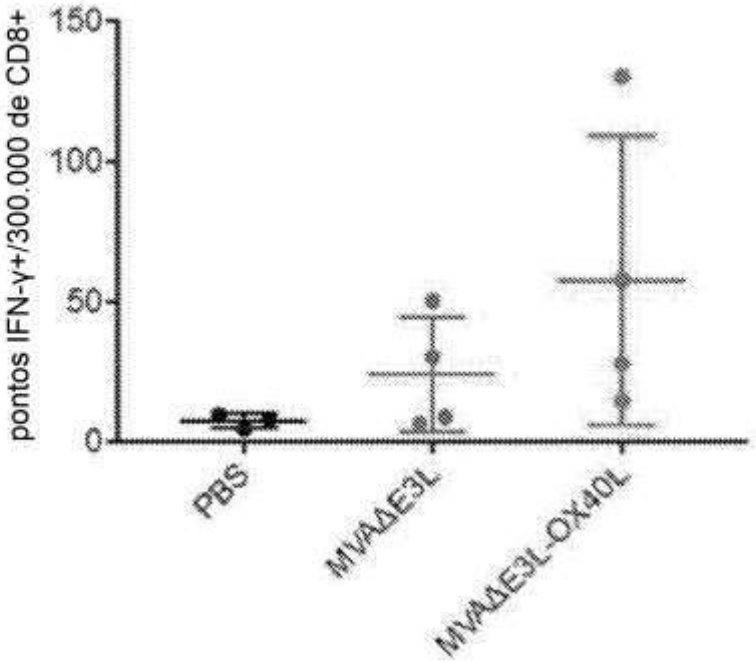

pontos IFN-γ+/300.000 de CD8+
150
100
50
0
PBS
MVAΔE3L
MVAΔE3L-OX40L

FIG. 5A

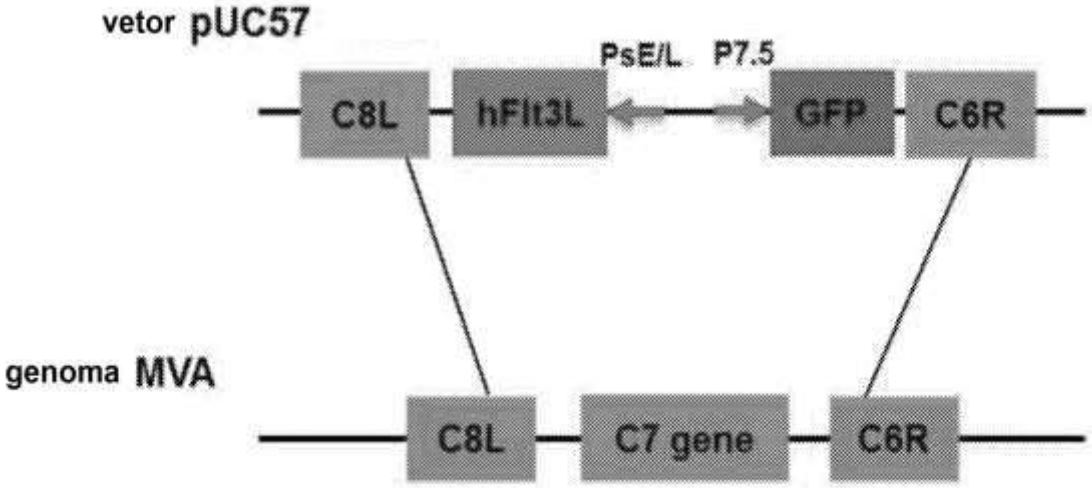

vetor pUC57
PsE/L
P7.5
C8L
hFlt3L
GFP
C6R
genoma MVA
C8L
C7 gene
C6R

FIG. 5B

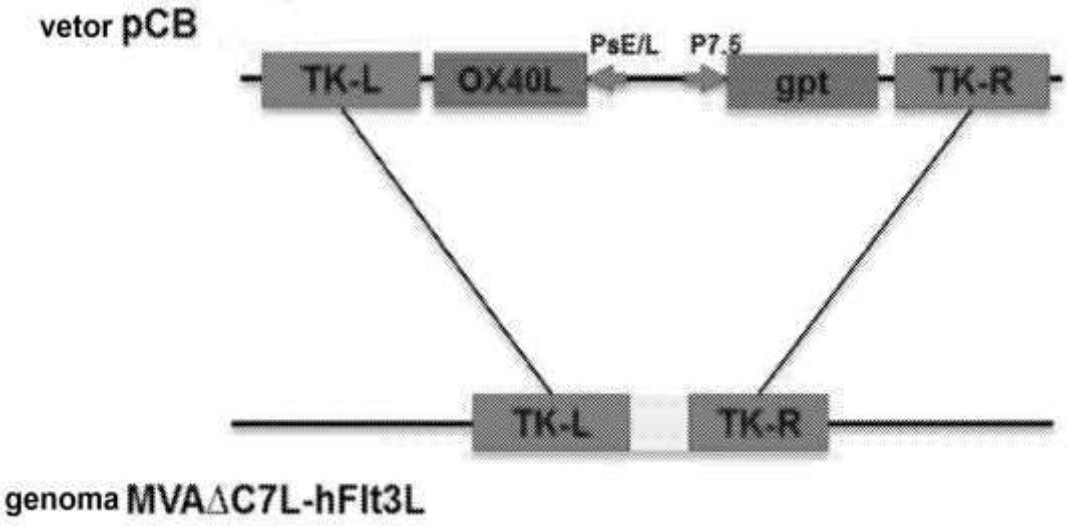

vetor pCB
PsE/L
P7.5
TK-L
OX40L
gpt
TK-R
TK-L
TK-R
genoma MVAΔC7L-hFlt3L

FIG. 5C

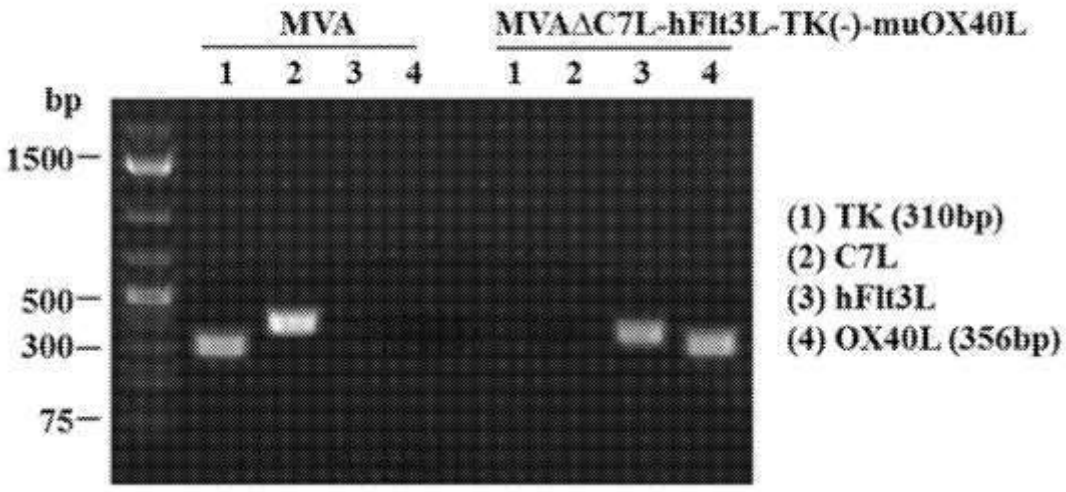

MVA
MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-muOX40L
1 2 3 4 1 2 3 4
bp
1500
500
300
75
(1) TK (310bp)
(2) C7L
(3) hFlt3L
(4) OX40L (356bp)

FIG. 6

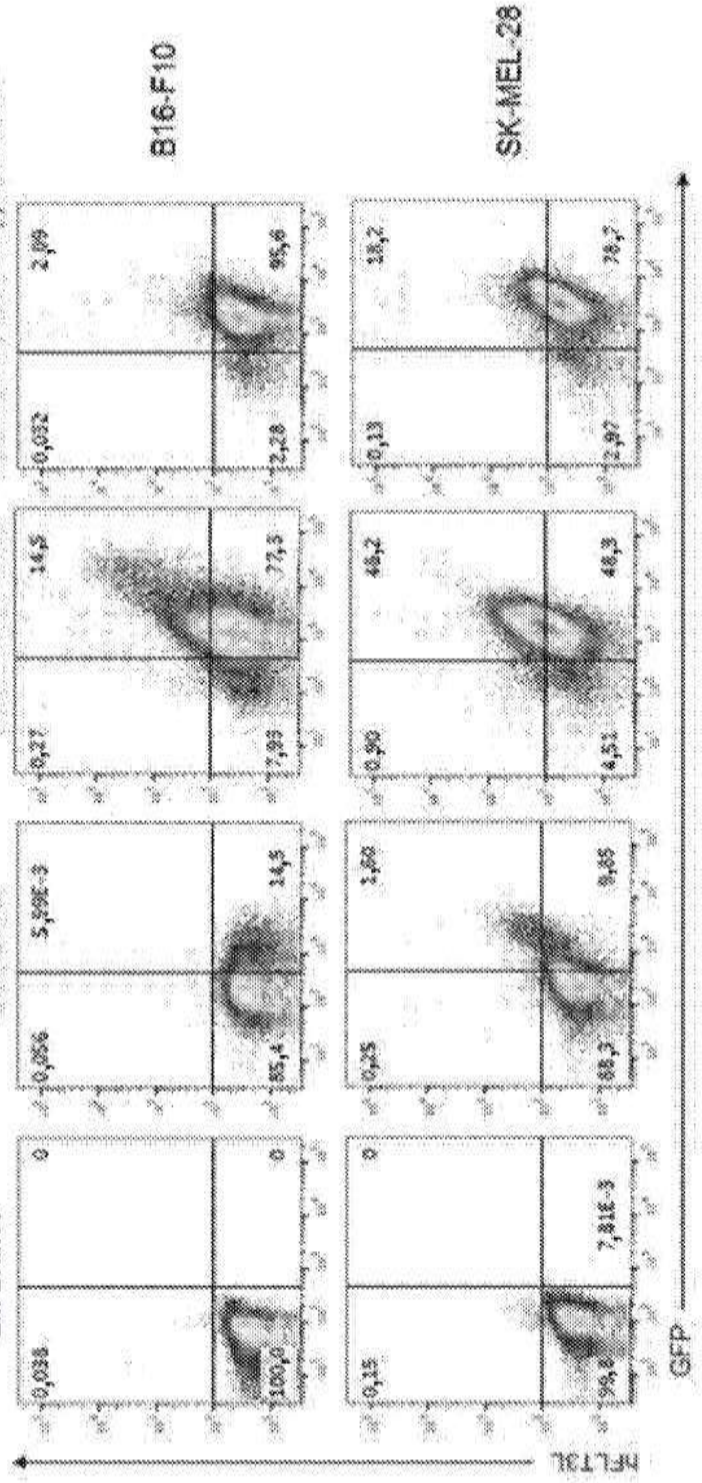

B16-F10
SK-MEL-28
Em Branco
MVAΔC7L
MVAΔC7L-hFLT3L
MVAΔC7L-hFLT3L-TK(-)-mIL4OL
hFLT3L
GFP

FIG. 7

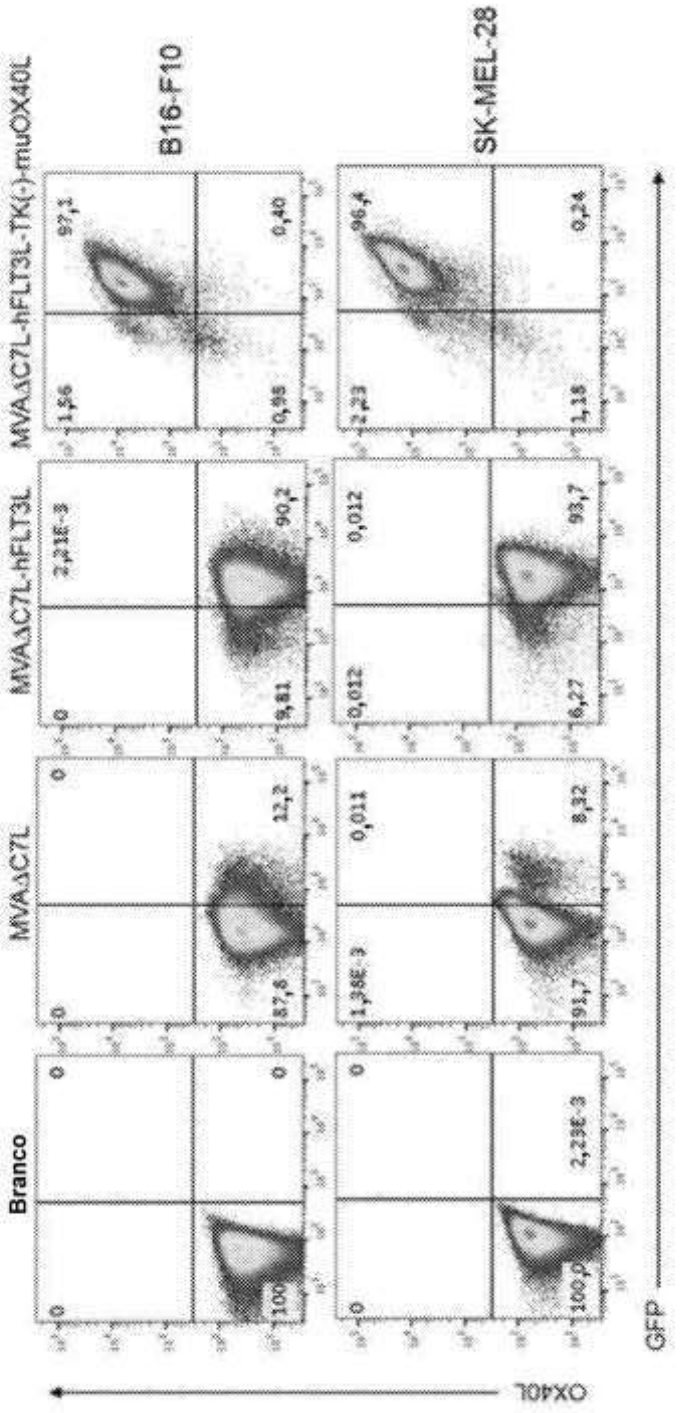

Branco
MVAΔC7L
MVAΔC7L-hFLT3L
MVAΔC7L-hFLT3L-TK(-)-muOX40L
B16-F10
SK-MEL-28
OX40L
GFP

FIG. 8A

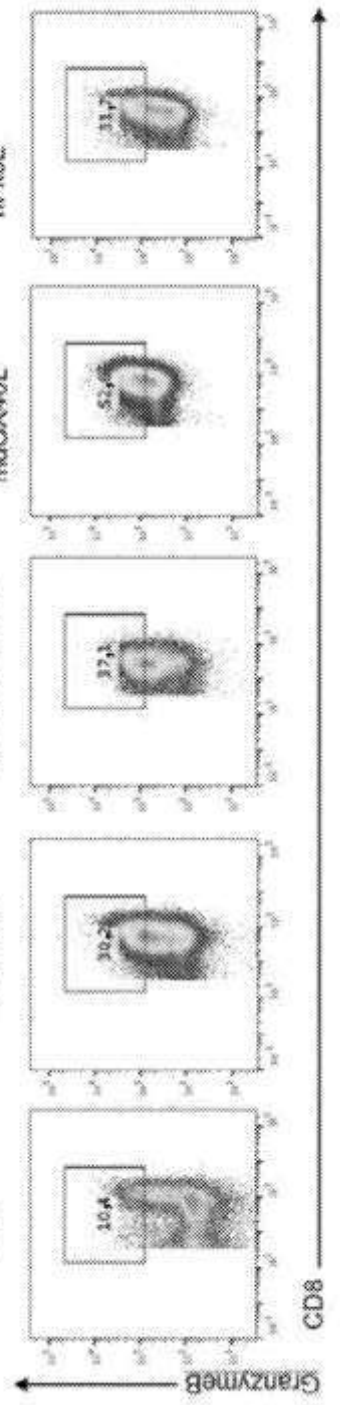

PBS
MVAΔC7
MVAΔC7-hFl3L
MVAΔC7-hFl3L-muOX40L
Heat-iMVAΔC7-hFl3L
Granzyme B
CD8

FIG. 8B

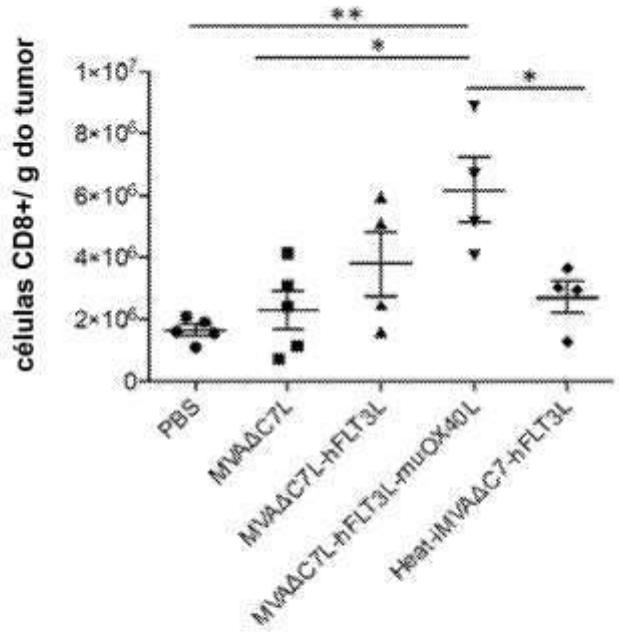

células CD8+/ g do tumor
1×10^7
8×10^6
6×10^6
4×10^6
2×10^6
0
**
*
*
PBS
MVAΔC7L
MVAΔC7L-hFLT3L
MVAΔC7L-hFLT3L-muOX40L
Heat-MVAΔC7-hFLT3L

FIG. 8C

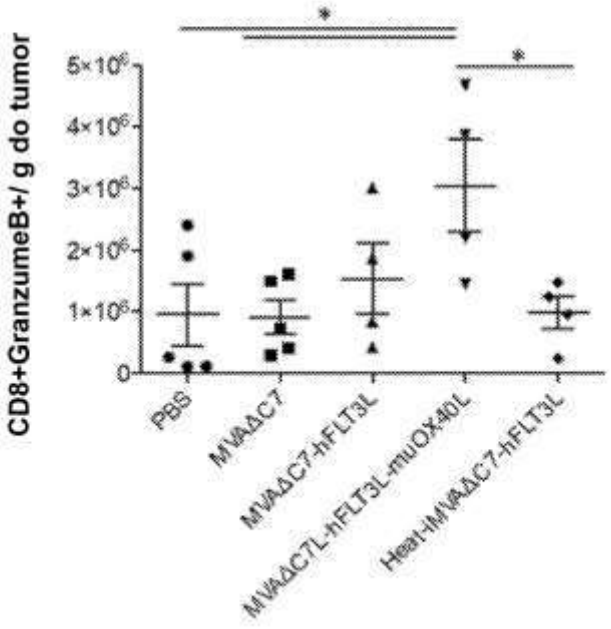

CD8+GranzumeB+/ g do tumor
5×10^6
4×10^6
3×10^6
2×10^6
1×10^6
0
*
*
PBS
MVAΔC7
MVAΔC7-hFLT3L
MVAΔC7L-hFLT3L-muOX40L
Heat-MVAΔC7-hFLT3L

FIG. 9A

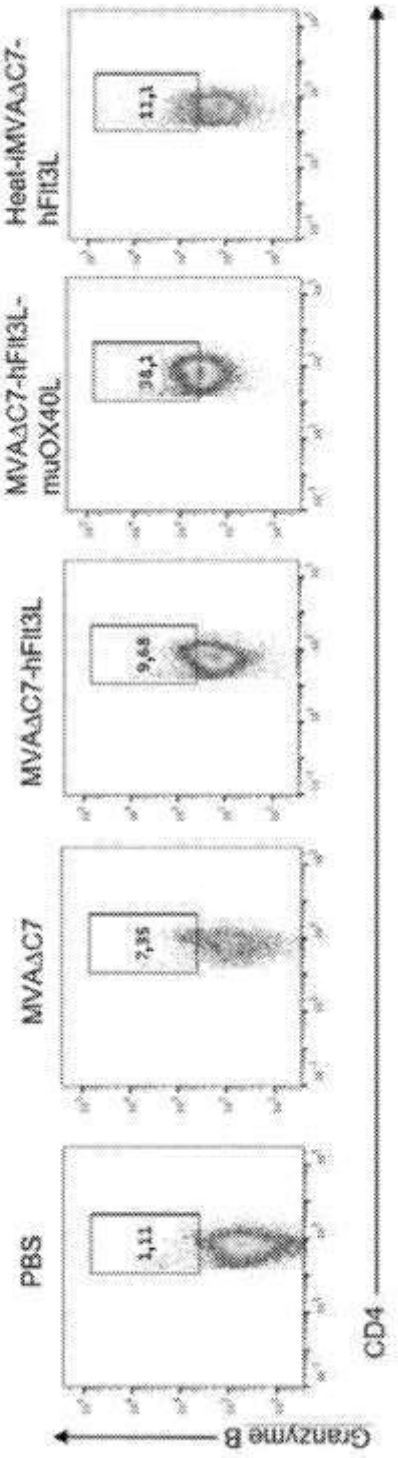

PBS
MVAΔC7
MVAΔC7-hFl3L
MVAΔC7-hFl3L-muOX40L
Heat-iMVAΔC7-hFl3L
1,11
2,35
9,68
38,1
11,1
Granzyme B
CD4

FIG. 9B

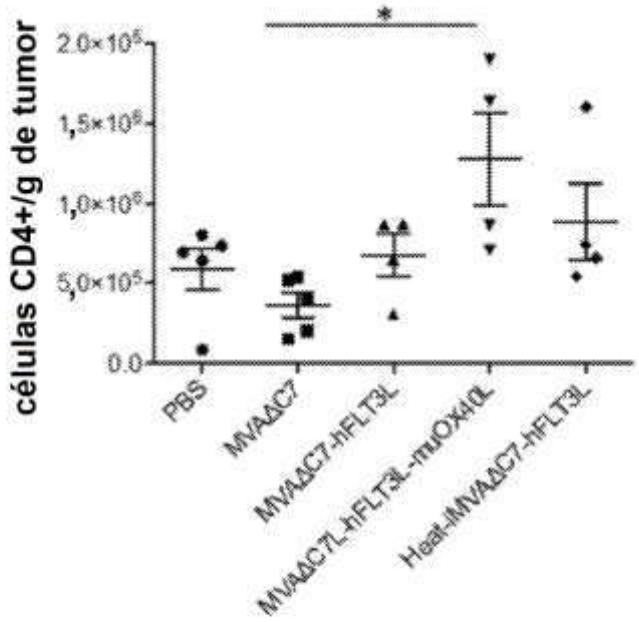

células CD4+/g de tumor
2,0×10^6
1,5×10^6
1,0×10^6
5,0×10^5
0,0
*
PBS
MVAΔC7
MVAΔC7-hFLT3L
MVAΔC7L-hFLT3L-muOX40L
Heat-iMVAΔC7-hFLT3L

FIG. 9C

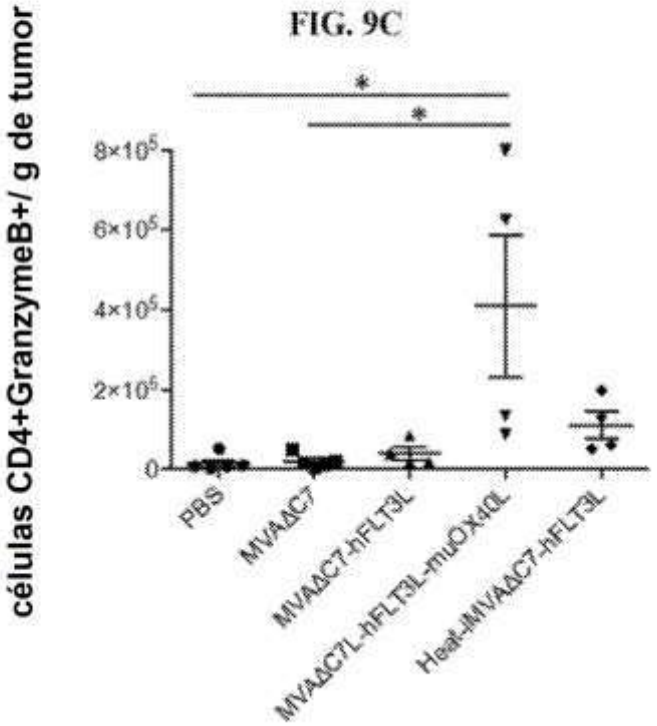

células CD4+GranzymeB+/ g de tumor
8×10^5
6×10^5
4×10^5
2×10^5
0
*
*
PBS
MVAΔC7
MVAΔC7-hFLT3L
MVAΔC7L-hFLT3L-muOX40L
Heat-iMVAΔC7-hFLT3L

FIG. 10A

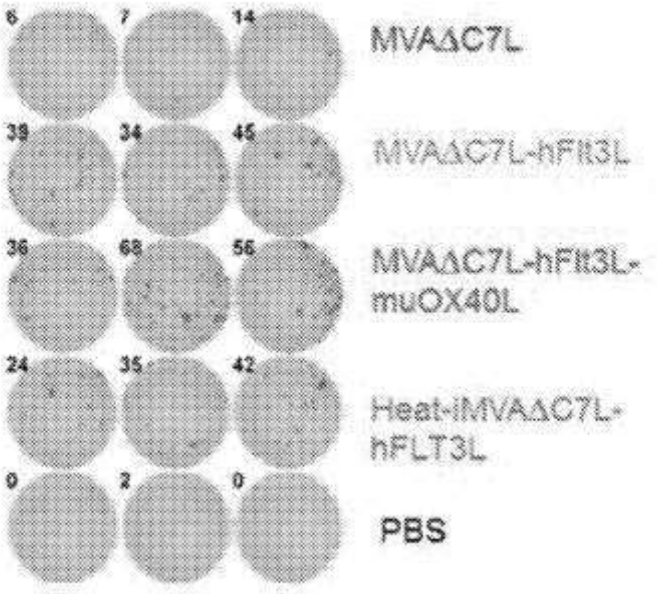


FIG. 10B

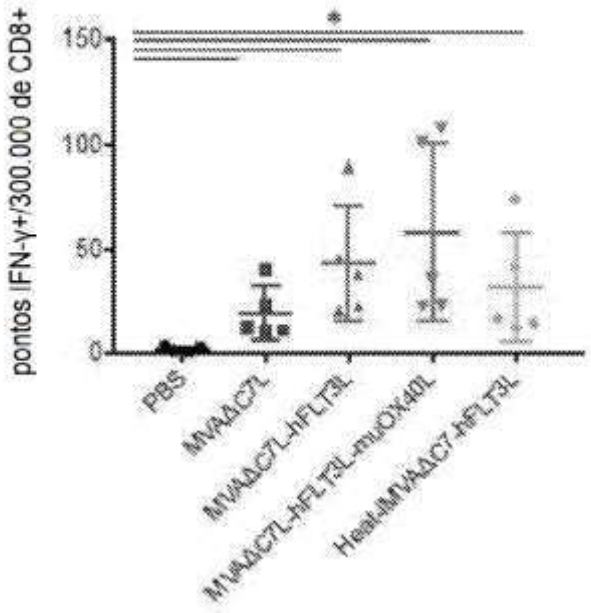
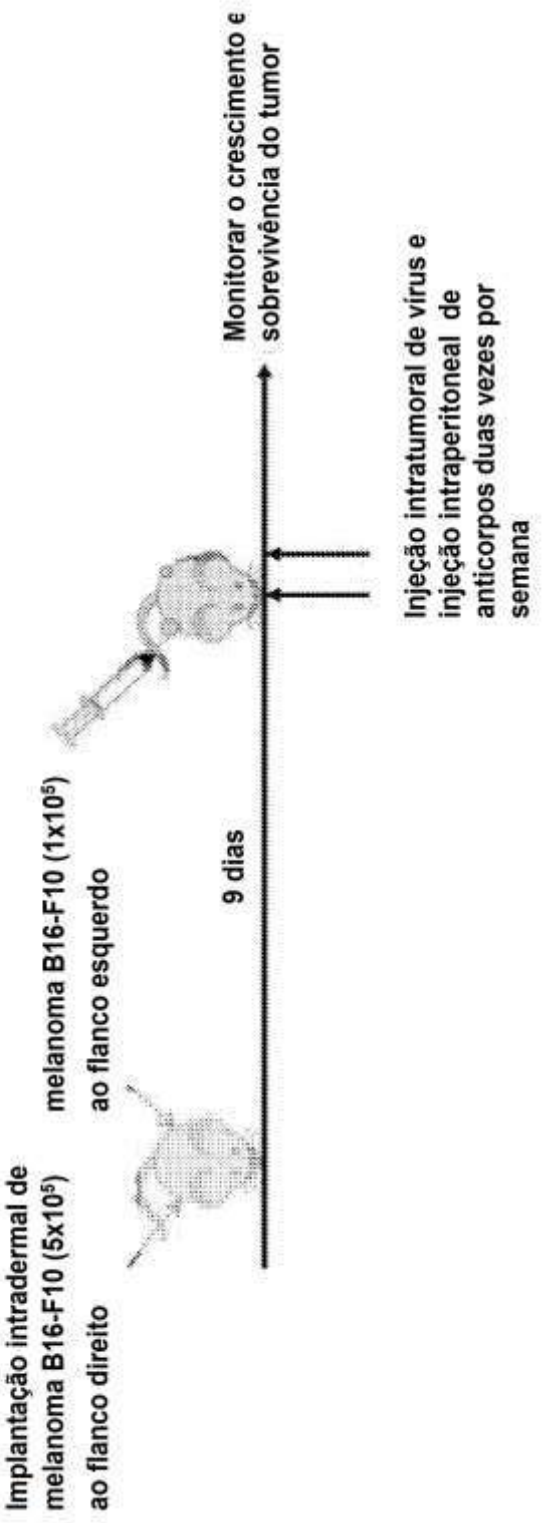
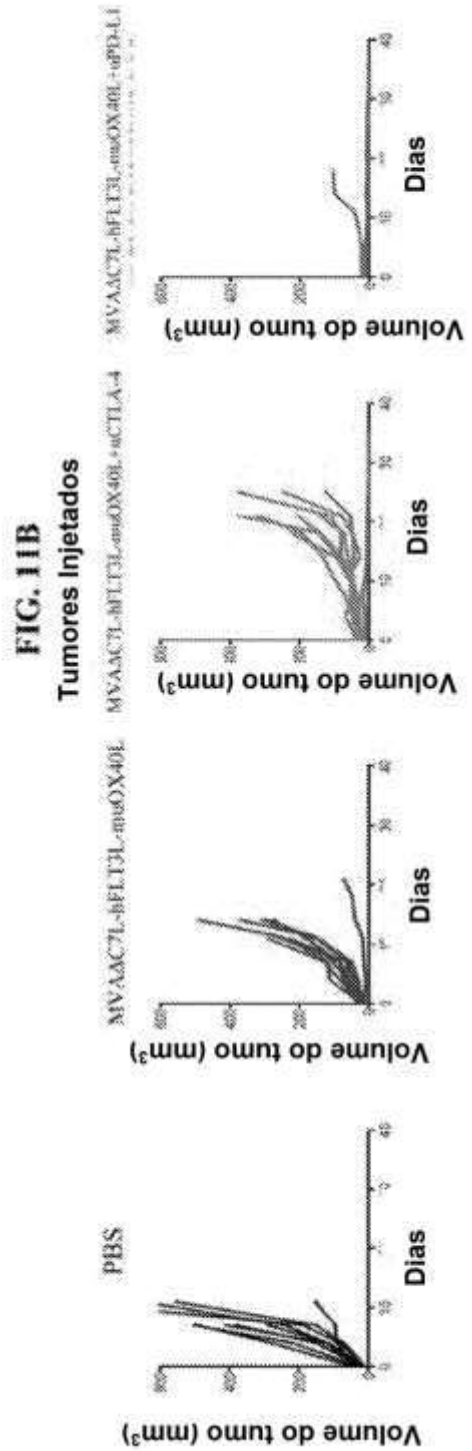
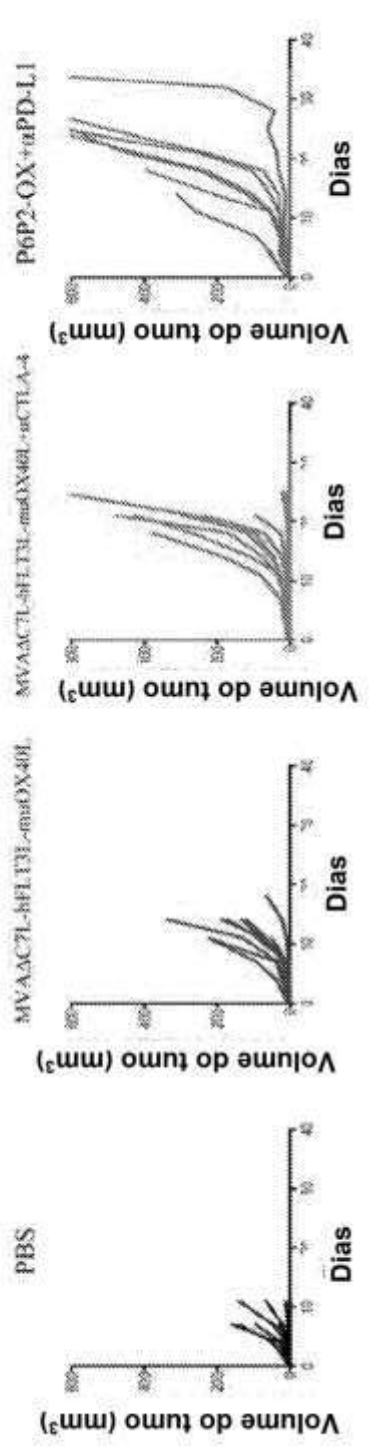


FIG. 11A


Implantação intradermal de melanoma B16-F10 (5x10⁵) ao flanco direito
melanoma B16-F10 (1x10⁵) ao flanco esquerdo
9 dias
Monitorar o crescimento e sobrevivência do tumor
Injeção intratumoral de vírus e injeção intraperitoneal de anticorpos duas vezes por semana


FIG. 11B
Tumores Injetados
PBS
MVAΔC7L-hFLT3L-muOX40L
MVAΔC7L-hFLT3L-muOX40L+aCTLA-4
MVAΔC7L-hFLT3L-muOX40L+aPD-L1
Volume do tumo (mm3)
Dias


FIG. 11C
Tumores não Injetados
PBS
MVAΔC7L-hFLT3L-muOX40L
MVAΔC7L-hFLT3L-muOX40L+aCTLA-4
P6P2-OX+aPD-L1
Volume do tumo (mm3)
Dias

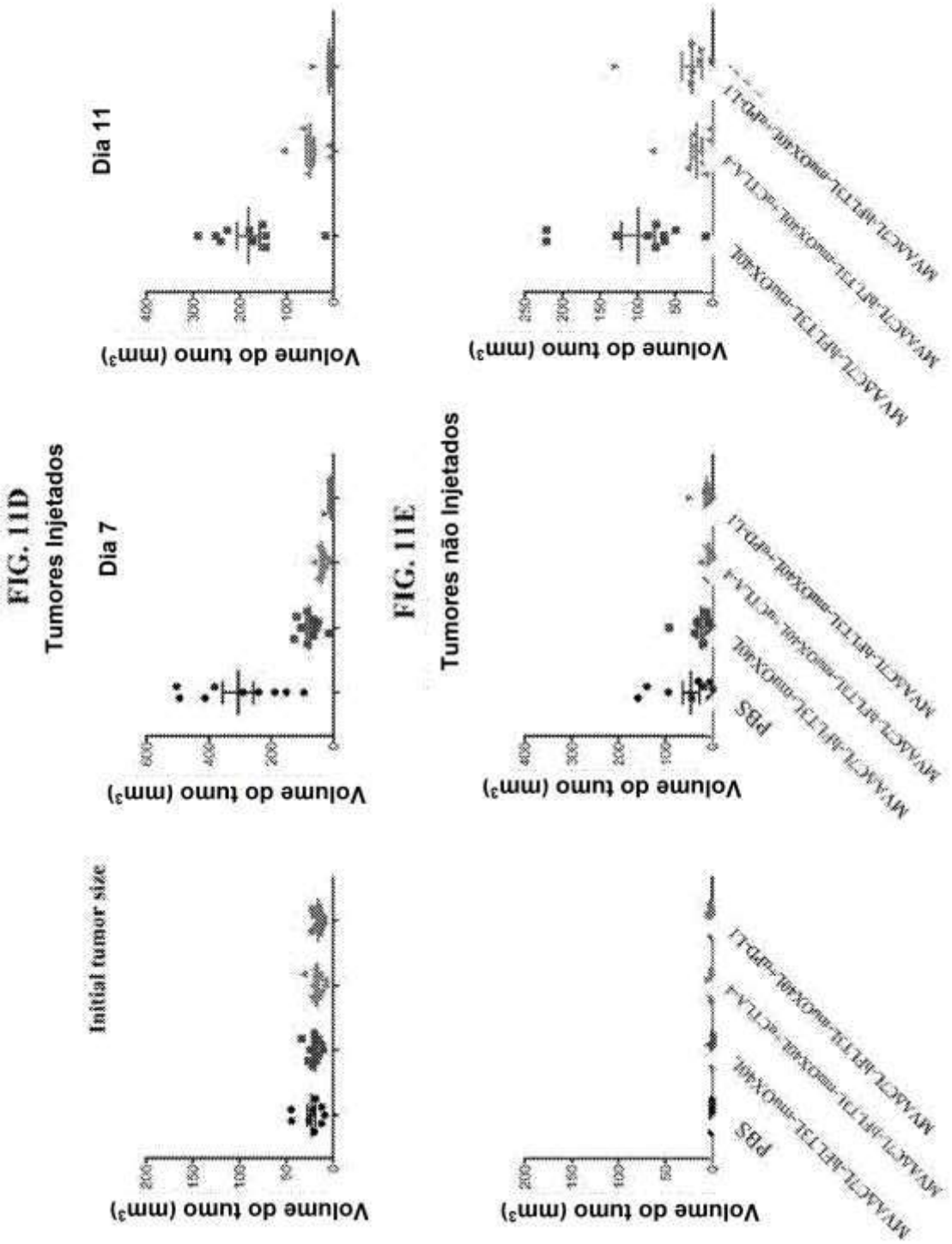

FIG. 11D
Tumores Injetados
Initial tumor size
Dia 7
Dia 11
Volume do tumo (mm³)
FIG. 11E
Tumores não Injetados
PBS
MVAΔC7L-ΔF1T3L-muOX40L
MVAΔC7L-ΔF1T3L-muOX40L-αCTLA-4
MVAΔC7L-ΔF1T3L-muOX40L-αPDL1

FIG. 11F

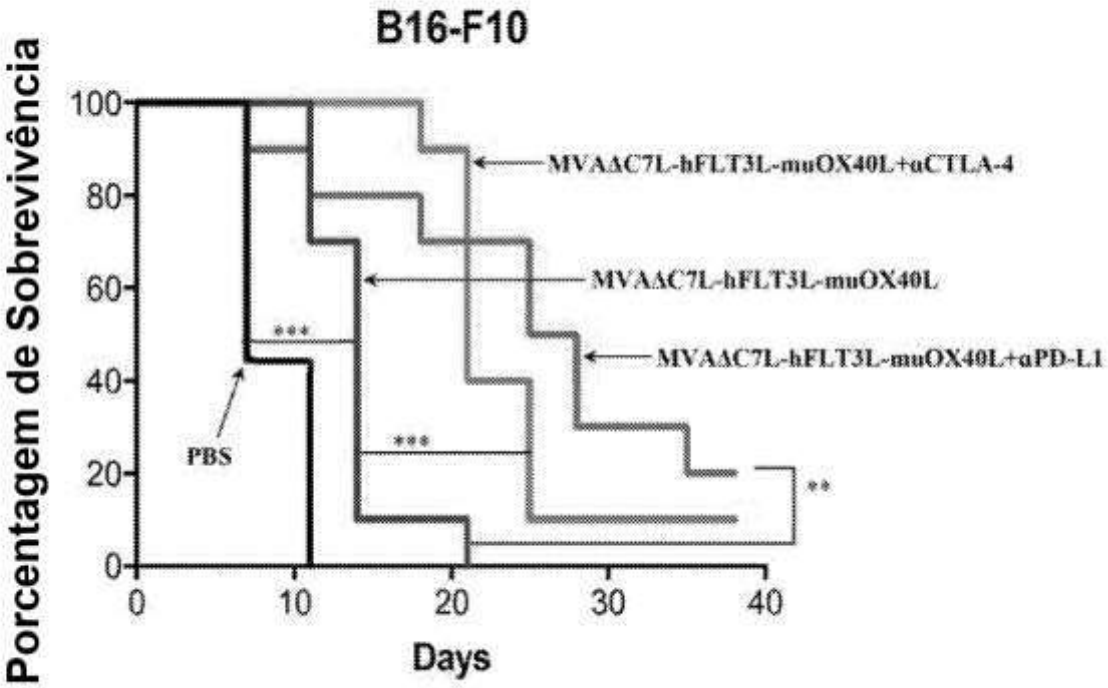


FIG. 11G

PBS	MVAΔC7L-hFLT3L-muOX40L	MVAΔC7L-hFLT3L-muOX40L + αCTLA-4	MVAΔC7L-hFLT3L-muOX40L + αPD-L1
7	14	21	26.5

FIG. 12

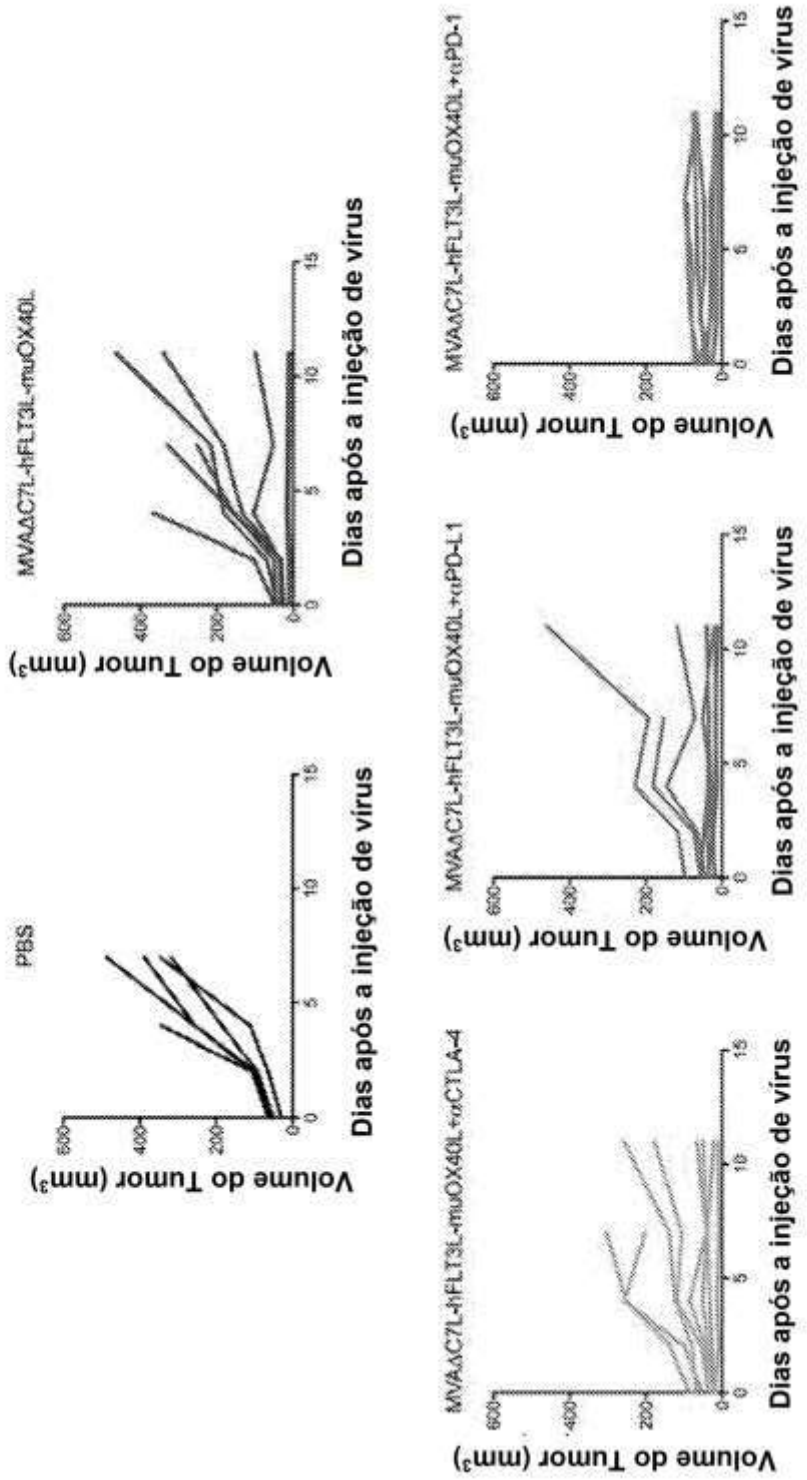

PBS
MVAΔC7L-hFLT3L-muOX40L
MVAΔC7L-hFLT3L-muOX40L+αCTLA-4
MVAΔC7L-hFLT3L-muOX40L+αPD-L1
MVAΔC7L-hFLT3L-muOX40L+αPD-1
Volume do Tumor (mm³)
Dias após a injeção de vírus

FIG. 13A

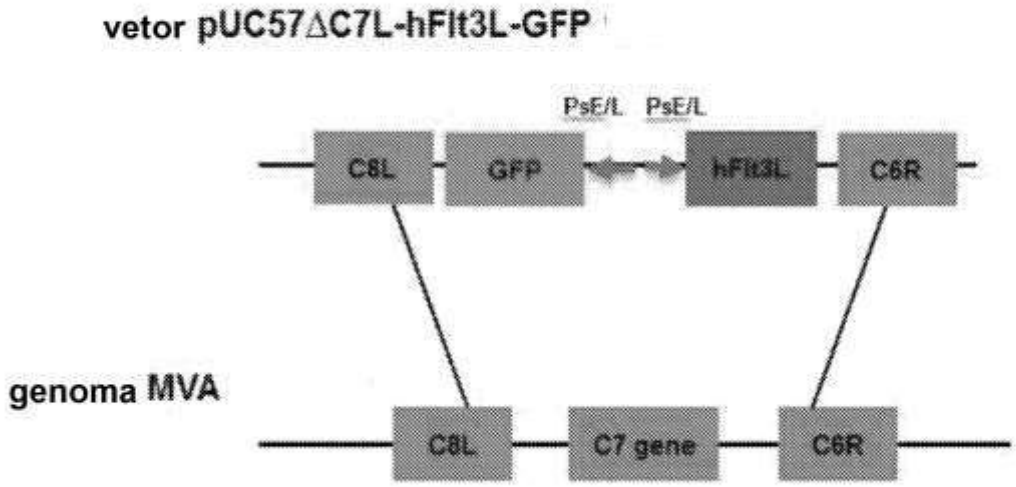


FIG. 13B

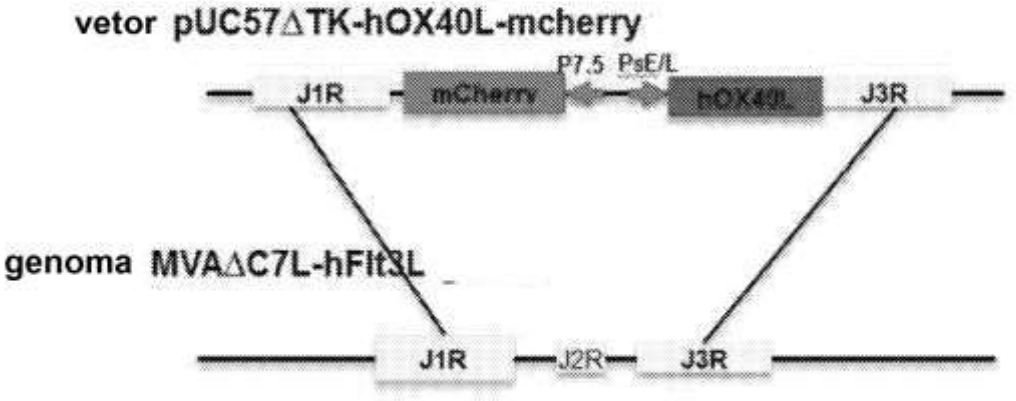


FIG. 13C

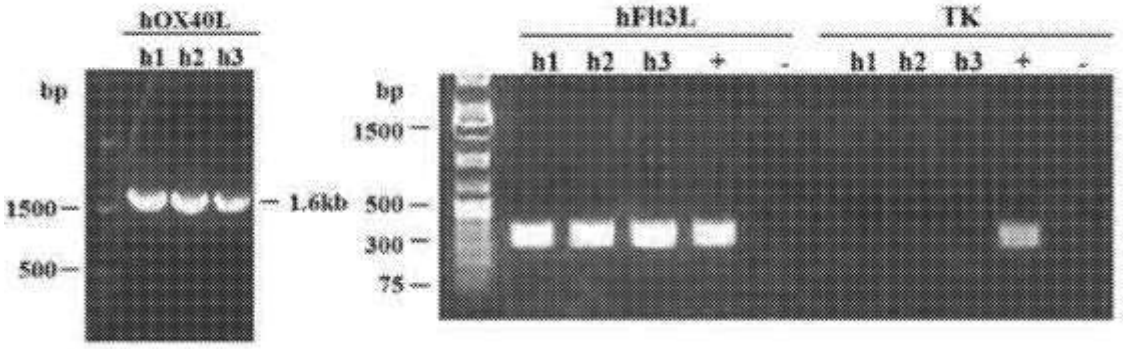

hOX40L
h1 h2 h3
bp
1500
500
1.6kb
hFlt3L
TK
h1 h2 h3 + - h1 h2 h3 + -
bp
1500
500
300
75

FIG. 14A

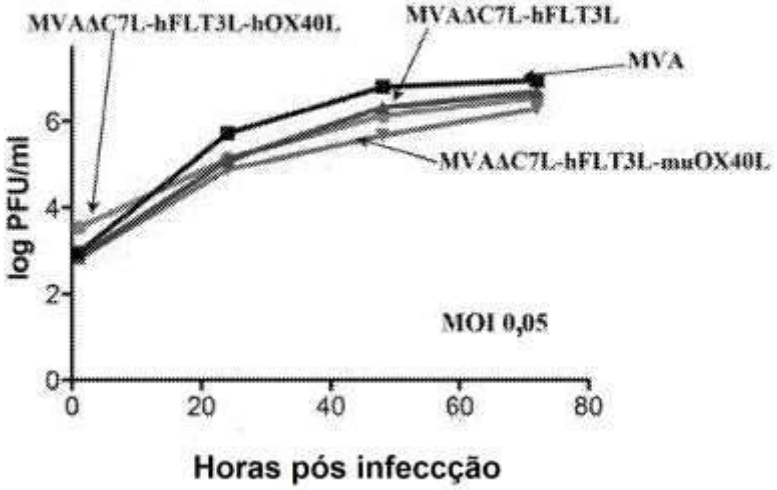


FIG. 14B

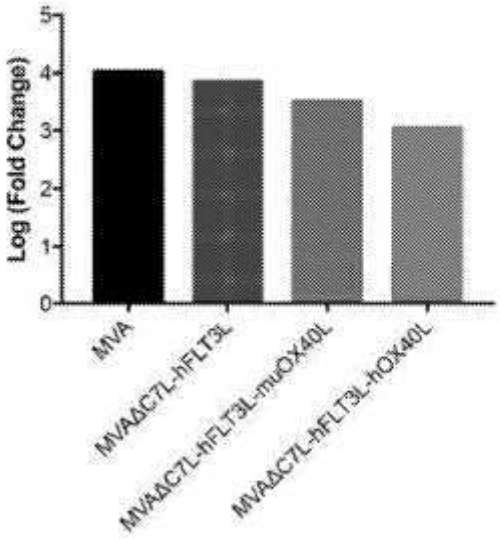


FIG. 15A

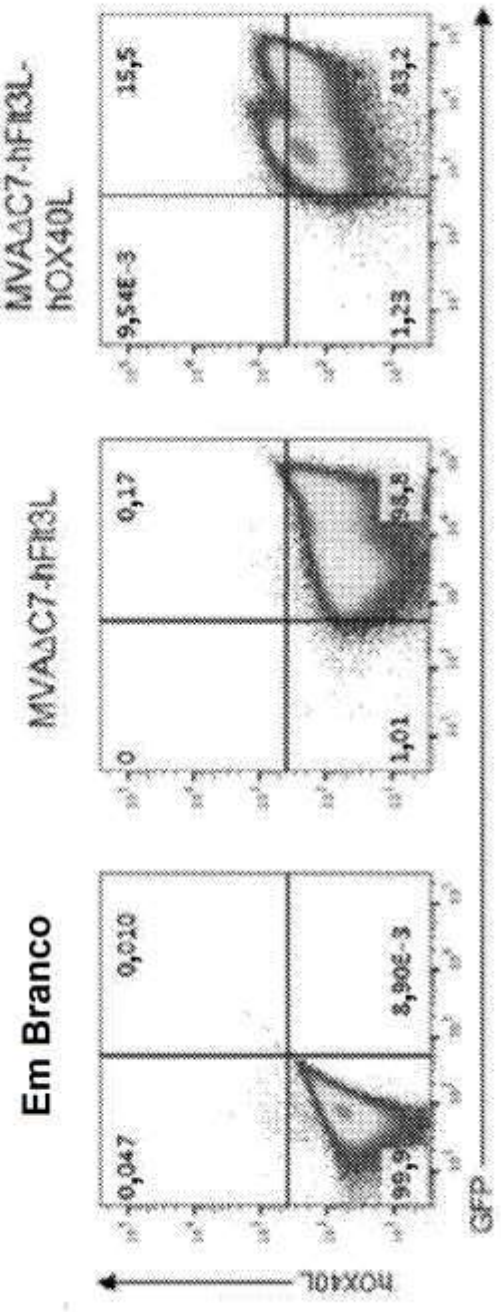

Em Branco
MVAΔC7-hFlt3L
MVAΔC7-hFlt3L-hOX40L
0,047
0,010
99,9
8,90E-3
0
0,17
1,01
98,8
9,54E-3
15,5
1,23
83,2
hOX40L
GFP

FIG. 15B

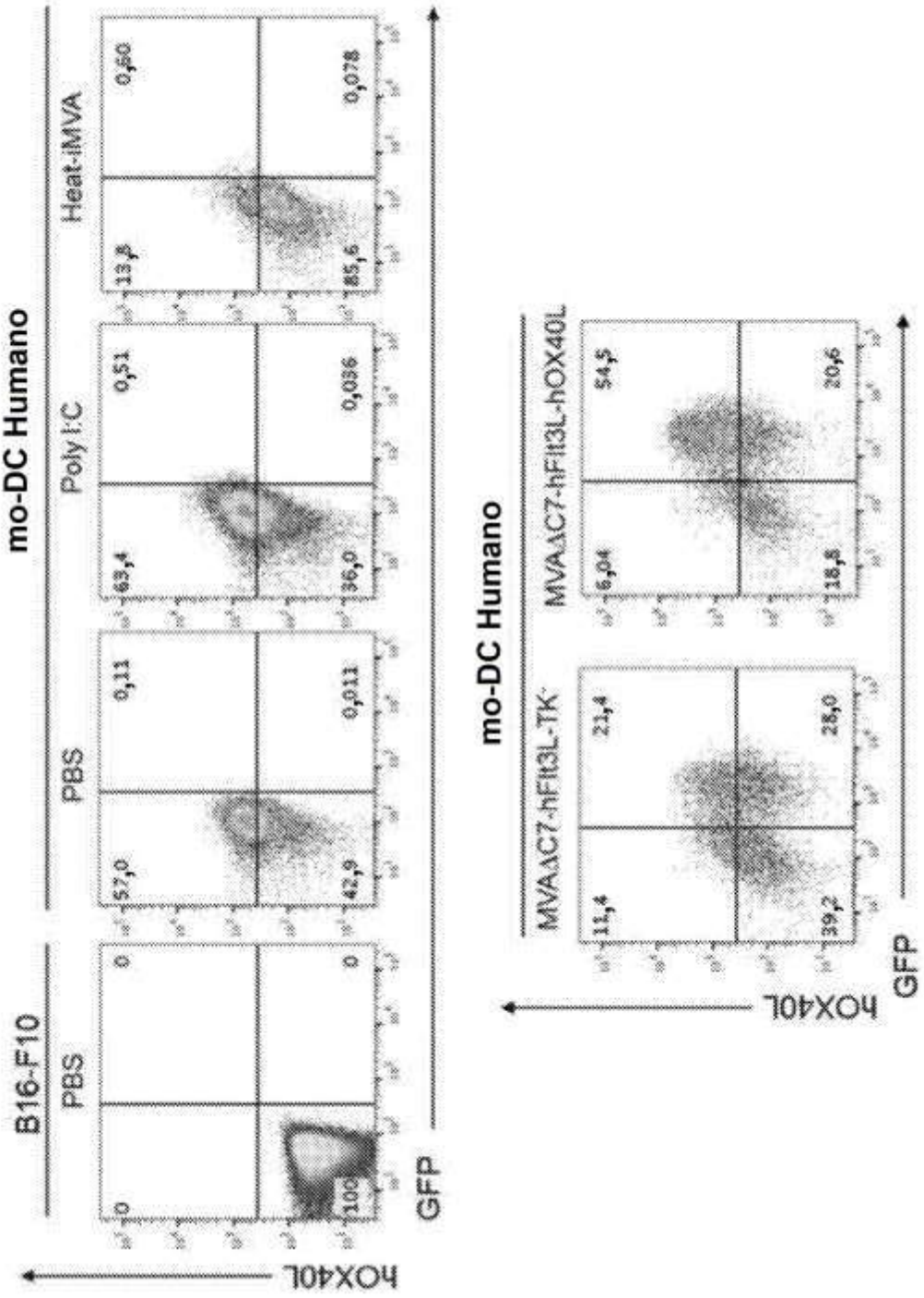

B16-F10
mo-DC Humano
PBS
PBS
Poly I:C
Heat-iMVA
0
0
57,0
0,11
63,4
0,51
13,8
0,50
100
42,9
0,011
36,0
0,086
85,6
0,078
hOX40L
GFP
mo-DC Humano
MVAΔC7-hFlt3L-TK-
MVAΔC7-hFlt3L-hOX40L
11,4
21,4
6,04
54,5
39,2
28,0
18,8
20,6
hOX40L
GFP

FIG. 16A

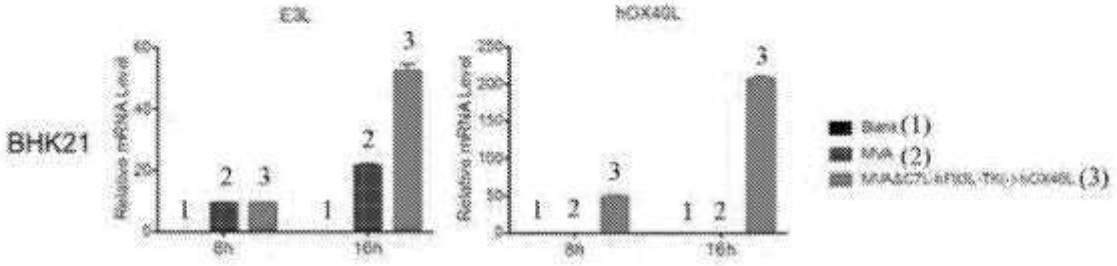


FIG. 16B

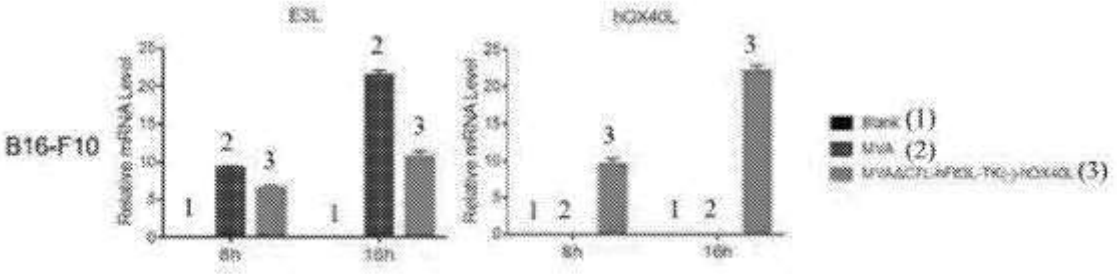


FIG. 17


72 genes selecionados
Modificar iniciadores para cada gene
Genes PCR fora do genoma vaccinia
Em 96 cavidades de placa
Adicionar adaptadores para as extremidades do PCR
Extração por gel
Clonagem de porta de entrada
Inserir genes em pDONR™/ZEO
Verificado por sequenciamento
pDONR™/ZEO → pcDNA™3.2-DEST
Verificado por sequenciamento
Varredura

FIG. 18

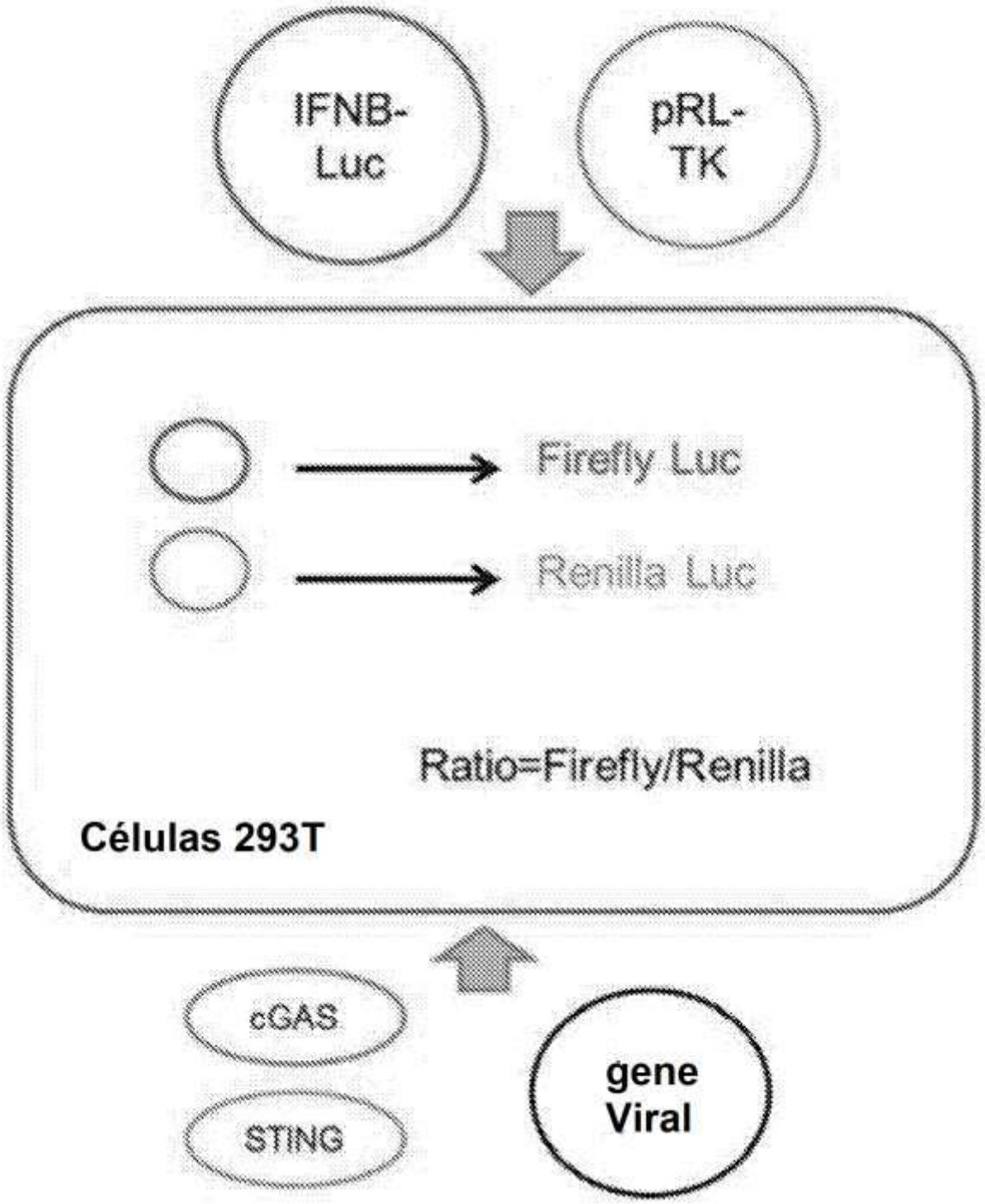

IFNB-Luc
pRL-TK
Firefly Luc
Renilla Luc
Ratio=Firefly/Renilla
Células 293T
cGAS
STING
gene Viral

FIG. 19A

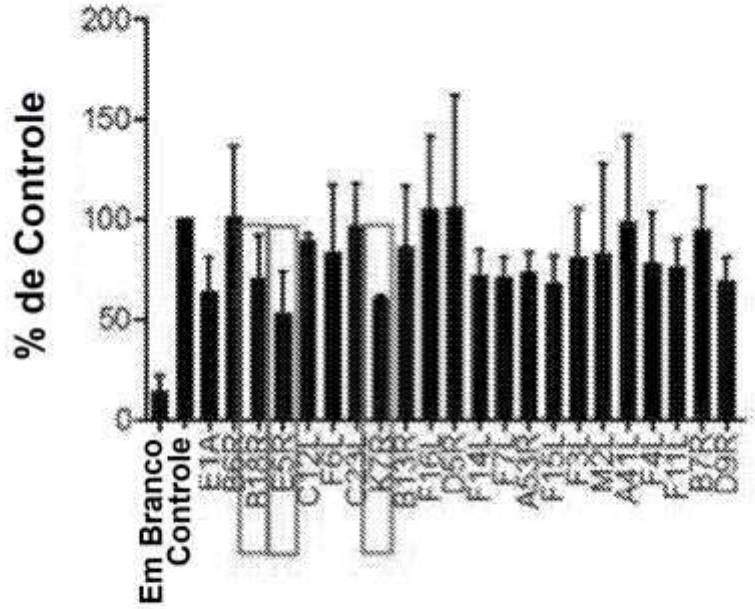


FIG. 19B

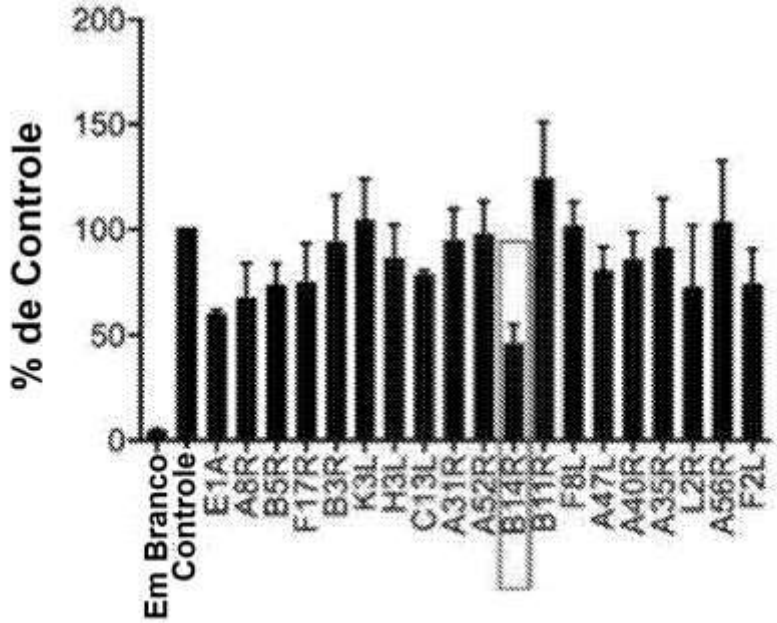


FIG. 19C

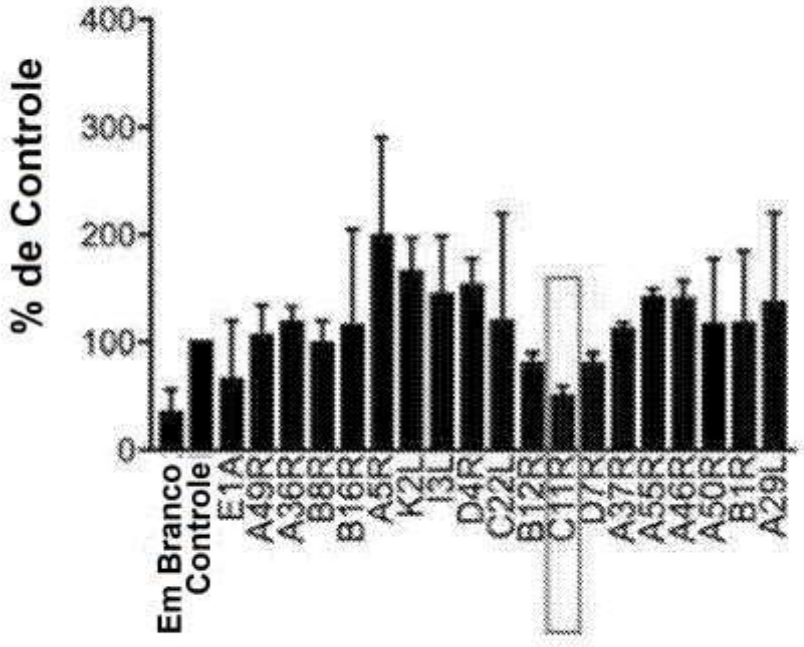

% de Controle
400
300
200
100
0
Em Branco
Controle
E1A
A49R
A36R
B8R
B16R
A5R
K2L
I3L
D4R
C22L
B12R
C11R
D7R
A37R
A55R
A46R
A50R
B1R
A29L

FIG. 20A

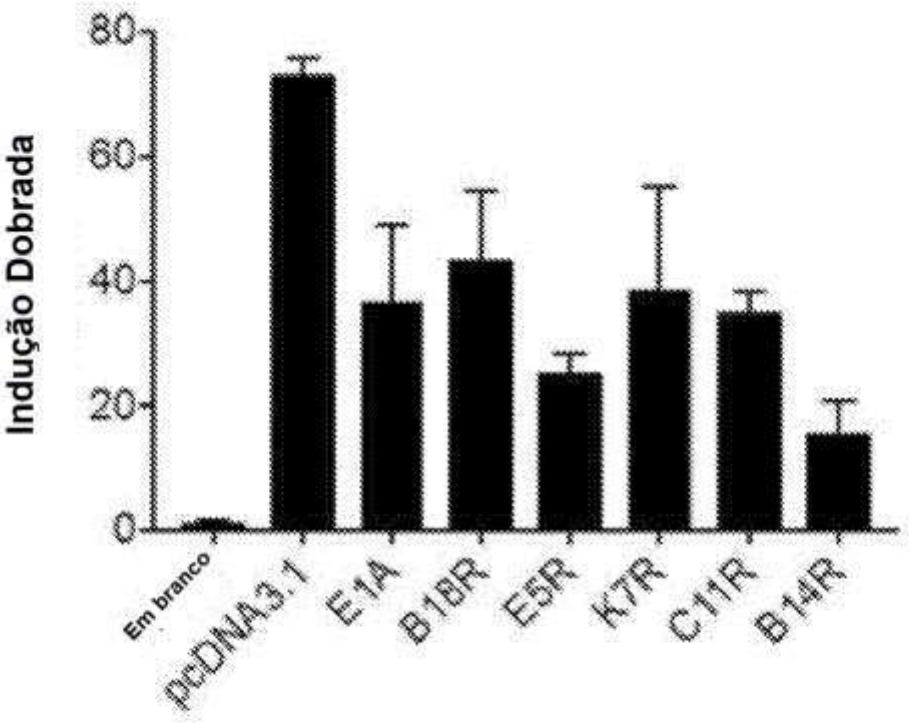


FIG. 20B

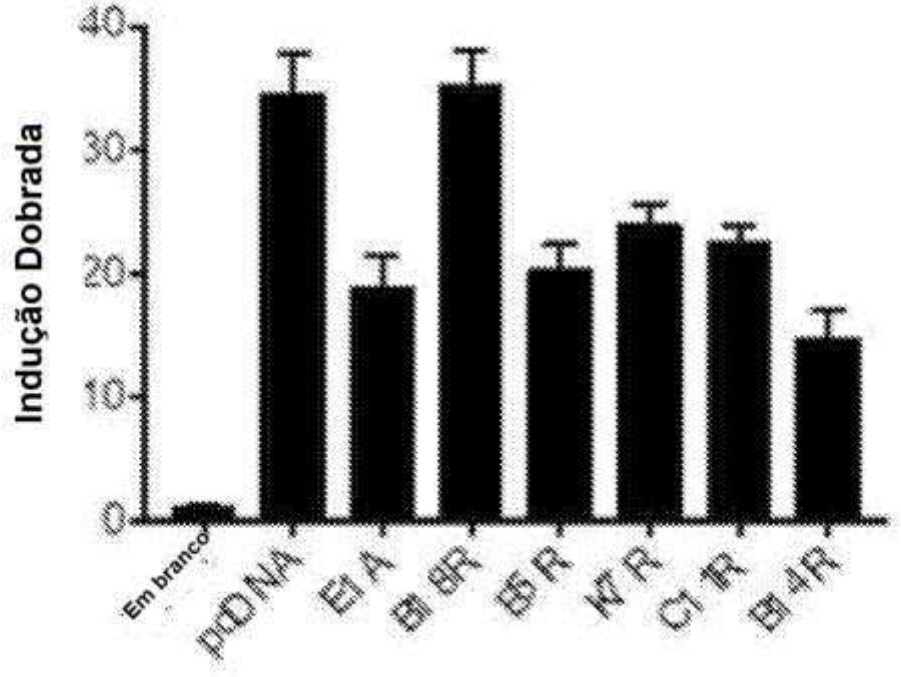


FIG. 20C

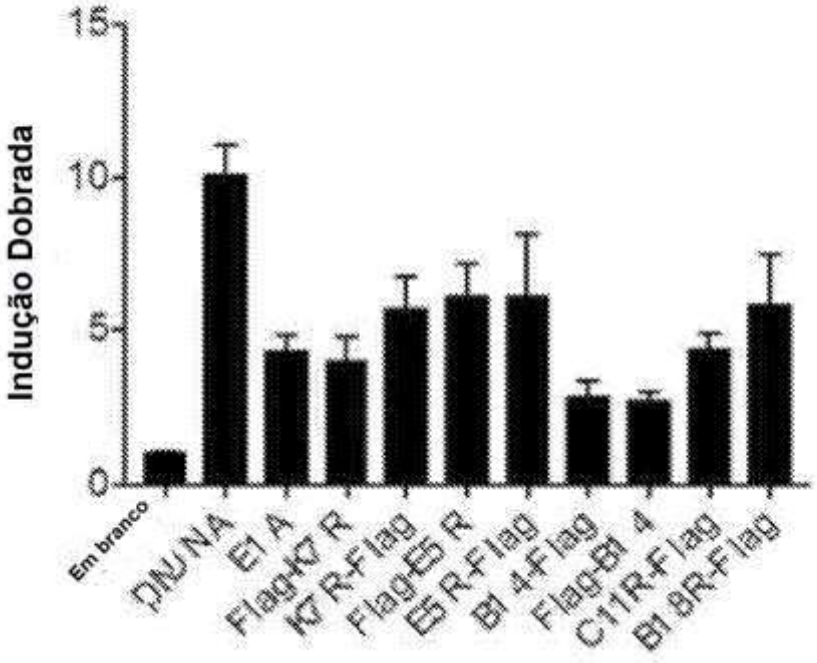

Indução Dobrada
15
10
5
0
Em branco
DNA
E1A
Flag-KD R
KD R-Flag
Flag-E5 R
E5 R-Flag
B1 4-Flag
Flag-B1 4
C11R-Flag
B1 8R-Flag

FIG. 20D

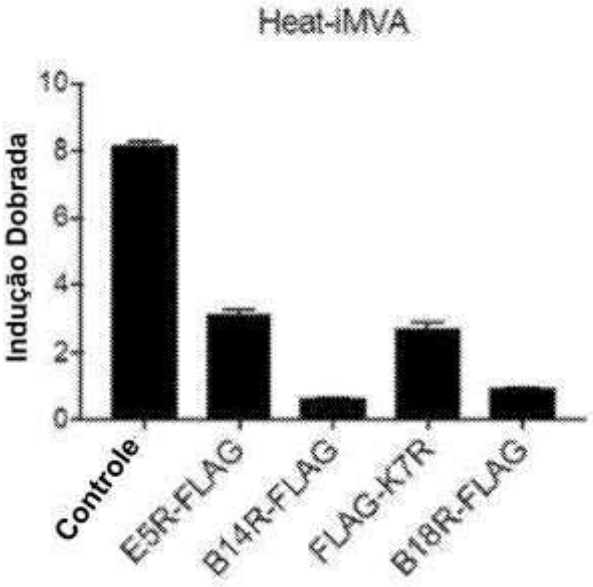


FIG. 20E

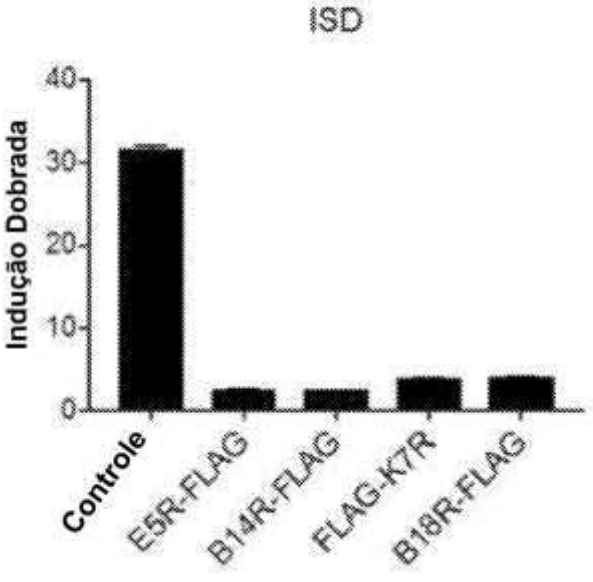


FIG. 21

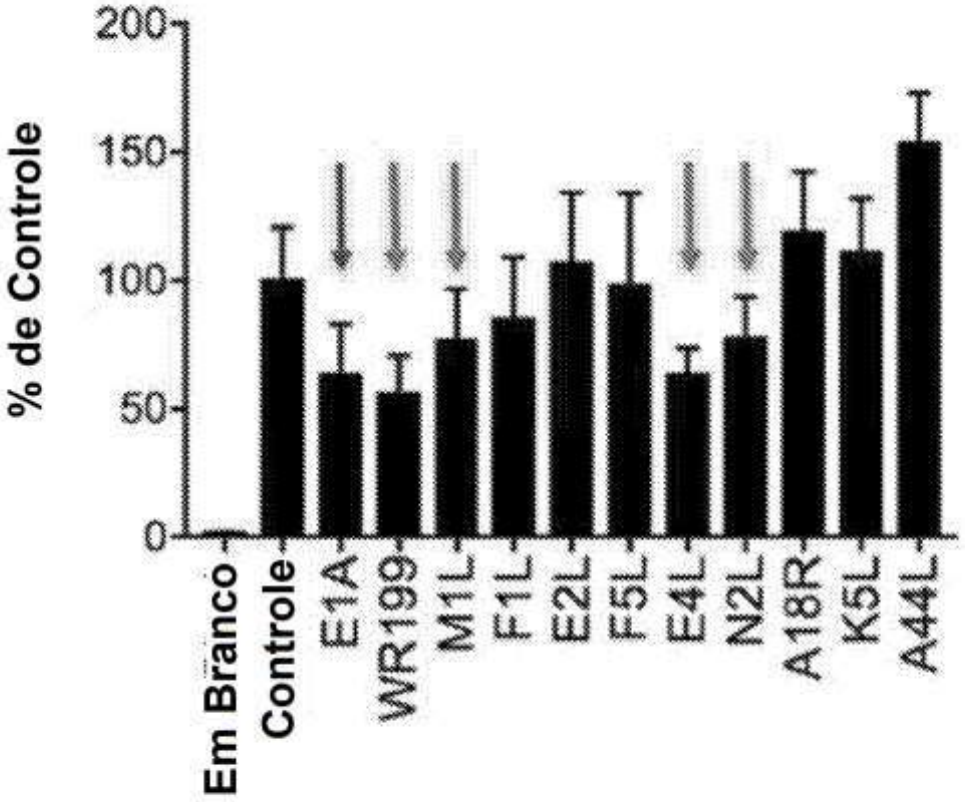

% de Controle
200
150
100
50
0
Em Branco
Controle
E1A
WR199
M1L
F1L
E2L
F5L
E4L
N2L
A18R
K5L
A44L

FIG. 22

Cepa Ankara de vírus vaccinia, sequência de genoma completo (GenBank nº de acesso U94848.1; SED ID NO: 1)

```
   1 gtaagattaa attaattata aaatttatgta tataatatta attataaaat tatgtatatg
  61 atttactaac tttagttaga taaattaata atacataaat tttagtatat taatattata
 121 aattaataat acataaattt tagtatatta atattatatt ttaaatattt atttagtgtc
 181 tagaaaaaaa tgtgtgacca acgaccgtag gaaactctag agggtaagaa aaatcaatcg
 241 ctttatagag accatcagaa agaggtttaa tatttttgtg agaccatcga aggagaaaga
 301 gataaaactt ttttacgact ccatcagaaa gaggtttaat attttgtga gaccatcgaa
 361 gagagaaaga gataaaactt ttttacgact ccatcagaaa gaggtttaat attttgtga
 421 gaccatcgaa gagagaaaga gataaaactt ttttacgact ccatcagaaa gaggtttaat
 481 attttgtga gaccatcgaa ggagaaagag ataaaacttt tttacgactc catcagaaag
 541 aggtttaata tttttgtgag accatcgaag gagaaagaga taaaacttta ttacgactcc
 601 atcagaaaga ggtttaatat ttttgtgaga ccatcgaagg agaaagagat aaaacttttt
 661 tacgactcca tcagaaagag gtttaatatt tttgtgagac catcgaagag agaaagagat
 721 aaaacttttt tacgactcca tcagaaagag gtttaatatt tttgtgagac catcgaagga
 781 gaaagagata aaacttttta acgactccat cagaaagagg tttaatattt ttgtgagacc
 841 atcgaagaga gaaagagaat aaaaatattt tagtgaccac atcagaaaga ggtttaatat
 901 ttttgtgaga ccatcgaaga gagaaagaga taaaacttta ttacgactcc atcagaaaga
 961 ggtttaatat ttttgtgaga ccatcgaagg agaaagagat aaaacttttt tacgactcca
1021 tcagaaagag gtttaatatt tttgtgagac catcgaagag agaaagagat aaaacttttt
1081 tacgactcca tcagaaagag gtttaatatt tttgtgagac catcgaagag agaaagagat
1141 aaaacttttt tacgactcca tcagaaagac catcgaagag agaaagagaa agagatagtt
1201 agtctagata ttttttcttag tacaaaagtc aatgttttaa aatatatgga caagaatttg
1261 tctgtataaa aacttgtgtg aaatttgtta ccaaagaaaa aatgtgagca gtatccccta
1321 catggatttt actagatcat ttatatacca aaaaatatta tacgatctac gttttattat
1381 atgattttaa cgtgtaaatt ataaacatta ttttatgata tacaattgtc tggtaaccta
1441 gatgggcata gggatgagt atatgttgtt ggacgttatt gtttaagaaa tagttgatgc
1501 atcagaaaga ggtttaatat ttttgtgaga ccatcgaaga gagaaagaga taaaacttta
1561 ttacgactcc atcagaaaga ggtttaatat ttttgtgaga ccatcgaaga gagaaagaga
1621 taaaacttta ttatgactcc attgaagaga gaatgagaat aaaaatattt tagtgacacc
1681 atcagaaaga ggtttaatat tttttatgag accatcaaag agagaaagag aataaaaata
1741 ttttatgact ccattgaaga gagaaagaga aaatgagaat aaaaatattt tagtgacacc
1801 atcagaaaga ggtttaatat tttttatgag accatcaaag agagaaagag aataaaaata
1861 tttttgtaaa actttttta tgagaccatc aaagagagaa agagaataaa aatatttttg
1921 taaaactttt tttatgagac catcaaagag agaaagagaa taaaaatatt tttgtaaaac
1981 ttttttatg agaccatcaa agagagaaag agaataaaaa tatttttgta aaacttttt
2041 tatgagacca tcaaagagag aaagagaata aaaatatttt tgtaaaactt ttttatgag
2101 accatcaaag agagaaagag aataaaaata ttttttgtaaa actttttta tgagaccatc
2161 aaagagagaa agagaataaa aatatttttg taaaactttt tttatgagac catcaaagag
2221 agaaagagaa taaaaatatt ttatgactcc attgaagaga gaaagagaat aaaaatattt
2281 tagtgacacc atcagaaaga ggtttaatat ttttgtgaga ccatcgaaga gagaaagaga
2341 ataaaaatat tttatgactc cattgaagag agaaagagaa taaaaatatt ttagtgacac
2401 catcagaaag aggtttaata ttttttatga gaccatcaaa gagagaaaga gaataaaaat
2461 attttgtaa aacttttttt atgagaccat caaagagaga aagagaataa aaatatttttt
2521 gtaaaacttt ttttatgaga ccatcaaaga gagaaagaga ataaaaatat ttttgtaaaa
2581 ctttttttat gagaccatca aagagagaaa gagaataaaa atatttttgt aaaacttttt
2641 ttatgagacc atcaaagaga gaaagagaat aaaaatattt ttgtaaaact ttttttatga
2701 gaccatcaaa gagagaaaga gaataaaaat attttatgac tccattgaag agagaatgag
2761 aataaaaata ttttagtgac accatcagaa agaggtttaa tatttttgtg agaccatcga
2821 agagagaaag agaataaaaa tattttatga ctccattgaa gagagaaaga gaataaaaat
2881 attttagtga caccatcaga aagaggttta atatttttta tgagaccatc aaagagagaa
2941 agagaataaa aatatttttg taaaactttt tttatgagac catcaaagag agaaagagaa
3001 taaaaatatt tttgtaaaac ttttttttatg agaccatcaa agagagaaag agaataaaaa
3061 tatttttgta aaacttttttt tatgagacca tcaaagagag aaagagaata aaaatatttt
3121 tgtaaaactt ttttatgag accatcaaag agagaaagag aataaaaata ttttgtaaa
3181 actttttta tgagaccatc aaagagagaa agagaataaa aatatttttg taaaactttt
3241 tttatgagac catcaaagag agaaagagaa taaaaatatt tttgtaaaac tttttatg
3301 agaccatcaa agagagaaag agaataaaaa tattttatga ctccattgaa gagagaatga
3361 gaataaaaat attttagtga caccatcaga aagaggttta atatttttgt gagaccatcg
3421 aagagagaaa gagaataaaa atattttatg actccattga agagagaatg agaataaaaa
```

FIG. 22 CONT'D

```
3481 tattttagtg acaccatcag aaagaggttt aatatttttt atgagaccat caaagagaga
3541 aagagaataa aaatattttt gtaaaacttt ttttatgaga ccatcaaaga gagaaagaga
3601 ataaaaatat ttttgtaaaa attataaaca ttattttatg atatacaatt gtctggtaac
3661 ctagatgggc ataggggatg ttgataagct cgacgagtat atgttgttgg acgttattgt
3721 ttaagaaata gttgatgcat cagaaagaga ataaaaaata ttttagtgag accatcgaag
3781 agagaaagag ataaaacttt tttacgactc catcagaaag aggtttaata ttttgtgag
3841 accatcgaag agagaaagag ataaaacttt tttacgactc catcagaaag aggtttaata
3901 tttttgtgag accatcgaag gagaaagaga taaaacttt ttacgactcc atcagaaaga
3961 ggtttaatat ttttgtgaga ccatcaaaga gagaaagaga ataaaaatat ttttgtaaaa
4021 cttttttta gagaccatca aagagagaaa gagaataaaa atatttttgt aaaacttttt
4081 ttatgagacc atcaaagaga gaaagagaat aaaaatattt ttgtaaaact ttttttatga
4141 gaccatcaaa gagagaaaga gaataaaaat atttttgtaa aacttttttt atgagaccat
4201 caaagagaga aagagaataa aaatatttta tgactccatt gaagagagaa tgagaataaa
4261 aatattttag tgacaccatc agaaagaggt ttaatatttt tgtgagacca tcgaagagag
4321 aaagagaata aaaatatttt atgactccat tgaagagaga atgagaataa aaatatttta
4381 gtgacaccat cagaaagagg tttaatattt tttatgagac catcaaagag agaaagagaa
4441 taaaaatatt tttgtaaaac tttttttatg agaccatcaa agagagaaag agaataaaaa
4501 tatttttgta aaacttttt tatgagacca tcaaagagag aaagagaata aaaatatttt
4561 tgtaaaactt tttttatgag accatcaaag agagaaagag aataaaaata tttttgtaaa
4621 actttttta tgagaccatc aaagagagaa agagaataaa aatatttat gactccattg
4681 aagagagaat gagaataaaa atattttagt gacaccatca gaaagaggtt taatattttt
4741 gtgagaccat cgaagagaga aagagaataa aaatatttta tgactccatt gaagagagaa
4801 agagaataaa aatattttag tgacaccatc agaaagaggt ttaatatttt ttatgagacc
4861 atcaaagaga gaaagagaat aaaaatattt ttgtaaaact ttttttatga gaccatcaaa
4921 gagagaaaga gaataaaaat attttatgac tccattgaag agagaatgag aataaaaata
4981 ttttagtgac accatcagaa agaggtttaa tattttttgtg agaccatcga agagagaaag
5041 agaataaaaa tattttatga ctccattgaa gagagaatga gaataaaaat attttagtga
5101 caccatcaga aagaggttta atatttttgt gagaccatcg aagagagaaa gagaataaaa
5161 atattttatg actccattga agagagaatg agaataaaaa tattttagtg acaccatcag
5221 aaagaggttt aatatttttt atgagaccat caaagagaga aagagaataa aaatatttt
5281 gtaaaacttt ttttatgaga ccatcaaaga gagaaagaga ataaaaatat ttttgtaaaa
5341 cttttttta gagaccatca aagagagaaa gagaataaaa atattttgt aaaacttttt
5401 ttatgagacc atcaaagaga gaaagagaat aaaaatattt ttgtgagacc atcaaagaga
5461 gaaagagaat aaaaatattt ttgtgagacc atcaaagaga gaaagagaat aaaaatattt
5521 ttgtgagacc atcaaagaga gaaagagaat aaaaatattt tatgactcca ttgaagagag
5581 aaagagaata aaaatatttt agtgacacca tcagaaagag gtttaatatt tttgtgagac
5641 catcgaagag agaaagagaa taaaaatatt ttatgactcc attgaagaga gaaagagaat
5701 aaaaatattt tagtgacacc atcagaaaga ggtttaatat tttttatgag accatcaaag
5761 agagaaagag aataaaaata ttttttatga gaccatcaaa gagagaaaga gaataaaaat
5821 attttatgag accatcaaag agagaaagag aataaaaata ttttttatga gaccatcaaa
5881 gagagaaaga gaataaaaat attttatgag accatcaaag agagaaagag aataaaaata
5941 ttttttatga gaccatcaaa gagagaaaga gaataaaaat attttgtat gagaccatca
6001 gaaagaggtt taatattttt gtgataccct gaaaggaaat aggaatagtg tcataatcgt
6061 atcacactat tgagacagaa aaagaagaag tcgcgagagg taacttttttg ttttgcaaac
6121 cggaatatag tgtccggtac actttttaa ttcgtggtgt gcctgaatcg ttcgattaac
6181 cctactcatc caatttcaga tgaatagagt tatcgattca gacacacgct ttgagttttg
6241 ttgaatcgat gagtgaagta tcatcggttg caccttcaga tgccgatccg tcgacatact
6301 tgacctcaag ttcagatgat tccttgcaca tgtctccgat acgaacgcta aactctagat
6361 tcttgacaca ttttgtatcg acgatcgttg aaccgatgat atcttcgtaa ctcactttct
6421 tatgagagat gttagacccg agtactggat gggtcttgat gtcgctgtct ttctcttctt
6481 cgctacatct gatgtcgata gacacctcac agtctttcca tcagcggatt ctgagatgga
6541 tttaatctga ggacatttgg tgaatccaaa gttcattctc agacctccac cgatgatgga
6601 gtaataagtg gtaggaggat ctacatcctc gactgattcc acctcgggat ctggatctga
6661 ctcggactct gtaatttccg ttacggattg gcaaatctta tcatcggtcg gtgtttggtc
6721 ttgctttgtg actttgataa taacatcgat tcccatatga tgtttgtttt cttcttccgt
6781 acacgatgag gatgattgct gaagactggc aggcacatgc atgccagtac gatatattgt
6841 ttcatgattg ctattgattg agtactgttc tttatgattc tacttcctta ccgtgcaata
6901 aattagaata tattttctac ttttacgaga aattaattat tgtatttatg ggtgaaaaac
6961 ttactataaa aagcgggtgg gtttggaatt agtgatcagt ttatgtatat cgcaactacc
7021 gggcatatgg ctacattacc cacatgataa gagattgtat cagtttcgta gtcttgagta
7081 ttggtattac tatatagtat atagatgtcg aggctagagt tactgtctcc gaatgcggca
7141 tgatagtatc attctttgct ttcgttaact gtttggagga agaatctttg ttattgcatt
```

FIG. 22 CONT'D

```
 7201 taatctcgaa attcagagtg cacacctttc tcctgtaaag aaacctgaag tcgctacctt
 7261 attaagaaga cgggatcgca gtctttatga ttcatagtaa tagttagttc cgacgttgag
 7321 atggattcgc tgagaccggt agtggtcgtc cgagtacacg atgtgtcgtt aactggatac
 7381 agqttaattt ccacatcgat atagttaaag gtatttctgg gtacgggttc gcatttatct
 7441 gcggaagaga cggtgtgaga atatgttccg agaccacacg gagaacagat gacgtctccg
 7501 gatactccgt atcctattcc acattttgtt tgggaaacac atgccttgca tccatgatcg
 7561 ggagagcatt cacagattct attgtgagtc gtgttacacg atcgcgtcga cattgttgac
 7621 agaaacgtga ccttcattct taccgtcgtc cataaatacg ttaggtatgt accacatact
 7681 gtcgcgaacg atgcgtccat ctcataatga tttacttttt cataattaaa gatgtgaaag
 7741 aaaaccgaac aatatatttt tttagtaatg tttatgcgag acatataaaa taaactccgt
 7801 gtttatgatg ccggtaaatg tttttatcat cttggacgga atcgattttg taatatgcca
 7861 tggaaacagg acattatcac tccatgataa attatttaat ggagtcgatc ctctcattgt
 7921 tctttgcgta tctcaatctg tggcgtttgc ttcgtttaaa taatatatca aacatggaga
 7981 cgcctgatat gtaggcattc ttcattctat taatgtctgc tctatagcgc tttagttcct
 8041 tatgacgacc ggcgatatca tacttacttt agaaggaaaa tcatcatcta ggattaaggc
 8101 gtatctgata caggcgaata atggttcagg atatagatag cgtatatctc tattaaatgc
 8161 gtcaatcata gtctctagag tgggatggta actcagtaat aaatcaacta gctttctttt
 8221 ggtaactgct tttctggatg gccgtattga ttatcgagcg tgacactcgc tccatattcc
 8281 aataaccgct ttgcaaattg tatattattg acatcgaccg cgtaatatag tagagttatc
 8341 gatcatatct atatcatcca tgtacttgct tagtatatca aatacatctt cataacagtg
 8401 atacccgcaa ttattaaatc tcgataatat cagaccgtac atacatagac ggccattgtt
 8461 agatatgtga tttacagccg cgtgtccata tttccacgaa taaaccttac gacgtttaca
 8521 tcgacgagat tattattaac aaagttgttg tccgtcgtct tatccaacat gcattgaatg
 8581 ataggtatac ttaccatatc gccgtaatgt aagtagttta tcagtatggc ttgtacgatg
 8641 gattcatcct gttgtctaaa tctctttaga atgttatcga tgatgtagtg gttatattct
 8701 ctggaatcgt acgaagtaat actacgcatt acgtcgacaa gagtatgacg tctctcaata
 8761 agaagattaa cgatttccat gtctacatta tatggggtta ctctaaatcg cttgtttaga
 8821 taatacgcct ctaatatagg gctgacgtcg tatactctac acgtgtccac atcctttatt
 8881 aataatctct atatctatgg ttgagcaaga ccagtagtat tggatggaaa cattgttatc
 8941 gatcaaacat ttaattacat ccttggatag agattctcta tgagacgata tatagtaatg
 9001 aagagagttc ttacacatat cactgttgta catacaggta cgaaatacgt aaccggtgct
 9061 gtaacattct gatttaagaa gccatagcaa tacttctggt ctcggattag gcgtcgttac
 9121 gtatatatcc accaatccga gaccattgat tgcataattc gtattcttgg acggacgtat
 9181 ccgtttatcc acaattaggt attttagcag acgtaagtcg aaatcattta tattcgactt
 9241 gagttcgtta gaggaattcg aatagctgga tatcagtaga tgcacaatct gagattttac
 9301 gtatctatgc ttactgtatg ctcctagcgg agttaatcct tcgttgtttc tacaaagtct
 9361 ctcgactccg cgaggagagta acagtcgaac aattcttaatg tctgtatcgc atttattgga
 9421 gacgtaacaa tgtagcgcat tgttcctcg tctatctata tgttttgata agttgtgaca
 9481 cgtttcaatt tctagtttta ttttttgta cgtcacatct tcatccagta gacgacatag
 9541 aatacatgtg caatccatag ctattctggt gctaattatt cctcataaga tgataaaaag
 9601 tgtagtgaga gagcatgaag gagatttagt atttagcagt gcggatatga tccaagaggg
 9661 tgagatagtc gttctcgttc agaatctttc gcagcataag tagtatgtcg atatacttat
 9721 cgttgaagac tcttccagag acgatagctg attgagtaca aagtccaatg attgcacgaa
 9781 gttcttcggc ggttttcatg gagtcatttc tgatgaaaca tttaatgatc taaatttcag
 9841 tttatgtttg taccccgtat tcatacttaa caaattggta ttacatacca ttaataatgc
 9901 aagcataaaa aatcgttagt agatgtttct aaatataggt tccgtaagca aagaatataa
 9961 gaatgaagcg gtaatgataa aatcaatcgt tatctaaaat gatcatacta atttatttta
10021 ttctattata ttaacacata catttttaac agcaacacat tcaatattgt attgttattt
10081 ttatattatt tacacaatta acaatatatt attagtttat attactgaat taataatata
10141 aaattcccaa tcttgtcata aacacacact gagaaacagc ataaacacaa aatccatcaa
10201 aaatgttgat aaattatctg atgttgttgt tcgctgctat gataatcaga tcattcgccg
10261 atagtggtaa cgctatcgaa acgacatcgc cagaaattac aaacgctaca acagatattc
10321 cagctatcag attatgcggt ccagagcgag atggatattg tttacacggt gactgtatcc
10381 acgctagaga tatcgacggt atgtattgta gatgctctca tggttataca ggcattagat
10441 gtcagcatgt agtattagta gactatcaac gttcagaaaa accaaacact acaacgtcat
10501 atatcccatc tcccggtatt atgcttgtat tagtaggcat tattattatt acgtgttgtc
10561 tattatctgt ttataggttc actcgacgaa ctaaactacc tatacaagat atggttgtgc
10621 cataatttct ataaattttt tttatgagta ttttacaaa aatgtataaa gtgtatgtct
10681 tatgtatatt tataaaaatg ctaaatatgc gatgtatcta tgttattttgt atttatctaa
10741 acaatacctc tacctctaga tattatacaa aaatttttta tttcggcata ttaaagtaaa
10801 atctagttac cttgaaaatg aatacagtgg gtggttccgt atcaccagta agaacataat
10861 agtcgaatac agtatccgat tgagattttg catacaatac tagtctagaa agaaatttgt
```

FIG. 22 CONT'D

```
10921 aatcatcttc tgtgacggga gtccatatat cxgtatcatc gtcccatgct atattcctgt
10981 tatcatcatt agttaatgaa aataactctc gtgcttcaga aaagtcaaat attgtatcca
11041 tacatacatc tccaaaacta tcgcttatac gtttatcttt aacgatacct atacctagat
11101 ggttatttac taacagacat tttccagatc tattgactat aactcctata gtttcacat
11161 caaccaagta atgatcatct attgttatat aacaataaca taactctttt ccgtttttat
11221 cagtatgtat atctatatca acgtcgtcgt tgtagtgaat agtagtcatt gatctattat
11281 atgaaacgga tatgtctaga acggcaattg ttttacgtcc agttaacact ttcgttgatt
11341 taaagtctag agtctttgca aacataatat ccttatccga ctttatattt cctgtagggt
11401 ggtataattt tatttgcct ccacatatcg gtgtttccaa atatattact agacaatatt
11461 ccatatagtt attagttaag ggtacccaat tagaacacgt acgcttatta tcatcatttg
11521 gatcgtattt cataaaagtt attgtactat cgatgtcaac acattctaca tttttcaatc
11581 gtctatatag tatttttctg atattttcta taatatcaga attgtcttcc atcggaagtt
11641 gtatactatc ggaatcagtt acatgtttaa ataattctct gatgtcattc cttatacaat
11701 caaattcatt attaaacagt ttaatagtct gtagaccttt atcgtcgtaa atatccattg
11761 tcttattagt tacgcttatt tttatgtgtt tttacgttgc tttattatat tttataagaa
11821 tgattgtttg acgaatcacg agaactatta agacacatta ttaggtatat attataaaaa
11881 agtttttgat tacgatgtta taagaggaaa gaggacacat taacatcata catcaattaa
11941 ctacattctt ataacatcgt aatcaaaaga attgcaattt tgatgtataa caactgtcaa
12001 tgggttatgg aattgtatat tacatattat acggtatgtt ggtaacgaca aataccgatc
12061 ggtaattgtc tgccggtgta atagaattat atatatctat ctattacacc ggccttgtat
12121 acataataat aagttgtggt agtatgatct ccatatttat aatttaggac tttgtattca
12181 gttttttgg aatcataaaa aataaaaaaa agttttacta atttaaaatt atttacattt
12241 ttttcactgt ttagtcgcgg atatggaatt cgatcctgcc aaaatcaata catcatctat
12301 agatcatgta acaatattac aatacataga tgaaccaaat gatataagac taacagtatg
12361 cattatcaca aaaataaatc cacatttggc taatcaattt cgggcttgga aaaaacgtat
12421 cgccggaagg gactatatga ctaacttatc tagagataca ggaatacaac aatcaaaact
12481 tactgaaact gtcaaaaaaa tagaaacata tatggtctat atatacacta caatttagtt
12541 attaattgga taaccgatgt gattatcaat caatattaag aaggttggta aattggtaca
12601 tagctaataa tacctatacA cccaataata caacaaccat ttctgagttg gatatcatca
12661 aaatactgga taaatacgag gacgtgtata gagtaagtaa agaaaaagaa tgtgaaattt
12721 gctatgaagt tgtttactca aaacgataga tacttttggtt tattggattc gtgtaatcat
12781 atattttgca taacatgcat caatatatgg catagaacac gaagagaaac cggtgcgtcg
12841 gataattgtc ctatatgtcg tacccgtttt agaaacataa caatgagcaa gttaactaat
12901 aaataaaaag tttaatttgt tgacgacgta tgtcgttatt ttttctcgta taaaagatta
12961 atttgattct aatataatct ttagtattgg ataaatatca attcaaatta attccattag
13021 attatatcat aaataaaaat agtagcacgc actacttcag ccaaatattc ttttttgaaa
13081 cgccatctat cgtagtgagg acacaagtga acctataatg agcaaattta ttagtatcgg
13141 ttacatgaag gactttacgt agagtggtga ttccactatc tgtggtacga acggtttcat
13201 cttctttgat gccatcacca agatgttcta taaacttggt atcctttgcc aaccaataca
13261 tatagctaaa ctcaggcata tgttccacac atcctgaaca atgaaattct ccagaagatg
13321 ttacaatgtc tagatttgga catttggttt caaccgcgtt aacatatgag tgaacacacc
13381 catacatgaa agcgatgaga aatagcattt tcatcttgcc aaaatatcac tagaaaaaat
13441 ttatttatca attttaaagg tataaaaaat acttattgtt gctcgaatat tttgtatttg
13501 atggtatacg gaagattaga aatgtaggta ttatcatcaa ctgattctat ggttttatgt
13561 attctatcat gtttcactat tgcgttggaa ataatatcat atgcttccac atatatttta
13621 ttttgtttta actcataata ctcacgtaat tctggattat tgacatatct atgaataatt
13681 ttagctccat gatcagtaaa tattaatgag aacatagtat taccacctac cattatttct
13741 ttcatctcat tcaattctta attgcaaaga tctatataat cattatagcg ttgacttatg
13801 gactctggaa tcttagacga tgtacagtca tctataatca tggcatattt aatacattgt
13861 tttatagcat agtcgttatc tacgatgtta gatatttctc tcaatgaatc aatcacacaa
13921 tctaatgtag gtttatgaca taatagcatt ttcagcagtt caatgttttt agattcgttg
13981 atggcaatgg ctatacatgt atatccgtta tttgatctaa tgttgacatc tgaaccggat
14041 tctagcagta aagatactag agattgttta ttatatctaa cagccttgtg aagaagtgtt
14101 tctcctcgtt tgtcaatcat gttaatgtct ttaagataag gtaggcaaat gtttatagta
14161 ctaagaattg ggcaagcata agacatgtca caaagaccct ttttgtatgt ataagtgtaa
14221 aaattataac attcatagtt ggatttacat aggtgtccaa tcgggatctc tccatcatcg
14281 agataattga tggcatctcc cttcctttt tagtagatat ttcatcgtgt aagaatcaat
14341 attaatattt ctaaagtatc cgtgtatagc ctctttattt accacagttc catattccac
14401 tagagggata tcgccgaatg tcatatactc aattagtata tgttggagga catccgagtt
14461 cattgttttc aatatcaaaa agatggtttc cttatcattt ctccatagtg gtacaatact
14521 acacattatt ccgtgcggct ttccattttc caaaaacaat ttgaccaaat ctacatcttt
14581 attgtatcta taatcactat ttagataatc agccataatt actcgagtgc aacatgttag
```

FIG. 22 CONT'D

```
14641 atcgtctata tatgaataag ccgtgttatc tattcctttc attaacaatt taacgatgtc
14701 tatatctata tgagatgact taatataata ttgaagagct gtacaatagt ttttatctat
14761 aaaagacggc ttgattccgt gattaattag acatttaaca acttccggac gcacatatgc
14821 tctcgtatcc gactctgaat acagatgaga gatgatatac agatgcaata cggtaccgca
14881 atttcgtagt tgataatcat catacccgta tcagtactcg tcctcataaa gaacactgca
14941 gccatttttct atgaacaaat caataatttc aggaacagga tcatctgtca ttacataatt
15001 ttctataact gaacgatggt tttcacattt aacactcaag tcaaatccat gttctaccaa
15061 caccttttatc aagtcaacgt ctacattttt ggatttcata tagctgaata tattaaagtc
15121 atttatgttg ctaaatccag tggcttctag tagagccatc gctatatcct ttaactttaa
15181 catgtctact atttgtgtat tcttctaatg gggtagctgt ctccaatttt tgcgtaatgg
15241 attagtgcca ctgtctagta gtagtttgac gacctcgaca ttattacaat gctcattaaa
15301 aaggtatgcg tgtaaagcat tattcttgaa ttggttcctg gtatcattag gatctctgtc
15361 tctcaacatc tgtttaagtt catcgaggagc cacctcctca tttbccaaat agtcaaacat
15421 tttgactgaa tgagctactg tgaactctat acacccacac aactaatgtc attaaatatc
15481 atgtcaaaaa cttgtacaat tattaataaa aataatttag tgtttaaatt ttaccagttc
15541 cagattttac acctccgtta accccacttt ttacaccact ggacgatcct cctccccaca
15601 ttccaccgcc accagatgta taagttttag atccttttatt actaccatca tgtccatgga
15661 taaagacact ccacatgccg ccactaccc ctttagaaga catattaata agacttaagg
15721 acaagtttaa caataaaatt aatcacgagt accctactac caacctacac tattatatga
15781 ttatagtttc tatttttaca gtaccttaac taaagtctct agtcacaaga gcaatactac
15841 caacctacac tattatatga ttatagtttc tatttttata ggaacgcgta cgagaaaatc
15901 aaatgtctaa tttctaacgg tagtgttgat aaacgattat cgtcaatgga tacctcctct
15961 atcatgtcgt ctattttctt actttgttct attaacttat tagcattata tattatttga
16021 ttataaaact tatattgctt attagcccaa tctgtaaata tcggattatt aacatatcgt
16081 ttctttgtag gtttatttaa catgtaatc actgtaagca tgtccgtacc atttatttta
16141 atttgacgca tatacgcaat ttctttttcg cagtcggtta taaattctat atatgatgga
16201 tacatgctac atgtgtactt ataatcgact aatatgaagt acttgataca tattttcagt
16261 aacgatttat tattaccacc tatgaataag tacctgtgat cgtctaggta atcaactgtt
16321 ttcttaatac attcgatggt tggtaattta ctcagaataa tttccaatat cttaatatat
16381 aattctgcta tttctgggat atatttatct gccagtataa cacaaatagt aatacatgta
16441 aacccatatt ttgttattat attaatgtct gcgccattat ctattaacca ttctactagg
16501 ctgacactat gcgacttaat acaatgataa agtactacac atccatgttt atatcataca
16561 tatacggctt acaaagtttt agtatcgata acacatccaa ctcacgcata gagaaggtag
16621 ggaataatgg cataatattt attaggttat catcattgtc attatctaca actaagtttc
16681 catttttaa aatatactcg acaacttag gatctctatt gccaaatttt tgaaaatatt
16741 tatttatatg cttaaatcta tataatgtag ctccttcatc aatcatacat ttaataacat
16801 tgatgtatac tgtatgataa gatacatatt ctaacaatag atcttgtata gaatctgtat
16861 atcttttaag aattgtggat attattacgt aaactattac acaattctaa aatataaaac
16921 gtatcacggt cgaataatag ttgatcaact atataattat cgattttgtg atttttcttc
16981 ctaaactgtt tacgtaaata gttagataga atattcatta gttcatgacc actatagtta
17041 ctatcgaata acgcgtcaaa tatttcccgt ttaatatcgc atttgtcaag ataataatag
17101 agtgtggtat gttcacgata agtataataa cgcatctctt tttcgtgtga aattaaatag
17161 tttattacgt ccaaagatgt agcataacca tottgtgacc tagtaataat ataataatag
17221 agaactgttt tacccattct atcatcataa tcagtggtgt agtcgtaatc gtaattgtct
17281 aattcatcat cccaattata atattcacca gcacgtctaa tctgttctat tttgatcttg
17341 tatccatact gtatgttgct acatgtaggt attcctttat ccaataatag tttaaacaca
17401 tctacattgg gatttgatgt tgtagcgtat ttttctacaa tattaatacc atttttgata
17461 ctatttattt ctatacottt cgaaattagt aatttcaata agtctatatc gatgttatca
17521 gaacatagat attcgagtat atcaaaatca ttgatatttt tatagtcgac tgacgacaat
17581 aacaaaatca caacatcgtt tttgatatta ttatttttct tggtaacgta tgcctttaat
17641 ggagtttcac catcatactc atataatgga tttgcaccac tttctatcaa tgattgtgca
17701 ctgctggcat cgatgttaaa tgttttacaa ctatcataga gtatcttatc gttaaccatg
17761 attggttgtt gatgctatcg catttttttgg tttctttcat ttcagttatg tatggattta
17821 gcacgtttgg gaagcatgag ctcatatgat ttcagtactg tagtgtcagt actattagtt
17881 tcaataagat caatctctag atctatagaa tcaaaacacg ataggtcaga agataatgaa
17941 tatctgtagg cttcttgttg tactgtaact tctcgttttg ttagatgttt gcatcgtgct
18001 ttaacatcaa tggtacaaat tttatcctcg ctttgtgtat catattcgtc cctactatas
18061 aattgtatat tcagattatc atgagatgtg tatacgctaa cggtatcaat aaacggagca
18121 caccatttag tcataaccgt aatccaaaaa tttttaaagt atatcttaac gaaagaagtt
18181 gtgtcattgt ctacggtgta tggtactaga tcctcataag tgtatatatc tagagtaatg
18241 tttaatttat caaatggttg ataatatgga tcctcatgac aatttccgaa gatggaaatg
18301 agatatagac atgcaataaa tctaattgcg gacatggtta ctccttaaaa aaatacgaat
```

FIG. 22 CONT'D

```
18361 aatcaccttg gctatttagt aagtgtcatt taacactata ctcatattaa tccatggact
18421 cataatctct atacgggatt aacggatgtt ctatatacgg ggatgagtag ttttcttctt
18481 taacttttata ctttttacta atcatattta gactgatgta tgggtaatag tgttttaaaga
18541 gttcgttctc atcatcagaa taaatcaata tctctgtttt tttgttatac agatgtatta
18601 cagcctccata tattacgtaa tagaacgtgt catctacctt attaactttc accgcatagt
18661 tgtttgcaaa tacggttaat cctttgacct cgtcgatttc cgaccaatct gggcgtataa
18721 tgaatctaaa ctttaatttc ttgtaatcat tcgaaataat ttttagtttg catccgtagt
18781 tatccccttt atgtaactgt aaatttctca acgcgatatc tccattaata atgatgtcga
18841 attcgtgctg tatacccata ctgaatggat gaacgaatac cgacggcgtt aatagtaatt
18901 tacttttttca tctttacata ttgggtacta gttttactat cataagttta taaattccac
18961 aagctactat ggaataagcc aaccatctta gtataacaca catgtcttaa agtttattaa
19021 ttaattacat gttgttttat atatcgctac gaatttaaac agagaaatca gtttaggaaa
19081 aaaaaatatc tatctacatc atcacgtctc tgtattctac gatagagtgc tactttaaga
19141 tgagacatat ccgtgtcatc aaaaatatac tccattaaaa tgattattcc ggcagcgaac
19201 ttgatattgg atatatcaca acctttgtta atatctacga caatagacag cagtcccatg
19261 gttccataaa cagtgagttt atctttcttt gaagagatat tttgtagaga tcttataaaa
19321 ctgtcgaatg acatcgcatt tatatcttta gctaaatcgt atatgttacc atcgtaatat
19381 ctaaccgcgt ctatcttaaa cgtttccatc gctttaaaga cgtttccgat agatggtctc
19441 atttcatcag tcatactgag ccaaaaaata taatcgtgta taacatcttt gatagaatca
19501 gactctaaag aaaacgaatc ggctttatta tacgcattca tgataaactt aatgaaaaat
19561 gtttttcgtt gtttaagttg gatgaatagt atgtcttaat aattgttatt atttcattaa
19621 ttaatatttta gtaacgagta cactctataa aaacgagaat gacataacta gttatcaaag
19681 tgtctaggac gcgtaatttt catatcgtat agatcctgta agcattgtct gtattctgga
19741 gctatttttct ctatatctaa tttctgaacg ttcaccaatg tctctagcca ctttggcact
19801 aatagcgatc attcgcttag cgtcttctat attattaact ggttgattca atctatctag
19861 caatggaccg tcggacagcg tcattctcat gttcttaatc aatgtacata catcgccgtc
19921 atctaccaat tcatccaaca acataagctt tttaaaatca tcattataat aggtttgatc
19981 gttgtcattt ctccaaagaa tatatctaat aagtagagtc ctcatgatta gttaacaact
20041 atttttatg ttaaatcaat tagtacaccg ctatgtttaa tacttattca tattttagtt
20101 tttaggattg agaatcaata caaaaattaa tgcatcatta attttagaaa tacttagttt
20161 ccacgtagtc aatgaaacat ttgaactcat cgtacaggac gttctccgtac aggacgtaac
20221 tataaaccgg tttatatttg ttcaagatag atacaaatcc gataacttct tttacgaatt
20281 ctacgggatc cactttaaaa gtgtcatacc gggttctttt tatttttta aacagattaa
20341 tggtgtgatg ttgattaggt cttttacgaa tttgatatag aatagcgttt acatattctc
20401 cataatggtc aatcgccatt tgttcgtatg tcataaattc tttaattata tgacactgtg
20461 tattatttag ttcatccttg ttcatcatta ggaatctatc caatatggca attatactag
20521 aactataggt gcgttgtata cacatattga tgtgtctgtt tatacaatcc atgctactac
20581 cttcgggtaa aattgtagca tcatatacca tttctagtac tttaggttca ttgttatcca
20641 ttgcagagga cgtcatgatc gcatcctaaa aaaatatatt attttratgt tattttgtta
20701 aaaataatca tcgaatacga atcatccagt ccactgaata gcaaaatctt tactatttttg
20761 gtatcttcca atgtggctgc ctgatgtaat ggaaattcat tctctagaag atttttcaat
20821 gctccagcgt tcaacaacgt acatactaga cgcacgttat tatcagctat tgcataatac
20881 aaggcactat gtccatggac atccgcctta aatgcatctt tgctagagag aaagctttte
20941 agctgcttag acttccaagt attaattcgt gacagatcca tgtctgaaac gagacgctaa
21001 ttagtgtata atttttgtca tattgcacca gaattaataa tatctctaat agatctgatt
21061 agtagataca tggctatcgc aaaacaacat atacacattt aataaaaata atatttatta
21121 agaaaattca gatttcacgt acccatcaat ataaataaaa taatgattcc ttacacogta
21181 cccatattaa ggagattcta ccttacccat aaacaatata aatccagtaa tatcatgtct
21241 gatgatgaac acaaatggtg tattaaattc cagttttica ggagatgatc tcgccgtagc
21301 taccataata gtagatgcct ctgctacagt tccttgttcg tcgacatcta tctttgcatt
21361 ctgaaacatt ttataaatat ataatgggtc cctagtcata tgtttaaacg acgcattatc
21421 tggattaaac atactaggag ccatcatttc ggctatcgac ttaatatccc tcttatttic
21481 gatagaaaat ttagggagtt taagattgta cactttattc cctaattgaa acgaccaata
21541 gtctaatttt gcagccgtaa tagaatctgt gaaatgggtc atattatcac ctattgccag
21601 gtacatacta atattagcat ccttatacgg aaggcgtacc atgtcatatt ctttgtcatc
21661 gattgtgatt gtatttcctt gcaatttagt aactacgttc atcatgggaa ccgttttcgt
21721 accgtactta ttagtaaaac tagcattgcg tgttttagtg atatcaaacg gatattgcca
21781 tatacctita aaatatatag tattaatgat tgcccataga gtattattgt cgagcatatt
21841 agaatctact acattagaca taccggatct acgttctact atagaattaa ttttattaac
21901 cgcatctcgt ctaaagttta atctatatag gccgaatcta tgatattgtt gataatacga
21961 cggtttaata cacacagtat tatctacgaa actttgataa gttagatcag tgtacgtata
22021 tttagatgtt ttcagcttag ctaatcctga tattaattct gtaaatgctg gacccagatc
```

FIG. 22 CONT'D

```
22081 tctttttctc aaatccatag tcttcaataa ttctattcta gtattacctg atgcaggcaa
22141 tagcgacata aacatagaaa acgaataacc aaacggtgag aagacaatat tatcatcttg
22201 aatatttttа tacgctacta taccggcatt ggtaaatcct tgtagacgat aggtagacgc
22261 tgaacacgtt aacgatagta tcaataacgc aatcatgatt ttatggtatt aataattaac
22321 cttatttttа tgttcggtat aaaaattatt gatgtctaca catcctttтg taattgacat
22381 ctatatatcc ttttgtataa tcaactctaa tcactttaac ttttacagtt ttccctacca
22441 gtttatccct atattcaaca tatctatcca tatgcatctt aacactctct gccaagatag
22501 cttcagagtg aggatagtca aaaagataaa tatatagagc ataatcattc tcgtatactc
22561 tgccctttat tacatcgccc gcattgggca acgaataaca aaatgcaagc atcttgttaa
22621 cgggctcgta aattgggata aaaattatgt ttttatatct attttattca agagaatatt
22681 caggaatttc tttttccggt tgtatctcat cgcagtatat atcatttgta cattgtttca
22741 tatttttтaa tagtttacac cttttagtag gactagtatc gtacaattca tagctgtatt
22801 ttgaattcca atcacgcata aaaatatctt ctaattgttg acgaagacct aatccatcat
22861 ccggtgtaat attaatagat gctccacatg tatccgtaaa gtaatttcct gtccaatttg
22921 aggtacctat ataggccgtt ttatcggtta ccatatattt ggcatggttt accctagaat
22981 acggaatggg aggatcagca tctggtacaa taaatagctt tacttctata tttatgtttt
23041 tagattttag catagcgata gatcttaaaa agtttctcat gataaacgaa gatcgttgcc
23101 agcaactaat caatagctta acggatactt gtctgtctat agcggatctt cttaattcat
23161 cttctatata aggccaaaac aaaattttac ccgccttcga ataaataata gggataaagt
23221 tcataacaga tacataaacg aatttactcg catttctaat acatgacaat aaagcggtta
23281 aatcattggt tctttccata gtacatagtt gttgcggtgc agaagcaata aatacagagt
23341 gtggaacacc acttacgtta atactaagag gatgatctgt attataatac gacggataaa
23401 agtttttcca attatatggt agatttgtaa ctccaagata ccagtatacc tcaaaaattt
23461 gagtgagatc cgctgccaag ttcctattat tgaagatcgc aatacccaat tctttgacct
23521 gagttagtga tctccaatcc atgttagcgc ttcctaaata aatatgtgta ttatcagata
23581 tccaaaattt tgtatgaaga actcctccta ggatatttgt aatatctatg tatcgtactt
23641 caactccggc catttgtagt ctttcaacat cctttaatgg tttgttagat ttattgacgg
23701 ctactctaac tcgtactcct cttttgggta attgtacaat ctcgtttaat attatcgtgc
23761 cgaaattcgt acccacttca tccgataaac tccaataaaa agatgatata tctagtgttt
23821 ttgtggtatt ggatagaatt tccctccaca tgttaaatgt agacaaatat actttatcaa
23881 attgcatacc tataggaata gtctctgtaa tcactgcgat tgtattatcc ggattcattt
23941 tatttgttaa aagaataatc ctatatcact tcactctatt aaaaatccaa gtttctattt
24001 ctttcatgac tgatttttta acttcatccg tttccttatg aagatgatgt ttggcacctt
24061 cataaatttt tatttctcta ttacaatttg catgttgcat gaaataatat gcacctaaaa
24121 catcgctaat ctcattgttc gttccctgga gtatgagagt cggggtgtta atcttggaaa
24181 ttatttttct aaccttgttg gtagccttca agacctgact agcaaatcca gccttaattt
24241 tttcatgatt gattaatggg tcgtattggt atttataaac tttatccata tctctagata
24301 ctgattctgg acatagcttt ccgactggcg catttggtgt gatggttccc ataagtttgg
24361 cagctagcag attcagtctt gaaacagcat ctgcattaac tagaggagac attagaatca
24421 ttgctgtaaa caagtttgga ttatcgtaag aggctagtat agaaattgtt gctcccatgg
24481 aatgacccaa taagtagatt taatagttac cacgtgctgt accaaagtca tcaatcatca
24541 ttttttcacc attacttctt ccatgtccaa tatgatcatg tgagaatact aaaattccta
24601 acgatgatat gttttcagct agttcgtcat aacgtccaga atgtttacca gctccatgac
24661 ttatgaatac taatgcctta ggatatgtaa tcattgtcca gattgaacat acagtttgca
24721 ctcatgattc acgttatata actatcaata ttaacagttc gtttgatgat catattattt
24781 ttatgttttа ttgataattg taaaaacata caattaaatc aatatagagg aaggagacgg
24841 ctactgtctt ttgtgagata gtcatggcga ctaaattaga ttatgaggat gctgtttttt
24901 actttgtgga tgatgataaa atatgtagtc gcgactccat catcgatcta atagatgaat
24961 atattacgtg gagaaatcat gttatagtgt ttaacaaaga tattaccagt tgtggaagac
25021 tgtacaagga attgatgaag ttcgatgatg tcgctatacg gtactatggt attgataaaa
25081 ttaatgagat tgtcgaagct atgagcgaag gagaccacta catcaatttt acaaaagtcc
25141 atgatcagga aagtttattc gctaccatag gaatatgtgc taaaatcact gaacattggg
25201 gatacaaaaa gatttcagaa tctagattcc aatcattggg aaacattaca gatctgatga
25261 ccgacgataa tataaacatc ttgatacttt ttctagaaaa aaaattgaat tgatgatata
25321 ggggtcttca taacgcataa ttattacgtt agcattctat atccgtgtta aaaaaaatta
25381 tcctatcatg tatttgagag ttttatatgt agcaaacatg atagctgtga tgccaataag
25441 ctttagatat tcacgcgtgc tagtgttagg gatggtatta tctggtggtg aaatgtccgt
25501 tatataatct acaaaacaat catcgcatat agtatgcgat agtagagtaa acatttttat
25561 agtttttact ggattcatac atcgtctacc caattcggtt atgaatgaaa ttgtcgccaa
25621 tcttacacgc aaccccttgt tatccattag tatagtatta acttcgttat ttatgtcata
25681 aactgtaaat gattttgtag atgccatatc atacatgata ttcatgtccc tattataatc
25741 attactaact ttatcacaat atatgttgat aatatctata tatgatctag tctttgtggg
```

FIG. 22 CONT'D

25801 caactgtcta tacaagtcgt ctaaacgttg tttactcata tagtatcgaa cagccatcat
25861 tacatggtcc cgttccgttg atagataatc gagtatgtta gtggacttgt caaatctata
25921 taccatattt tctggaagtg gatatacata gtcgtgatca acattattgc tagcctcatc
25981 ttctatatcc tgtactatac catctacata atctacgata ttattacaca taaacatcga
26041 caacatacta ttgtttatta tctaagtcct gttgatccaa acccttgatc tcctctattt
26101 gtactatcta gagattgtac ttcttccagt tctggataat atatacgttg atagattagc
26161 tgagctattc tatctccagt atttacatta aacgtacatt ttccattatt aataagaatg
26221 actctatgt ttccccctata atcttcgtct attacaccac ctcctatatc aatgcctttt
26281 agtgacagac cagacctagg agctattcta ccatagcaaa tcttaggcat ggacatacta
26341 atatctgtct taattaactg tctttctcct ggagggatag tataatcgta agcgctatac
26401 aaatcatatc cggcagcacc cggcgattgc ctagtaggag atttagctct gttagtttcc
26461 ttaacaaatc taactggtga gttaatattc atgttgaaca taaaactaat attttattcc
26521 aaaattattt accatcccat atattccatg aataagtgtg atgattgtac acttctatag
26581 tatctatata cgattcacga taaaatcctc ctatcaatag cagtttatta tccactatga
26641 tcaattctgg attatccctc ggataaatag gatcatctat cagagtccat gtattgctgg
26701 attcacaata aaattccgca tttctaccaa ccaagaataa ccttctaccg aacactaacg
26761 cgcatgattt ataatgagga taataagtgg atggtccaaa ctgccactga tcatgattgg
26821 gtagcaaata ttctgtagtt gtatcagttt cagaatgtcc tcccattacg tatataacat
26881 tgtttatgga tgccaatgct ggattacatc taggtttcag aagactcggc atattaaccc
26941 aagcagcatc cccgtggaac caacgctcaa cagatgtggg atttggtaga cctcctacta
27001 cgtataattt attgttagcg ggtatccccgc tagcatacag tctgggccta ttcatcggag
27061 gaattggaat ccaattgttt gatatataat ttacagctat agcattgtta tgtatttcat
27121 tgttcatcca tccaccgatg agatatacta cttctccaac atgagtactt gtacacatat
27181 ggaatatatc tataatttga tccatgttca taggatactc tatgaatgga tacttgtatg
27241 atttgcgtgg ttgtttatca caatgaaata ttttggtaca gtctagtatc catttacat
27301 tatttataacc tctgggagaa agataatttg acctgattac atttttgata aggagtagca
27361 gatttcctaa tttatttctt cgctttatat accacttaat gacaaaatcc tcatctggaa
27421 catttagttc atcgctttct agaataagtt tcatagatag ataatcaaaa ttgtctatga
27481 tgtcatcttc cagttccaaa aagtgtttgg caataaagtt tttagtatga cataagagat
27541 tggatagtcc gtattctata cccatcatgt aacactcgac acaatatttc tttctaaaat
27601 ctcgtaggat aaagtttata caagtgtaga tgataaattc tacagaggtt aatatagaag
27661 cacgtaataa attgacgacg ttatgactat ctatatatac ctttccagta tatgagtaaa
27721 taactataga agttagactg tgaatgtcaa ggtctagaca aaccctcgta actggatctt
27781 tatttttcgt gtatttttga cgtaaatgtg tgcgaaagta aggagataac tttttcaata
27841 tcgtagaatt gactattata ttgcctccta tggcatcaat aattgttttg aatttcttag
27901 tcatagacaa tgctaatata ttcttacagt acacagtatt gacaaatatc ggcatttatg
27961 tttctttaaa agtcaacatc taaagaaaaa tgattatctt cttgagacat aactccaatt
28021 ttttggtatt cacccacacg tttttcgaaa aaattagttt taccttctaa tgatatattt
28081 tccatgaaat caaacggatt ggtaacatta taaatttttt taaatccaaa ttcagaaatc
28141 aatctatccg cgacgaattc tatatatgtt ttcatcattt cacaattcat tcctataagt
28201 ttaactggaa gagccgcagt aagaaattct tgttcaatgg atacccgcatc tgttataata
28261 gatctaacgg tttcttcact cggtggatgc aataaatgtt taaacatcaa acatgcgaag
28321 tcgcagtgta gacctcgtc tctactaatc aattcgttgg aaaacgtgag tccgggcatt
28381 aggccacgct ttttaagcca aaatatggaa gcgaatgatc cggaaaagaa gattccttct
28441 actgcagcaa aggcaataag tctctctcca taaccggcgc tgtcatgtat ccacttttga
28501 gcccaatcgg ccttctttth tacacaaggc atcgtttcta tggcattaaa gagatagttt
28561 ttttcattac tatctttaac ataagtatcg atcaaaagac tatacatttc cgaatgaatg
28621 ttttcaatgg ccatctgaaa tccgtagaaa catctagcct cggtaatctg tacttctgta
28681 caaaatcgtt ccgccaaatt ttcattcact attccgtcac tggctgcaaa aaacgccaat
28741 acatgttita taaaatattt ttcgtctggt gttagtttat tccaatcatt gatatcttta
28801 gatatatcta cttcttccac tgtccaaaat gatgcctctg ccttttata catgttccag
28861 atgtcatgat attggattgg gaaaataaca aatctatttg gattttggtgc aaggatgggt
28921 tccataacta aattaacaat aacaataaat ttttttttcag ttatctatat gcctgtactt
28981 ggatcttttg tacatcgata tcgccgcaat cactacaata attacaagta ttattgatag
29041 cattgttatt agtactatca taattaaatt atcgttatta tcattttgta attgtgacat
29101 catactagat aaatcgtttg cgagattgtt gtgggaagcg ggcatggagg atgaattatc
29161 gttattatta tttaaagcct cccattogga ttcacaaata tggcgcgcgt tcaacatttt
29221 atggaaacag ataacaagaa aactcgtcat cgttcaaatt tttaaccgata gtaaaccgat
29281 taaacgtcga gctaatttct aacgctagcg actctgttgg atatgggttt ccagatatat
29341 atcttttcag ttccccctacg tatctataat catctgtagg aaatggaaga tatttccatt
29401 tatctactgt tcctaatatc atatgtggtg gtgtagtaga accattaagc gcgaaagatg
29461 ttatttcgca tcgtatttta acttcgcaat aatttctggt tagataacgc actctaccag

FIG. 22 CONT'D

```
29521 tcaagtcaat gatattagcc tttacagata tattcatagt agtcgtaacg atgactccat
29581 cttttagatg cgatactcct ttgtatgtac cagaatcttc gtacctcaaa ctcgatatat
29641 ttaaacaagt taatgagata ttaacgcgtt ttatgaatga tgatatataa ccagaagttt
29701 tatcctcggt ggctagcgct ataaccttat cattataata ccaactagtg tgattaatat
29761 gtgacacgtt agtgtgggta caaatatgta cattatcgtc tacgtcgtat tcgatacatc
29821 cgcatacagc caacaaatat aaaatgacaa atactctaac gccgttcgta cccatcttga
29881 tgcggtttaa taaatgtttt gatttcaatt tattgtaaaa aaagattcgg ttttatactg
29941 ttcgatattc tcattgctta tattttcatc tatcatctcc acacagtcaa atccgtggtt
30001 agcatgcacc tcatcaacog gtaaaagact atcggacttct tctatcatta taactctaga
30061 atatttaatt tggtcattat taatcaagtc aattatctta tttttaacaa acgtagttat
30121 tttactcatt ttttataaaa acttttagaa atatacagac tctatcgtgt gtctatatct
30181 tctttttata tccaatgtat ttatgtctga ttttttcttca tttatcatat ataatggtcc
30241 aaattctaca cgtgcttcgg attcatccag atcattaagg ttcttataat tgtaacatcc
30301 ttctcttccc tcttctacat cttccttctt attcttattc ttagcgtcac agaatctacc
30361 acagcaggat cccatgacga gcgtcatatt aaactaatcc attttcaatt ataatatacg
30421 attagtaatg accattaaaa taaaaatatt cttcataacc ggcaagaaag tgaaaagttc
30481 acattgaaac tatgtcagta gtatacatca tgaaatgatg atatatatat actctatttt
30541 ggtggaggat tatatgatat aattcgtgga taatcattct taagacacat ttcttcattc
30601 gtaaatcttt tcacgttaaa tgagtgtcca tattttgcaa tttcttcata tgatggcggt
30661 gtacgtggac gaggctgctc ctgttcttgt tgtagtcgcc gactgtcgtg tctgcgttta
30721 gatccctcca ttatcgcgat tgcgtagatg gagtactatt ttataccttg taattaaatt
30781 tttttattaa ttaaacgtat aaaaacgttc cgtatctgta tttaagagcc agatttcgtc
30841 taatagaaca aatagctaca gtaaaaataa ctagaataat tgctacaccc actagaaacc
30901 acggatcgta atacggcaat cggttttcga taataggtgg aacgtatatt ttatttaagg
30961 acttaacaat tgtctgtaaa ccacaatttg cttccgcgga tcctgtatta actatctgta
31021 aaagcatatg ttgaccgggc ggagccgaac attctccgat atccaatttc tgtatatcta
31081 taatattatt aacctccgca tacgcattac agttcttttc tagcttggat accgcactag
31141 gtacatcgtc tagatctatt cctatttcct cagcgatagc tcttctatcc ttttccggaa
31201 gcaatgaaat cacttcaata aatgattcaa ccatgagtgt gaaactaagt cgagaattac
31261 tcatgcattt gttagttatt cggagcgcgc aatttttaaa ctgtcctata acctctccta
31321 tatgaatagc acaagtgaca ttagtaggga tagaatgttg agctaatttt tgtaaataac
31381 tatctataaa aagattatac aaagttttae actctttagt ttccgccatt tatccagtct
31441 gagaaaatgt ctctcataat aaatttttcc aagaaactaa ttgggtgaag aatggaaacc
31501 tttaatctat atttatcaca gtctgttttg gtacacatga tgaattcttc caatgccgta
31561 ctaaattcga tatcttttte gatttctgga tatgttttta ataaagtatg aacaaagaaa
31621 tggaaatcgt aataccagtt atgtttaact ttgaaattgt tttttatttt cttgttaatg
31681 attccagcca cttgggaaaa gtcaaagtcg tttaatgccg atttaatacg ttcattaaaa
31741 acaaacttct tatcctttag atgaattatt attggttcat tggaatcaaa aagtaagata
31801 ttatcgggtt taagatctgc gtgtaaaaag ttgtcgcagc atggtagttc gtaaatttta
31861 atgtataaca gagccatctg taaaaagata aactttatgt attgtaccaa agatttaaat
31921 cctaatttga tagctagctc ggtatctact ttatctgccg aatacagtgc tagggaaaaa
31981 attataaatat ttcctcttte gtattcgtag ttagttctct tttcatgttc gaaaaagtga
32041 aacatgcggt taaaatagtt tataacatta atattactgt taataactgc cggataaaag
32101 tgggatagta atttcacgaa tttgatactg tcctttctct cgttaaacgc ctttaaaaaa
32161 actttagaag aatatctcaa tgatagttcc tgaccatcca tagtttgtat caataatagc
32221 aacatatgaa gaacacgttt atacagagta tgtaaaaatg ttaatttata gtttaatccc
32281 atggcccacg cacacacgat taatttttt tcatctccct ttagattgtt gtatagaaat
32341 ttgggtactg tgaactccgc cgtagtttcc atgggactat ataattttgt ggcctcgaat
32401 acaaatttta ctacatagtt atctatctta aagactatac catatcctcc tgtagatatg
32461 tgataaaaat cgtcgtttat aggatcaaat cgtttatcct tttgttggaa aaaggatgaa
32521 ttaatgtaat cattctcttc tatctttagt agtgtttcct tattaaaatt cttaaaataa
32581 tttaacaatc taactgatgg agcccaattt tggtgtaaat ctaattggga cattatattg
32641 ttaaaatata aacagtctcc taatataaca gtatctgata atctatgggg agacatccat
32701 tgatattcag gggatgaatc attggcaaca cccatttatt gtacaaaaag ccccaattta
32761 caaacgaaag tccaggtttg atagagacaa actattaact attttgtctc tgtttttaat
32821 ttctttggta atgaaattat tcacaatatc agtatcttct ttatctacca gagatttiac
32881 taacttgata accttggctg tctcattcaa tagggtagta atatttgtat gtgtgatatt
32941 gatatctttt agaagtgatt ctttgatggt gccagcatac gaattacaat aatgcagaaa
33001 ctcggttaac atgcaggaat tatagtaagc caattccaat tgttgcctgt gttgtattag
33061 agtgtccata tgagcaatgg tgtccttgcg tttctctgat agaatgcgag cagcgatttt
33121 ggcgttatca tttgacgata tttctggaat gacgaatcct gtttctacta actttttggt
33181 aggacaaagt gaaacaatca agaagatagc ttctcctcct atttgtggaa gaaattgaac
```

FIG. 22 CONT'D

```
33241 tcctctagat gatctccttg acagatattg gaccgaatta cagaagtacc tggaatgtaa
33301 agccctgaaa ccccctcatt ttttaagcag attgttgccg taaatcctgc actatgccca
33361 agatagagag ctcctttggt gaatccatct ctatgtttca gtttaaccaa gaaacagtca
33421 gctggtctaa aatttccatc tctatctaat acagcatcta acttgatgtc aggaactatg
33481 accggttatg ttatatgtaa cattgagtaa atccttaagt tcataatcat cactgtcatc
33541 agttatgtac gatccaaaca atgtttctac tggcatagtg gatacgaaga tgctatccat
33601 cagaatgttt cctgattag tatttctat atagctattc ttctttaaac gatttttcaa
33661 atcagtaact atgttcattt ttttaggagt aggacgccta gccagtatgg aagaggattt
33721 tctagatcct ctcttcaaca tctttgatct caatggaatg caaaacccca tagtgtaaca
33781 accaacgata aaaataatat tgtttttcac tttttataat tttaccatct gactcatgga
33841 ttcattaata tctttataag agctactaac gtataattct ttataactga actgagatat
33901 atacacogga tctatggttt ccataattga gtaaatgaat gctcggcaat aactaatggc
33961 aaatgtataa aacaacgaaa ttatactaga gttgttaaag ttaatatttt ctatgagctg
34021 ttccaataaa ttatttgttg taactgcgtt caagtcataa atcatcttga tactatccag
34081 taaaccgttt ttaagttctg gaatattatt atcccattgt aaagccccta attcgactat
34141 cgaatatcct gctctgatag cagtttcaat atcgacggac gtcaatactg taataaaggt
34201 ggtagtattg tcatcatcgt gataaactac tggaatatgg tcgttagtag gtacggtaac
34261 tttacacaac gcgatatata actttcottt tgtaccattt ttaacgtagt tgggacgtcc
34321 tgcagggtat tgttttgaag aaatgatatc gagaacagat ttgatacgat attgttggga
34381 ttcctgatta tttactataa tataatctag acagatagat gattcgataa atagagaagg
34441 tatatcgttg gtaggataat acatcccccat tccagtattc tcggatactc tattaatgac
34501 actagttaag aacatgtctt ctattctaga aaacgaaaac atcctacatg gactcattaa
34561 aacttctaac gctcctgatt gtgttctcgaa tgcctcgtac aaggatttca aggatgccat
34621 agattctttg accaacgatt tagaattgcg tttagcatct gatttttta ttaaatcgaa
34681 tggtcggctc tctggtttgc tacccoaatg ataacaatag tcttgtaaag ataaacogca
34741 agaaaattta tacgcatcca tccaaataac cctagcacca tcggatgata ttaatgtatt
34801 attatagatt ttccatccac agttattggg ccagtatact gttagcaacg gtatatcgaa
34861 tagattactc atgtaacota ctagaatgat agttcgtgta ctagtcataa tatctttaat
34921 ccaatctaag aaatttaaaa ttagattttt tacactgtta aagttaacaa aggtattacc
34981 cggatacgtg gatatcatat atggtattgg tccattatca gtaatagctc cataaactga
35041 tacggcgatg gtttttatat gtgtttgatc taacgaggaa gaaattcgcg cccacaattc
35101 atctctagat atgtatttaa tatcaaacgg taacacatca atttcgggac gcgtatatgt
35161 ttctaaattt ttaatccaaa tataatgatg acctatatgc cctattatca tactgtcaac
35221 tatagtacac ctagagaact tacgatacat ctgtttccta taatcgttaa attttacaaa
35281 tctataacat gctaaacctt ttgacgacaa ccattcatta atttctgata tggaatctgt
35341 attctcaata ccgtatcgtt ctaaagccag tgctatatct ccctgttcgt gagaacgctt
35401 tcgtataata tcgatcaacg gataatctga agttttgga gaataatatg actcatgatc
35461 tatttcgtcc ataaacaatc tagacatagg aattggaggc gatgatctta attttgtgca
35521 atgagtcgtc aatcctataa cttctaatat tgtaatattc atcatcgaca taacactatc
35581 tatgttatca tcgtatatta gtataccatg accttcttca tttcgtgcca aaatgatata
35641 cagtcttaaa tagttacgca atatctcaat agtttcataa ttgttagctg ttttcatcaa
35701 ggtttgtatc ctgtttaaca tgatggcgtt ctatacgttt ctatttttta aatttttaac
35761 gatttactgt ggctagatac ccaatctctc tcaaatattt ttttagcctc gcttacaagc
35821 tgtttatcta tactattaaa actgacgaat ccgtgatttt ggtaatgggt tccgtcgaaa
35881 tttgccgaag tgatatgaac atattcgtcg tcgactatca acaattttgt attattctga
35941 atagtgaaaa ccttcacaga tagatcattt tgaacacaca acgcgtctag acttctggcg
36001 gttgccatag aatatacgtc gttcttatcc caattaccaa ctagaagtct gatcttaact
36061 cctctattaa tggctgcttc tataatggag ttgtaaatgt cgggccaata gtagctatta
36121 ccgtcgacac gtgtagtggg aactatggcc aaatgttcaa tatctatact agtcttagcc
36181 gacttgagtt tatcaataac tacatcagtg tctagatctc tagaatatcc caatagggtgt
36241 tccggagaat cagtaaagaa cactccacct ataggattct taatatgata cgcagtgcta
36301 actggcagac aacaagccgc agagcataaa ttcaaccatg aatttttttgc gctattaaag
36361 gctttaaaag tatcaaatct tctacgaaga tctgtggcca gcgggggata atcagaatat
36421 acacctaacg ttttaatcgt atgtatagat cctccagtaa atgacgcgtt tcctacataa
36481 catctttcat tatotgacac ccaaaaacaa ccgagtagta gtcccacatt attttttta
36541 tctatattaa cggttataaa atttatatcc gggcagtgac tttgtagctc tcccagattt
36601 ctttttcctc gttcatctag caaaactatt attttaatcc ctttttcaga tgcctctttt
36661 agtttatcaa aaataagcgc tcccctagtc gtactcagag gattacaaca aaaagatgct
36721 atgtatatat atttcttagc tagagtgata atttcgttaa aacattcaaa tgttgttaaa
36781 tgatcggatc taaaatccat attttctggt agtgtttcta ccagcctaca ttttgctccc
36841 gcaggtaccg gtgcaaatgg ccacatttag ttaacataaa aacttatata tcctgttcta
36901 tcaacgattc tagaatatca tcggctatat cgctaaaatt ttcatcaaag tcgacatcac
```

FIG. 22 CONT'D

```
36961 aacctaactc agtcaatata ttaagaagtt ccatgatgtc atcttcgtct atttctatat
37021 ccgtatccat tgtagattgt tgaccgatta tcgagtttaa atcattacta atactcaatc
37081 cttcagaata caatctgtgt ttcattgtaa atttataggc ggtgtattta agttggtaga
37141 ttttcaatta tgtatcaata tagcaacagt agttcttgct cctccttgat tctagcatcc
37201 tcttcattat tttcttctac gtacataaac atgtccaata cgttagacaa cacaccgacg
37261 atggcggccg ccacagacac gaatatgact aaaccgatga ccatttaaaa acccctctct
37321 agctttcact taaactgtat cgattattct tttagaacat gtataatata aaaacattat
37381 tctatttcga atttaggctt ccaaaaattt ttcatccgta aaccgataat aatatatata
37441 gacttgttaa tagtcggaat aaatagatta atgcttaaac tatcatcatc tccacgatta
37501 gagatacaat atttacattt tttttgctgt ttcgaaactt tatcaatata cgttaataca
37561 aacccaggaa ggagatattg aaactgaggc tgttgaaaat gaaacggtga atacaataat
37621 tcagataatg taaaatcatg attccgtatt ctgatgatat tagaactgct aatggatgtc
37681 gatggtatgt atctaggagt atctatttta acaaagcatc gatttgctaa tatacaatta
37741 tcatttttgat taattgttat tttattcata ttcttaaaag gtttcatatt tatcaattct
37801 tctacattaa aaatttccat ttttaattta tgtagccccg caatactcct cattacgttt
37861 catttttgt ctataatatc catttttgttc atctcggtac atagattatc caattgagaa
37921 gcgcatttag tagttttgta catttttaagt ttattgacga atcgtcgaaa actagttata
37981 gttaacattt tattatttga taccctgata ttaataccgc tgccgttact attatttata
38041 actgatgtaa tccacgtaac attggaatta actatcgata gtaatgcatc gacgcttcca
38101 aaattgtcta ttataaactc accgataatt tttttattac atgttttcat attcattagg
38161 attattaaat ctttaatctt actacgattg tatgcgttga tattgcaaga cgtcattcta
38221 aaagacggag gatctccatc aaatgccaga caatcacgta caaagtacat ggaaatagat
38281 tttgttctat tgcgcatcat agatttatat agaacacccg tagaaatact aatttgtttt
38341 actctataaa atactaatgc atctatttca tcgttttgta taacgtcttt ccaagtgtca
38401 aattccaaat ttttttcatt gatagtacca aattcttcta tctctttaac tacttgcata
38461 gataggtaat tacagtgatg cctacatgcc gttttttgaa actgaataga tgcgtctaga
38521 agcgatgcta cgctagtcac aatcaccatt ttcatattta gaatatatat atgtaaaaat
38581 atagtagaat ttcattttgt tttttttcta tgctataaat gaattctcat tttgcatctg
38641 ctcatactcc gttttatatc aataccaaag aaggaagata tctggttcta aaagccgtta
38701 aagtatgcga tgttagaact gtagaatgcg aaggaagtaa agcttcctgc gtactcaaag
38761 tagataaacc ctcatcaccc gcgtgtgaga gaagaccttc gtccccttcc agatgcgaga
38821 gaatgaataa cccaggaaaa caagttccgt ttatgaggac ggacatgcta caaaatatgt
38881 tcgcggctaa tcgcgataat gtagcttcta gacttttgtc ctaaaataca attatatcct
38941 tttcgatatt aataaatccg tgtcgtccag gttttttatc tctttcagta tgtgaataga
39001 taggtatttt atctctattc atcatcgaat ttaagagatc cgataaacat tgtttgtatt
39061 ctccagatgt cagcatctga tacaacaata tatgtgcaca taaacctctg gcacttattt
39121 catgtacctt ccccttatca ctaaggagaa tagtatttga gaaatatgta tacatgatat
39181 tatcatgaat tagatataca gaatttgtaa cactctcgaa atcacacgat gtgtcggcgt
39241 taagatctaa tatatcactc gataacacat tttcatctag atacactaga catttttaa
39301 agctaaaata gtctttagta gtaacagtaa ctatgcgatt attttcatcg atgatacatt
39361 tcatcggcat attattacgc ttaccatcaa agactatacc atgtgtatat ctaacgtatt
39421 ctagcatggt tgccatacgc gcattaaact tttcaggata tttggataga tcttccaatc
39481 tatctatttg agaaaacatt tttatcatgt tcaatagttg aaacgtcgga tccactatat
39541 agatattatc tataaagatt ttaggaacta cgttcatggt atcctggcga atattaaaac
39601 tatcaatgat atgattatcg ttttcatctt ttatcaccat atagtttcta agatatggga
39661 ttttacttaa tataatatta tttcccgtaa taaattttat tagaaatgcc aaatctataa
39721 gaaaagtcct cgaattagtt tgaagaatat ctatatcgcc gtaccgtata tttggattaa
39781 ttagatataq agaatatgat ccgtaacata tacaactttt attatggcgt ctaagatatt
39841 cttccatcaa cttattaaca tttttgacta gggaagatac attatgacgt cccattactt
39901 ttgccttgtc tattactgcg acgttcatag aatttagcat atctcttgcc aattcttcca
39961 ttgatgttac attataagaa attttagatg aaattacatt tggagcttta atagtaagaa
40021 ctcctaatat gtccgtgtat gtggtcacta atacagattg tagttctata atcgtaaata
40081 atttacctat attatatgtt tgagtctgtt tagaaaagta gctaagtata cgatctttta
40141 tttctgatgc agatgtatca acatcggaaa aaaatctttt tttattcttt tttactaaag
40201 atacaaatat gtctttgtta aaaacagtta ttttctgaat atttctagct tgtaatttta
40261 acatatgata ttcgttcaca ctaggtactc tgcctaaata ggtttctata atctttaatg
40321 taatattagg aaaagtattc tgatcaggat tcctatttat tttgaggatt taaaactctg
40381 attattgtct aatatggtct caacacaaac tttttcacag agcgatagag tttttgataa
40441 ctcgtttttc ttaagaaata taaaactact gtctccagag ctcgcttcat cttttatttt
40501 atttaattcg atacaaactc ctgatactgg ttcagaaagt aattcattaa ttttcagtcc
40561 tttatagaag atatttaata tagataatac aaaatcttca gtttttgata tcgatctgat
40621 tgatcctaga actagatata ttaataacgt gctcattagg cagtttatgg cagcttgata
```

FIG. 22 CONT'D

40601 attagatata gtatattcca gttcatattt attagatacc gcattgccca gattttgata
40741 ttctatgaat tcctctgaaa ataaatccaa aataactaga cattctattt tttgtggatt
40801 agtgtgctct cttcctctta tcatgttcac tactggtgtc cacgatgata aatatctaga
40861 gggaatataa tatagtccat aggatgccaa tctagcaatg tcgaataact gtaattttat
40921 tcttcgctct tcattatgaa ttgattcttg aggtataaac ctaacacaaa ttatattatt
40981 agacttttcg tatgtaatgt ctttcatgtt ataagttttt aatcctggaa tagaatctat
41041 tttaatgagg cttttaaacg cagagttctc caacgagtca aagcataata ctctgttggt
41101 tttcttatat acgatgttac gattttcttc tttgaatgga ataggttttt gaattagttt
41161 ataattacaa cataatagat aaggaagtgt gcaaatagta cgcggaaaaa acataatagc
41221 tccctgttt tcatccatgg ttttaagtaa atgatcactg gcttctttag tcaatggata
41281 ttcgaacatt aacogtttca tcatcattgg acagaatcca tatttcttaa tgtaaagagt
41341 gatcaaatca ttgtgtttat tgtaccatct tgttgtaaat gtgtattcgg ttatcggatc
41401 tgctcctttt tctattaaag tatcgatgtc gatctcgtct aagaattcaa ctatatcgac
41461 atatttcatt tgtatacaca taaccattac taacgtagaa tgtataggaa gagatgtaac
41521 gggaacaggg tttgttgatt cgcaaactat tctaatacat aattcttctg ttaatacgtc
41581 ttgcacgtaa tctattatag atgccaagat atctatataa ttatttttgta agatgatgtt
41641 aactatgtga tctatataag tagtgtaata attcatgtat ttcgatatat gttccaactc
41701 tgtctttgtg atgtctagtt tcgtaatatc tatagcatcc tcaaaaaata tattcgcata
41761 tattcccaag tcttcagttc tatcttctaa aaaatcttca acgtatggaa tataataatc
41821 tattttacct cttctgatat cattaatgat atagtttttg acactatctt ctgtcaattg
41881 attcttattc actatatcta agaaacggat agcgtcccta ggacgaacta ctgccattaa
41941 tatctctatt atagcttctg gacataattc atctattata ccagaattaa tgggaactat
42001 tccgtatcta tctaacatag ttttaagaaa gtcagaatct aagacctgat gttcatatat
42061 tggttcatac atgaaatgat ctctattgat gatagtgact atttcattct ctgaaaattg
42121 gtaactcatt ctatatatgc tttccttgtt gatgaaggat agaatatact caatagaatt
42181 tgtaccaaca aactgttctc ttatgaatcg tatatcatca tctgaaataa tcatgtaagg
42241 catacattta acaattagag acttgtctcc tgttatcaat atactattct tgtgataatt
42301 tatgtgtgag gcaaaatttgt ccacgttctt taattttgtt atagtagata tcaaatccaa
42361 tggagctaca gttcttggct taaacagata tagtttttct ggaacgaatt ctacaacatt
42421 attataaagg actttgggta gataagtggg atgaaatcct attttaatta atgcgatagc
42481 cttgtcctcg tgcagatatc caaacgcttt tgtgatagta tggcattcat tgtctagaaa
42541 cgctctacga atatctgtga cagatatcat ctttagagaa tatactagtc gcgttaatag
42601 tactacaatt tgtatttttt aatctatctc aataaaaaaa ttaatatgta tgattcaatg
42661 tataactaaa ctactaactg ttattgataa ctagaatcag aatctaatga tgacgtaacc
42721 aagaagttta tctactgcca atttagctgc attatttta gcatctcgtt tagatttcc
42781 atctgcttta tcgaatactc ttccgtcgat atctacatag gcataaaatg taggagagtt
42841 actaggcccc actgattcaa tacgaaaaga ccaatcttc ttagttattt ggcagtactc
42901 attaataatg gtgacagggt tagcatcttt ccaatcaata attttttag ccggaataac
42961 atcatcaaaa gacttatgat cctctctcat tgatttttcg cgggatacat catctattat
43021 ggcgtcagcc ataacatcag catccggctt atccgcctcc gttgtcataa accaacgagg
43081 aggaatatcg tcggagctgt acaccatagc actacgttga agatcgtaca gagctttatt
43141 aacttctcgc ttctccatat taagttgtct agttagttgt gcagcagtag ctccttcgat
43201 tccaatgttt ttaatagccg cacacacaat ctctgcgtca gaacgctcgt caatatagat
43261 cttagacatt tttagagaga actaacacaa ccagcaataa aactaattta ttttatcatt
43321 tttttattca tcatcctctg gtggttcgtc gtttctatcg aatgtggatc tgattaaccc
43381 gtcatctata ggtgatgctg gttctggaga ttctggagga gatggattat tatctggaag
43441 aatctctgtt atttccttgt tttcatgtat cgattgcgtt gtaacattaa gattgcgaaa
43501 tgctctaaat ttgggaggct taaagtgttg tttgcaatct ctacacgcat gtctaactag
43561 tggaggttcg tcagcggctc tagtttgaat catcatcggc gtagtattcc tacttttaca
43621 gttaggacac ggtgtattgt atttctcgtc gagaacgtta aaataatcgt tgtaactcac
43681 atcctttatt ttatctatat tgtattctac tcctttctta atgcatttta taccgaataa
43741 gagatagcga aggaattctt tttcggtgcc gctagtaccc ttaatcatat cacatagtgt
43801 tttatattcc aaatttgtgg caatacacgg tttatttcta tacgatagtt tgtttctgga
43861 atcctttgag tattctatac caatattatt ctttgattcg aatttagttt cttcgatatt
43921 agattttgta ttacctatat tcttgatgta gtactttgat gatttttcca tggcccattc
43981 tattaagtct tcraagttgg catcatccac atattgtgat agtaattctc ggatatcagt
44041 agcggctacc gcrattgatg tttgttcatt ggatgagtaa ctactaatgt atacatttttc
44101 catttataac acttatgtat taactttgtt catttatatt ttttcattat tatgttgata
44161 ttaacaaaag tgaatatata tgttaataat tgtattgtgg ttatacggct acaatttcat
44221 aatgagtgga agtcagtgtc cgatgatcaa tgacgatagc tttactctga aaagaaagta
44281 tcaaaatcgat agtgcggagt caacaataaa aatggataag aagaggataa agtttcagaa
44341 tagagccaaa atggtaaaag aaataaatca gacaataaga gcagcacaaa ctcattacga

FIG. 22 CONT'D

```
44401 gacattgaaa ctaggatacs taaaatttaa gagaatgatt aggactacta ctctagaags
44461 tatagcacca tctattccaa ataatcagaa aacttataaa ctattctcgg acatttcagc
44521 catcggcaaa gcatcacaga atccgagtaa gatggtatat gctctgctgc tttacatgtt
44581 tcccaatttg tttggagatg atcatagatt cattcgttat agaatgcatc caatgagtaa
44641 aatcaaacac aagatcttct ctcctttcaa acttaatctt attagaatat tagtggaaga
44701 aagattctat aataatgaat gcagatctaa taaatggaga ataattggaa cacaagttga
44761 taaaatgttg atagctgaat ctgataaata tacaatagat gcaaggtata acctaaaacc
44821 catgtataga atcaaggaaa aatctgaaga agataccctc tttatcaaac agatggtaga
44881 acaatgtgtg acatcccagg aattggtgga aaaagtgttg aagatactgt ttagagattt
44941 gttcaagagt ggagaatacs aagcgtacag atacgatgat gatgtagaaa atggatttat
45001 tggattggat acactaaaat taaacattgt tcatgatata gttgaaccat gtatgcctgt
45061 tcgtaggcca gtggctaaga tactgtgtaa agaaatggta aataaatact ttgagaatcc
45121 gctacatatt attggtaaaa atcttcaaga gtgcattgac tttgttagtg aataggcatt
45181 tcatctttct ccaatactaa ttcaaattgt taaattaata atggatagta taaatagtta
45241 ttagtgataa aatagtaaaa ataattatta gaataagagt gtagtatcat agataactct
45301 cttctataaa aatggatttt attcgtagaa agtatcttat atacacagta gaaaataata
45361 tagatttttt aaaggatgat acattaagta aagtaaacaa ttttacccts aatcatgtac
45421 tagctctcaa gtatctagtt agcaattttc ctcaacacgt tattactaag gatgtattag
45481 ctaataccaa tttttrtgtt ttcatacata rggtacgatg ttgtaaagtg tacgaagcgg
45541 ttttacgaca cgcatttgat gcanccacgt tgtacgttaa agcattgact aagaattatt
45601 tatcgtttag taacgcaata caatcgtaca aggaaaccgt gcataaacta acacaagatg
45661 aaaaattttt agaggttgcc gaatacatgg acgaattagg agaacttata ggcgtaaatt
45721 atgacttagt tcttaatsca ttatttcacg gagggaaacc catcaaagat atggaaatca
45781 tttttttaaa actgtttaag aaaacagact tcaaagttgt taaaaaatta agtgttataa
45841 gattacttat ttgggcttac ctaagcaaga aagatacagg catagagttt gcggataatg
45901 atagacaaga tatatacact ctatttcaac aaactggtag aatagtccat agcaatctaa
45961 cwgaaacgtt tagagattat atctttcccg gagataagac tagctattgg gtgtggttaa
46021 acgaaagtat agctaatgat gcggatattg ttcttaatag acacgccatt accatgtatg
46081 ataaaattct tagttatata tactctgaga taaaacaagg acgcgttaat aaaaacatgc
46141 ttaagttagt ttatatcttt gagcctgaaa aagatatcag agaacttctg ctagaaatca
46201 tatatgatat tcctggagat atcctatcta ttattgatgc aaaaaacgac gattggaaaa
46261 aatattttat tagtttttat aaagctaatt ttattaacgg taatacattt attagtgata
46321 gaacgtttaa cgaggactta ttcagagttg ttgttcaaat agatcccgaa tatttcgata
46381 atgaacgaat tatgtcttta ttctctacga gtgctgcgga cattaaacga tttgatgagt
46441 tagatattaa taacagttat atatctaata taattttatga ggtgaacgat atcacattag
46501 atacaatgga tgatatgaag aagtgtcaaa tctttaacga ggatacgtcg tattatgtta
46561 aggaatacaa tacatacctg tttttgcacg agtcggatcc catggtcata gagaacggaa
46621 tactaaagaa actgtcatct ataaaatsca agagtagacg gctgaacttg tttagcaaaa
46681 acattttaaa atattattta gacggacaat tggctcgtct aggtcttgtg ttagatgatt
46741 ataaaggaga cttgttagtt aaaatgataa acatcttaa gtctgtggag gatgtatccg
46801 cattcgttcg attttctaca gataaaaacc ctagtattct tccatcgcta atcaaaacta
46861 ttttagctag ttataatatt tccatcatcg tcttatttca aaggttttg agagataatc
46921 tatatcatgt agaagaattc ttggataaaa gcatccatct aaccaagacg gataagaaat
46981 atatacttca attgataaga cacggtagat catagaacag accaaatata ttattaataa
47041 tttgtatata catagatata attatcacac attttgata aatggaact gctgcaacaa
47101 ttcagactcc caccaaatta atgaataaag aaaatgcaga aatgattttg gaaaaaattg
47161 ttgatcatat agttatgtat attagtgacg aatcaagtga ttcagaaaat aatcctgaat
47221 atattgattt tcgtaacaga tacgaagact atagatctct cattataaaa agtgatcacg
47281 agtttgtaaa gctatgtaaa aatcatgcag agaaaagttc tccagaaacg caacaaatga
47341 ttatcaaaca catatacgaa caatatctta ttccagtatc tgaagtacta ttaaaacsta
47401 taatgtccat gggtgacata attacatata acggatgtaa agacaatgaa tggatgctag
47461 aacaactctc tacsctaaac tttaacaatc tccgcacatg gaactcatgt agcataggca
47521 atgtaacgcg tctgttttat acatttttta gttatctgat gaaagataaa ctaaatatat
47581 aagtataatc ccattctaat actttaacct gatgtattac ctgcatctta ttagaatatt
47641 aacctaacta aaagacataa catagttgat aaaaagcggt aggatataaa tattatggct
47701 gccacogttc cgcgttttga cgacgtgtac aaaaatgcac aaagaagaat tctagatcaa
47761 gaaacatttt ttagtagagg tctaagtaga ccgttaatga aaaacacata tctatttgat
47821 aattacgcgt atggatggat accagcaact gcaatttgga gtagtagata cgcaaacttc
47881 gatgcaagtg actattatcc catttcgttg ggattactta aaaagttcga gtttctcatg
47941 tctctatata aaggtcctat tcccgtatat gaagaaaaag taaatactga attcattgct
48001 aatggatcgt tctctggtag atacgtatca tatcttcgaa agttttctgc cattccaaca
48061 aacgagttta ttagtttttt gttactgact tccattccaa tctataatat cttgtttctgg
```

FIG. 22 CONT'D

```
48121 tttaaaaata ctcagtttga tattactaaa cacacattat tcagatacgt ctatacagat
48181 aatgccaaac acctggcgtt ggctaggtat atgcatcaaa caggagacta taagcctttg
48241 tttagtcgtc tcaaagagaa ttatatattt accggtcccg ttccaataag tatcaaagat
48301 atagatcacc ctaatcttag tagagcaaga agtccatccg attatgagac attagctaat
48361 attagtacta tattgtactt taccaagtat gatccggtat taatgttttt attgttttac
48421 gtacctgggt attcaattac tacaaaaatt actccagccg tagaatatct aatggataaa
48481 ctgaatctaa caaagagcga cgtacaactg ttgtaaatta ttttatgctt cgtaaaatgt
48541 aggttttgaa ccaaacattc tttcaaagaa tgagatgcat aaaactttat tatccaatag
48601 attgactatt tcggacgtca atcgtttaaa gtaaacttcg taaaatattc tttgatcact
48661 gccgagttta aaacttctat cgataattgt ttcatatgtt ttaatattta caagtttttt
48721 ggtccatggt acattagccg gacaaatata tgcaaaataa tatcgttctc caagttctat
48781 agtttctgga ttatttttat tatattcagt aaccaaatac atattagggt tatctgcgga
48841 tttataattt gagtgatgca ttcgactcaa cataaataat tctagaggag acgatctact
48901 atcaaattcg gatcgtaaat ctgtttctaa agaacggaga atatctatac atacctgatt
48961 agaattcatc cgtccttcag acaacatctc agacagtctg gtcttgtatg tcttaatcat
49021 attcttatga aacttggaaa catctcttct agtttcacta gtaccttttat taattctctc
49081 aggtacagat tttgaattcg acgatgctga gtatttcatc gttgtatatt tcttcttcga
49141 ttgcataatc agattcttat atacccgcct aaactctatt ttaaaattat taaacaatac
49201 tctattatta atcagtcgtt ctaactcttt cgctatttcc atagacttat cgacatcttg
49261 actgtctatc tctgtaaaca cggagtcggt atctccatac acgctacgaa aacgaaatct
49321 gtaatctata ggcaacgatg ttttcacaat cggattaata tctctatcgt ccatataaaa
49381 tggattactt aatggattgg caaaccgtaa catacogtta gataactctg ctccatttag
49441 taccgattct agatacaaga tcattctacg tcctatggat gtgcaactct tagccgaagc
49501 gtatgagtat agagcactat ttctaaatcc catcagacca tatactgagt tggctactat
49561 cttgtacgta tattgcatgg aatcatagat ggcctttcta gttgaactgg tagcctgttt
49621 tagcatcttt ttatatctgg ctctctctgc caaaaatgtt cttaatagtc taggaatggt
49681 tccttctatc gatctatcga aaattgctat ttcagagatg aggttcggta gtctaggttc
49741 acaatgaacc gtaatatatc taggacgtgg atatttctga agcaagagct gattatttat
49801 ttcttcttcc aatctattgg tactaacaac gacaccgact aatgtttccg gagatagatt
49861 tccaaagata cacacattag gatacagact gttataatca aagattaata cattattact
49921 aaacatttct tgttttggag caaatacctt accgccttca taaggaaact tttgttttgt
49981 ttctgatcta actaagatag ttttagtttc caacaatagc tttaacagtg gaccttgat
50041 gactgtactc gctctatatt cgaataccat ggattgagga agcacatatg ttgacgcacc
50101 cgcgtctgtt tttgtttcta ctccataata ctcccacaaa tactgacaca aacaagcatc
50161 atgaatacag tatctagcca tatctaaagc tatgtttaga ttataatcct tatacatctg
50221 agctaaatca acgtcatcct ttccgaaaga taatttatat gtatcattag gtaaagtagg
50281 acatgatagt acgactttaa atccattttc ccaaaatatct ttacgaatta ctttacatat
50341 aatatcctca tcaacagtca cataattacc tgtggttaaa acctttgcaa atgcagcggc
50401 tttgcctttc gcgtccgtag tatcgtcacc gatgaacgtc atttctctaa ctcctctatt
50461 taatacttta cccatgcaac tgaacgcgtt cttggatata gaatccaatt tgtacgaatc
50521 caatttttca gatttttgaa tgaatgaata tagatcgaaa aatatagttc cattattgtt
50581 attaacgtga aacgtagtat tggccatgcc gcctactccc ttatgactag actgatttct
50641 ctcataaata cagagatgta cagcttcctt tttgtccgga gatctaaaga taatcttctc
50701 tcctgttaat aactctagac gattagtaat atatctcaga tcaaagttat gtccgttaaa
50761 ggtaacgacg tagtcgaacg ttagttccaa caattgttta gctattcgta acaaaaatat
50821 ttcagaacat agaactagtt ctcgttcgta atccatttcc attagtgact gtatcctcaa
50881 acatcctcta tcgacggctt cttgtatttc ctgttccgtt aacatctctt cattaatgag
50941 cgtaaacaat aatcgtttac cacttaaatc gatataacag taacttgtat gcgagattgg
51001 gttaataaat acagaaggaa acttcttatc gaagtgacac tctatatcta gaaataagta
51061 cgatcttggg atatcgaatc taggtatttt tttagcgaaa cagttacgtg gatcgtcaca
51121 atgataacat ccattgttaa tctttgtcaa atattgctcg tccaacgagt aacatccgtc
51181 tggagatatc ccgttagaaa tataaaacca actaatattg agaaattcat ccatggtggc
51241 attttgtatg ctgcgtttct ttggctcttc tatcaaccac atatctgcga cggagcattt
51301 tctatcttta atatctagat tataacttat tgtctcgtca atgtctatag ttctcatctt
51361 tcccaacggc ctcgcattaa atggaggagg agacaatgac tgatatattt cgtccgtaac
51421 tacgtaataa aagtaatgag gaaatcgtat aaatacggtc tcgccatttc gacatctgga
51481 tttcagatat aaaaatctgt tttcacogtg actttcaaac caattaatgc accgaacatc
51541 catttataga atttagaaat atattttcat ttaaatgaat cccaaacatt ggggaagagc
51601 cgtatggacc attatttta tagtactttc gcaagcgggt ttagacggca acatagaagc
51661 gtgtaaacga aaactatata ctatagtcag cactcttcca tgtcctgcat gtagacggca
51721 cgcgactatc gctatagagg acaataatgt catgtctagc gatgatctga attatattta
51781 ttatttttc atcagattat ttaacaattt ggcatctgat cccaaatacg cgatcgatgt
```

FIG. 22 CONT'D

```
51841 gacaaaggtt aaccctttat aaacttaacc cattataaaa cttatgatta gtcacgactg
51901 aaataacogc gtgattattt tttggtataa ttctacacgg catggtttct gtaactatga
51961 attcaacccc cgttacatta gtgaaatctt taacaaacag caagggttcg tcaaagacat
52021 aaaactcatt gtttacaatc gaaatagacc ccctatcaca cttaaaataa aaaatatcct
52081 tatcctttac caccaaataa aattctgatt ggtcaatgtg aatgtattca cttaacagtt
52141 ccacaaattt atttattaac tccgaggcac atacatcgtc ggtatttttt atggcaaact
52201 ttactcttcc agcatccgtt tctaaaaaaa tattaacgag ttccattttat atcatccaat
52261 attattgaaa tgacgttgat ggacagatga tacaaaataag aaggtacggt accttttgtcc
52321 accatctcct ccaattcatg ctctatttta tcattaactt taatgtatga aaacagtacg
52381 ccacatgctt ccatgacagt gtgtaacact ttggatacaa aatgtttgac attagtataa
52441 ttgtccaaga ctgtcaatct ataatagata gtagctataa tatattctat gatggtattg
52501 aagaagatga caatcttggc atattgatca tttaacacag acatggtatc aacagatagc
52561 ttgaatgaaa gagaatcagt aattggaata agcgtcttct cgatagagtg tccgtatacc
52621 aacatgtctg atattttgat gtattccatt aaattattta gttttttctt tttattctcg
52681 ttaaaacagca ttttctgtcaa cggacccaaa catcgttgac cgattaagtt ttgattgatt
52741 tttccgtgta aggcgtatct agtcagatcg tatagcctat ccaataatcc atcatctgtg
52801 cgtagatcac atcgtacact ttttaattct ctatagaaga gcgacagaca gcaatttctt
52861 tattctctac agatgtaaga tacttgaaga cattcctatg atgatgcaga attttggata
52921 acacggtatt gatggtatct gttaccataa tccttttgat ggctgatagt gtcagagcac
52981 aagatttcca atctttgttt tgatatctat atcagacagc atggtgcgtc tgacaacaca
53041 aggattaaga cggaaagatg aaatgattct ctcaacatct tcaatggata ccttgctatt
53101 ttttctggca ttatctatat gtgcgagaat atcctctaga gaatcagtat cctttttgat
53161 gatagtggat ctcaatgaca tgggacgtct aaaccttctt attctatcac cagattgcat
53221 ggtgatttgt cttctttctt ttatcataat gtaatctcta aattcatcgg caaattgtct
53281 atatctaaaa tcataatatg agatgtttac ctctacaaat atctgttcgt ccaatgttag
53341 agtatctaca tcagttttgt attccaaatt aaacatggca acggatttaa ttttatattc
53401 ctctattaag tcctcgtcga taataacaga atgtagataa tcatttaatc catcgtacat
53461 ggttggaaga tgcttgttga caaaatcttt aattgtcttg atgaaggtgg gactatatct
53521 aacatcttga ttaataaaat ttatacatt gtccatagga tactttgtaa ctagttttat
53581 acacatctct tcatcggtaa gtttagacag aatatcgtga acaggtggta tattatattc
53641 atcagatata cgaagaacaa tgtccaaatc tatattgttt aatatattat atagatgtag
53701 cgtagctcct acaggaatat ctttaactaa gtcaatgatt tcatcaaccg ttagatctat
53761 tttaaagtta atcatatagg cattgatttt taaaaggtat gtagccttga ctacattctc
53821 attaattaac cattccaagt cactgtgtgt aagaagatta tattctatca taagcttgac
53881 tacatttggt cccgatacca ttaaacaatt cttatgatat aaggaaacag attttaggta
53941 ctcatctact ctacaagaat tttggagagc cttaacgata tcagtgacgt ttattatttc
54001 aggaggaaag aatctaacat tgagaatatc ggaattaata gcttccagat acagtgattt
54061 tggcaatagt ccgtgtaatc cataatccag taacacgagc tggtgcttgc tagacacctt
54121 ttcaatgttt aatttttttg aaataagctt tgataaagcc ttcctcgcaa attccggata
54181 catgaacatg tcggcgacat gattaagtat tgtttttttca ttatttctc aacaagttct
54241 caatacccca atagatgata gaatatcacc caatgcgtcc atgttgtcta tttccaacag
54301 gtcgctatat ccaccaatag aagtttttcc aaaaaagatt ctaggaacag ttctaccacc
54361 agtaatttgt tcaaaatagt cacgcaattc attttcgggt ttaaattctt taatatcgac
54421 aatttcatac gctcctcttt tgaaactaaa cttatttaga atatccagtg catttctaca
54481 aaaaggacat gtatacttga caaaaattgt cacttgtgtta ttggccaacc tttgttgtac
54541 aaattcctcg gccatttttaa tatttaagtg atataaaact atctcgactt atttaactct
54601 ttagtcgaga tatatggacg cagategcta tatgatagcc aactacagaa ggcaaacgct
54661 ataaaaaaca taattacgac gagcatattt ataaatattt ttattcagca ttacttgata
54721 tagtaatatt aggcacagtc aaacattcaa ccactctcga tacattaact ctctcatttt
54781 ctttaacaaa ttctacaata tcttccgtaaa aagattcttg aaacttttta gaatatctat
54841 cgactctaga tgaaatagcg ttcgtcaaca tactatgttt tgtatacata aaggcgccca
54901 ttttaacagt ttctagtgac aaaatgctag cgatcctagg atcctttaga atcacataga
54961 ttgacgattc gtctctctta gtaactctag taaaataatc atacaatcta gtacgcgaaa
55021 taatattatc cttgacttga ggagatctaa acaatctagt tttgagaaca tcgataagtt
55081 catcgggaat gacatacata ctatctttaa tagaactctt ttcatccagt tgaatggatt
55141 cgtccttaac caactgatta atgagatctt ctatttatc attttccaga tgatatgtat
55201 gtccattaaa gttaaattgt gtagcgcttc tttttagtct agcagccaat actttaacat
55261 cactaatatc gatatacaaa ggagatgatt tatctatggt attaagaatt cgtttttcga
55321 catctgtcaa aaccaattcc tttttgcctg tatcatccag ttttccatcc tttgtaaaga
55381 aattattttc tactagacta ttaataagac tgataaggat tcctccataa ttgcacaatc
55441 caaacttttt aacaaaacta gactttacaa gatctacagg aatgcgtaat tcaggtttct
55501 tagcttgtga ttttttcttt tgtggacatt ttcttgtgac caactcatct accatttcat
```

FIG. 22 CONT'D

55561 tgattttagc agtgaaataa gctttcaatg cacgggcact gatactattg aaaacgagtt
55621 gatcttcaaa ttccgccatt taagttcacc aaacaacttt taaatacaaa tatatcaata
55681 gtagtagaat aagaactata aaaaaaataa taatttaacca ataccaaccc caacaaccgg
55741 tattattagt tgatgtgact gttttctcat cacttagaac agatttaaca atttctataa
55801 agtctgtcaa atcatcttcc ggagacccca taaatacacc aaatatagcg gcgtacaact
55861 tatccattta tacattgaat attggctttt ctttatgct atcttcatca tattcatcat
55921 caatatcaac aagtcccaga ttacgagcca gatcttcttc tacattttca gtcattgata
55981 cacgttcact atctccagag agtccgataa cgttagccac cacttctcta tcaatgatta
56041 gtttcttgag tgcgaatgta attttgtttt ccgttccgga tctatagaag acgataggtg
56101 tgataattgc cttggccaat tgtctttctc ttttactgag tgattctagt tcaccttcta
56161 tagatctgag aatggatgat tctccagtcg aaacatattc taccatggat ccgtttaatt
56221 tgttgatgaa gatggattca tcattaaatg ttttctctgt aatagtttcc accgaaagac
56281 tatgcaaaga atttggaatg cgttccttgt gcttaatgtt tccatagacg gcttctagaa
56341 gttgatacaa cataggacta gccgcggtaa cttttatttt tagaaagtat ccatcgcttc
56401 tatcttgttt agatttattt ttataaagtt tagtctctcc ttccaaccata ataaaagtgg
56461 aagtcatttg actagataaa ctatcagtaa gttttatagg gatagacgaa caattagcgt
56521 attgagaagc atttagtgta acgtattcga tacattttgc attagattta ctaatcgatt
56581 ttgcatactc tataacaccc gcacaagtct gtagagaatc gctagatgca gtaggtcttg
56641 gtgaagtttc aactctctcc ttgattacct tactcatgat taaacctaaa taattgtact
56701 ttgtaatata atgatatata ttttcacttt atctcatttg agaataaaaa tgtttttgtt
56761 taaccactgc atgatgtaca gatttcggaa tcgcaaacca ccagtggttt tattttatcc
56821 ttgtccaatg tgaattgaat gggagcggat gcgggtttcg tacgtagata gtacattccc
56881 gtttttagac cgagactcca tccgtaaaaa tgcatactcg ttagtttgga ataactcgga
56941 tctgctatat ggatattcat agattgactt tgatcgatga aggctcccct gtctgcagcc
57001 atttttatga tcgtcttttg tggaatttcc caaatagttt tataaactcg cttaatatct
57061 tctggaaggt ttgtattctg aatggatcca ccatctgcca taatcctatt cttgatctca
57121 tcattccata attttctctc ggttaaaact ctaaggagat gcggattaac tacttgaaat
57181 tctccagaca atactctccg agtgtaaata ttactggtat acggttccac cgactcatta
57241 tttcccaaaa tttgagcagt tgatgcagtc ggcataggtg ccaccaataa actatttcta
57301 agaccgtatg ttctgatttt atcttttaga ggttcccaat tccaaagatc cgacggtaca
57361 acattccaaa gatcatattg tagaataccg ttactggcgt acgatcctac atatgtatcg
57421 tatggtcctt ccttctcagc tagttcacaa ctcgcctcta atgcaccgta ataaatggtt
57481 tcgaagatct tcttatttag atcttgtgct tccaggctat caaatggata atttaagaga
57541 ataaacgcgt ccgctaatcc ttgaacacca ataccgatag gtctatgtct cttattagag
57601 atttcagctt ctggaatagg ataatcatta atatctataa ttttattgag atttctgaca
57661 attactttga ccacatcctt cagtttgaga aaatcaaatc gcccatctat tacaaacatg
57721 ttcaaggcaa cagatgccag attacaaacg gctacctcat tagcatccgc atattgtatt
57781 atcttcagtgc aaagattact acacttgata gttcctaaat tttgttgatt actcttttttg
57841 ttacacgcat ccttataaag aatgaatgga gtaccagttt caatctgaga ttctataatc
57901 gctttccaga cgactcgagc ctttattata gatttgtatc tccttttctt ttcgtatagt
57961 gtatacaatc gttcgaactc gtctccccaa acattgtcca atccaggaca ttcatccgga
58021 cacatcaacg atcactctcc gtcatcattc attcgttcca taaagagatc aggaatccaa
58081 agagctataa atagatctct ggttctatgt tcctcgtttc ctgtattctt tttaagatcg
58141 aggaacgcca taatatcaga atgccacggt tccaagtata tggccataac tccaggccgt
58201 ttgttttcctc cctgatctat gtatctagcg gtgttattat aaaatctcaa cattggaata
58261 ataccgtttg atataccatt ggtaccggag atatagcttc cactggcacg aatattacta
58321 attgatagac ctattccccc tgccatttta gagattaatg cgcatcgttt taacgtgtca
58381 tagatacccct ctatgctatc atcgatcatg ttaagtagaa aacagctaga catttggtga
58441 cgactagttc acgcattaaa taaggtagga gaagcgtgcg taaaccattt ttcagaaagt
58501 agattgtacg tctcaatagc tgagtctata tcccattgat gaattcctac tgcgacacgc
58561 attaacatgt gctgaggtct ttcaacgatc ttgttgttta ttttcaacaa gtaggatttt
58621 tccaaagttt taaaaccaaa atagttgtat gaaaagtctc gttcgtaaat aataaccgag
58681 ttgagtttat ccttatattt gttaactata tccatggtga tacttgaaat aatcggagaa
58741 tgtttcccat ttttaggatt aacatagttg aataaatcct ccatcacttc actaaatagt
58801 ttttttgttt ccttgtgtag atttgatacg gctattctgg cggctagaat ggcataatcc
58861 ggatgttgtg tagtacaagt ggctgctatt tcggctgcca gagtgtccaa ttctaccgtt
58921 gttactccat tatatattcc ttgaataacc ttcatagcta ttttaatagg atctatatga
58981 tccgtgttta agccataaca taatttttcta atacgagacg tgatttttatc aaacatgaca
59041 ttttccttgt atccatttcg tttaatgaca aacatttttg ttggtgtaat aaaaaaaatt
59101 atttaacttt tcattaatag ggatttgacg tatgtagcgt acaaaattat cgttcctggt
59161 atatagataa agagtcctat atatttgaaa atcgttacgg ctcgattaaa ctttaatgat
59221 tgcatagtga atatatcatt aggatttaac tccttgacta tcatggcggc gccagaaatt

FIG. 22 CONT'D

```
59281 accatcaaaa gcattaatac agttatgccg atcgcagtta gaacggttat agcatccacc
59341 atttatatct aaaaattaga tcaaagaata tgtgacaaag tcctagttgt atactgagaa
59401 ttgacgaaac aatgtttctt acatatttct tttttattag taaccgactt aatagtagga
59461 actggaaaac tagacttgat tattctataa gtatagatac ccttccaaat aatattctct
59521 ttgataaaag ttccagaaaa tgtagaattt tttaaaaagt tatcttttgc tattaccaag
59581 attgtgttta gacgcttatt attaatatga gtgatgaaat ccacaccgcc tctagatatc
59641 gcttttattt ccacattaga tggtaaatcc aatagtgaaa ctatcttttt aggaatgtat
59701 ggactcgcgt ttagaggagt gaacgtctta ggcgtcggaa aggatgattc atcaaacgaa
59761 taaacaattt cacaaatgga tgttaatgta ttagtaggaa atttttgac gctagtggaa
59821 ttgaagattc taatggatga tgttctacct atttcatccg ataacatgtt aatttccgac
59881 accaacggtt ttaatatttc gatgatatac ggtagtctct ctttcggact tatatagctt
59941 attccacaat acgagtcatt atatactcca aaaaacaaaa taactagtat aaaatctgta
60001 tcgaatggga aaaacgaaat tatcgacata ggtatagaat ctggaacatt gaacgtatta
60061 atacttaatt cttttctgt ggtaagtacc gataggttat tgacattgta tggttttaaa
60121 tattctataa cttgagactt gatagatatt agtgatgaat tgaaaattat ttttatcacc
60181 acgtgtgttt caggatcatc gtcgacgccc gtcaaccaac cgaatggagt aaaataaata
60241 tcattaatat atgctctaga tattagtatt tttatcaatc ctttgattat catcttctcg
60301 taggcgaatg attccatgat caagagtgat ttaagaacat cctccggagt attaatgggc
60361 ttagtaaaca gtccatcgtt gcaatatata aagttatcca agttaaagga tattatgcat
60421 tcgtttaaag atatcacctc atctgacgga gacaattttt tggtaggttt tagagacttt
60481 gaagctactt gtttaacaaa gttattcatc gtcgtttact attctattta attttgtagt
60541 taatttatca catatcacat taattgactt tttggtccat tttccatac gtttatattc
60601 ttttaatcct gcgttatccg tttccgttat atccagggat agatcttgca agttaaatag
60661 aatgctctta aataatgtca ttttcttatc cgctaaaaat ttaaagaatg tataaaccct
60721 tttcagagat ttgaaactct taggtggtgt cctagtacac aatatcataa acaaactaat
60781 aaacattcca cattcagatt ccaacagctg attaacttct acattaatac agcctatttt
60841 cgctccaaat gtacattcga aaaatctgaa taaaacatcg atgtcacaat ttgtattatc
60901 caatacagaa tgtttgtgat tcgtgttaaa accatcggag aaggaataaa aataaaaatt
60961 attatagtgg tggaattcag ttggaatatt gcctccggag tcataaaagg atactaaaca
61021 ttgtttttta tcataaatta cacatttcca atgagacaaa taacaaaatc caaacattac
61081 aaatctagag gtagaacttt taattttgtc tttaagtata tacgataaga tatgtttatt
61141 cataaacgcg tcaaatttct catgaatcgc taaggagttt aagaatctca tgtcaaattg
61201 tcctatataa tccacttcgg atccataagc aaactgagag actaagttct taatacttcg
61261 attgctcatc caggctcctc tctcaggctc tattttcatc ttgacgacct ttggatttcc
61321 accagtatgt attcctttac gtgataaatc atcgatttcc aaatccattt gtgagaagtc
61381 tatcgcctta gatacttttt cccgtagtcg aggtttaaag aaatacgcta acggtatact
61441 agtaggtaac tcaaagacat catatataga atggtaacgc gtctttaact cgtcggttaa
61501 ctctttcttt tgatcgagtt cgtcgctact attgggtctg ctcaggtgcc ccgactctac
61561 tagttccaac atcataccga taggaatata agacactttg ccggcggttg tagatttatc
61621 atatttctcc actacatatc cgttacaatt tgttaaaaat ttagatacat ctatattgct
61681 acataatcca gctagtgaat atatatgaca taataaattg gtaaatccta gttctggtat
61741 tttactaatt actaaatctg tatatctttc catttatcat ggaaaagaat ttaccagata
61801 tcttctttct tccaaactgc gttaatgtat tctcttacaa atattcacaa gatgaattca
61861 gtaatatgag taaaacggaa cgtgatagtt tctcattggc ggtgtttcca gttataaaac
61921 atagatggca taacgcacac gttgtaaaac ataaaggaat atacaaagtt agtacagaag
61981 cacgtggaaa aaaagtatct cctccatcac taggaaaacc cgcacacata aacctaaccg
62041 cgaagcaata tatatacagt gaacacacaa taagctttga atgttatagt tttctaaaat
62101 gtataacaaa tacagaaatc aattcgttcg atgagtatat attaagagga ctattagaag
62161 ctggtaatag tttacagata ttttccaatt ccgtaggtaa acgaacagat actataggtg
62221 tactagggaa taagtatcca tttagcaaaa ttccattggc ctcattaact cctaaagcac
62281 aacgagagat attttcagcg tggatttctc atagacctgt agttttaact ggaggaactg
62341 gagtgggtaa gacgtcacag gtacccaagt tattgctttg gtttaattat ttatttggtg
62401 gattctctac tctagataaa atcactgact ttcacgaaag accagtcatt ctatctcttc
62461 ctaggatagc tttagttaga ttgcatagca ataccatttt aaaatcattg ggatttaagg
62521 tactagatgg atctcctatt tctttacggt acggatctat accggaagaa ttaataaaca
62581 aacaaccaaa aaaatatgga attgtatttt ctacccataa gttatctcta acaaaactat
62641 ttagttatgg cactcttatt atagacgaag ttcatgagca tgatcaaata ggagatatta
62701 ttatagcagt agcgagaaag catcatacga aaatagattc tatgttttta atgactgcca
62761 cgttagagga tgacagggaa cggctaaaag tatttttacc taatcccgca tttatacata
62821 ttcctggaga tacactgttt aaaattagcg aggtatttat tcataataag ataaatccat
62881 cttccagaat ggcatacata gaagaagaaa agagaaattt agttactgct atacagatgt
62941 atactcctcc tgatggatca tccggtatag tctttgtggc atccgttgca cagtgtcacg
```

FIG. 22 CONT'D

63001 aatataaatc atatttagaa aaaagattac cgtatgatat gtatattatt catggtaagg
63061 tcttagatat agacgaaata ttagaaaaag tgtattcatc acctaatgta tcgataatta
63121 tttctactcc ttatttggaa tccagcgtta ctatacgcaa tgttacacac atttatgata
63181 tgggtagagt ttttgtcccc gctcctttg gaggatcgca agaatttatt tctaaatcta
63241 tgagagatca acgaaaagga agagtaggaa gagttaatcc tgggacatac gtatatttct
63301 atgatctgtc ttatatgaag tctatacagc gaatagattc agaatttcta cataattata
63361 tattgtacgc taataagttt aatctaacac tccccgaaga tttgtttata atcoctacaa
63421 atttggatat tctatggcgt acaaaggaat atatagacte gttcgatatt agtacagaaa
63481 catggaataa attattatcc aattattata tgaagatgat agagtatgct aaactttatg
63541 tactaagtcc tattctcgct gaggagttgg ataattttga gaggacggga gaattaacta
63601 gtattgtaca agaagccatt ttatctctaa atttacgaat taagatttta aattttaaac
63661 ataaagatga tgatacgtat atacactttt gtaaaatatt attoggtgtc tataacggaa
63721 caaacgctac tatatattat catagacctc taacgggata tatgaatatg atttcagata
63781 ctatatttgt tcctgtagat aataactaaa aatcaaactc taatgaccac atctttttct
63841 agagatgaaa aattttccac atctccttct gtagacacga ctaaacattt tgcagaaaaa
63901 agtttattag tgtttagata atcgtatact tcatcagtgt agatagtaaa tgtgaacaga
63961 taaaaggtat tcttgctcaa tagattggta aattccatag aatatattaa tcctttcttc
64021 ttgagatccc acatcatttc aaccagagac gttttatcca atgatttacc tcgtactata
64081 ccacatacaa aactagattt tgcagtgacg tcgtatctgg tattcctacc aaacaaaatt
64141 ttacttttag ttctttaga aaattctaag gtagaatctc tatttgccaa tatgtcatct
64201 atggaattac cactagcaaa aaatgataga aatatatatt gatacatcgc agctggtttt
64261 gatctactat actttaaaaa cgaatcagat tccataattg cctgtatatc atcagctgaa
64321 aaactatgtt ttacacgtat tccttcggca tttcttttta atgatatatc ttgtttagac
64381 aatgataaag ttatcatgtc catgagagac gcgtctccgt atcgtataaa tatttcatta
64441 gatgttagac gcttcattag gggtatactt ctataaggtt tcttaatcag tccatcattg
64501 gttgcgtcaa gaactactat cggatgttgt tgggtatctc tagtgttaca catggccttа
64561 ctaaagtttg ggtaaataac tatgatatct ctattaatta tagatgcata tatttcattt
64621 gtcaaggata ttagtatcga cttgctatcg tcattaatac gtgtaatgta atcatataaa
64681 tcatgcgata gccaaggaaa atttaaatag atgttcatca tataatcgtc gctataattc
64741 atattaatac gttgacattg actaatttgt aatatagcct cgccacgaag aaagctctcg
64801 tattcagttt catcgataaa ggatacogtt aaatataact ggttgccgat agtctcatag
64861 tctattaagt ggtaagtttc gtacaaatac agaatcccta aaatattatc taatgttgga
64921 ttaatcttta ccataactgt ataaaatgga gacggagtca taactatttt accgtttgta
64981 cttactggaa tagacgaagg aataatctcc ggacatgctg gtaaagaccc aaatgtctgt
65041 ttgaagaaat ccaatgttcc aggtcctaat ctcttaacaa aaattacgat attcgatccc
65101 gatatcctit gcattctatt taccagcata tcacgaacta tattaagatt atctatcatg
65161 tctattctcc cacogttata taaatogcct ccgctaagaa acgttagtat atccatacaa
65221 tggaatactt catttctaaa atagtattcg ttttctaatt ctttaatgtg aaatcgtata
65281 ctagaaaggg aaaaattatc tttgagtttt ccgttagaaa agaaccacga aactaatgtt
65341 ctgattgcgt ccgattccgt tgctgaatta atggatttac accaaaaact catataactt
65401 ctagatgtag aagcattcgc taaaaaatta gtagaatcaa aggatataag tagatgttcc
65461 aacaagtgag caattcccaa gatttcatct atatcattct cgaatccgaa attagaaatt
65521 cccaagtaga tatcctttit catccgatcg ttgatgaaaa tacgaacttt attcggtaag
65581 acaatcattt actaaggagt aaaataggaa gtaatgttcg tatgtcgtta tcatcgtata
65641 aattaaaggt gtgtttttta ccattaagtg acattataat tttaccaata ttggaattat
65701 aatataggtg tatttgcgca ctcgccacgg ttgatgcatc ggtaaatata gctgtatcta
65761 atgttctagt cggtatttca tcatttcgct gtctaataat agcgttttct ctatctgttt
65821 ccattacagc tgcctgaagt ttattggtcg gataatatgt aaaataataa gaaatacata
65881 cgaataacaa aaataaaata agatataata aagatgccat ttagagatct aattttgttt
65941 aacttgtcca aattcctact tacagaagat gaggaatcgt tggagatagt gtcttccttа
66001 tgtagaggat ttgaaatatc ttatgatgac ttgataactt actttccaga taggaaatac
66061 cataaatata tttctaaagt atttgaacat gtagatttat cggaggaatt aagtatggaa
66121 ttccatgata caactctgag agatttagtc tatcttagat tgtacaagta ttccaagtgt
66181 atacggccgt gttataaatt aggagataat ctaaaaggca tagttgttat aaaggacagg
66241 aatatttata ttagagaagc aaatgatgac ttgatagaat atctcctcaa ggaatacact
66301 cctcagattt atacatattc taatgagcgc gtccccataa ctggttcaaa attaattctt
66361 tgtggatttt ctcaagttac atttatggcg tatacaacgt cgcatataac aacaaataaa
66421 aaggtagatg ttctcgtttc caaaaaatgt atagatgaac tagtcgatcc aataaattat
66481 caaatacttc aaaatttatt tgataaagga agcggaacaa taaacaaaat actcaggaag
66541 atattttatt cggtaaccgg tggccaaact ccataatttg cttttctcat ttcggatttt
66601 agaatttcca aattcaccag cgatttatcg gttttggtga aatccaagga tttattaatg
66661 tccacaaatg ccatttgttt tgtctgtgga ttgtatttga aaatggaaac gatgtagtta

FIG. 22 CONT'D

```
66721 gatagatgcg ctgcaaagtt tcctattagg gttccgcgct ttacgtcacc cagcatactt
66781 gaatcaccat cctttaaaaa aaatgataag atatcaacat ggagtatatc atactcggat
66841 tttaattctt ctactgcatc actgacattt tcacaaatac tacaatacgg tttaccgaaa
66901 ataatcagta cgttcttcat ttatgcgtat caaaaactta aaatcgttac tgctggaaaa
66961 taaatcactg acgatattag atgataattt atacaaagta tacaatggaa tatttgtgga
67021 tacaatgagt atttatatag ccgtcgccaa ttgtgtcaga aacttagaag agttaactac
67081 ggtattcata aaatacgtaa acggatgggt aaaaaaggga gggcatgtaa ccctttttat
67141 cgatagagga agtataaaaa ttaaacaaga cgttagagac aagagacgta aatattctaa
67201 attaaccaag gacagaaaaa tgctagaatt agaaaagtgt acatccgnaa tacaaaatgt
67261 taccggattt atggaagaag aaataaaggc agaaatgcaa ttaaaaatcg ataaactcac
67321 atttcaaata tatttatctg attctgataa cataaaaata tcattgaatg agatactaac
67381 acatttcaac aataatgaga atgttacatt attttattgt gatgaacgag acgcagaatt
67441 cgttatgtgt ctcgaggcta aaacacattt ctctaccaca ggagaatggc cgttgataat
67501 aagtaccgat caggatacta tgctatttgc atctactgat aatcatccta agatgataaa
67561 aaacttaact caactgttta aatttgttcc ctcggcagag gataactatt tagcaaaatt
67621 aacggcgtta gtgaatggat gtgatttctt tcctggactc tatggggcat ctataacacc
67681 caccaactta aacaaaatac aattgtttag tgattttaca atcgataata tagtcactag
67741 tttggcaatt aaaaattatt atagaaagac taactctacc gtagacgtgc gtaatattgt
67801 tacgtttata aacgattacg ctaatttaga cgatgtctac tcgtatgttc ctccttgtca
67861 atgcactgtt caagaattta tattttccgc attagatgaa aaatggaaca attttaaatc
67921 atcttattta gagaccgttc cgttaccctg ccaattaatg tatgcattag aaccacgcaa
67981 ggagattgat gtttcagaag ttaaaacttt atcatcttat atagatttcg aaaatactaa
68041 atcagatatc gatgttataa aatctatatc ttcgatcttc ggatattcta acgaaaactg
68101 taacactata gtgttcggca tctataagga taatttacta ctgagtataa atagttcatt
68161 ttactttaac gatagtctgt taataaccaa tactaaaagt gataatataa taaatatagg
68221 ttactagatt aaaaatggtg ttccaactcg tgtgctctac gtgcggcaaa gatatttctc
68281 acgaacgata taaattgatt atacgaaaaa aatcattaaa ggatgtactc gtcagtgtaa
68341 agaacgaatg ttgtaggtta aaattatcta cacaaataga acctcaacgt aacttaacag
68401 tgcaacctct attggatata aactaatatg gatccggtta attttatcaa gacatatgcg
68461 cctagaggtt ctattatttt tattaattat accatgtcat taacaagtca tttgaatcca
68521 tcgatagaaa aacatgtggg tatttattat ggtacgttat tatcggaaca cttggtagtt
68581 gaatctacct atagaaaagg agttcgaata gtcccattgg atagtttttt tgaaggatat
68641 cttagtgcaa aagtatacat gttagagaat attcaagtta tgaaaatagc agctgatacg
68701 tcattaactt tattgggtat tccgtatgga tttggtcata atagaatgta ttgttttaaa
68761 ttggtagctg aatgttataa aaatgccggt attgatacat cgtctaaacg aatattaggt
68821 aaagatattt ttctgagcca aaacttcaca gatgataata gatggataaa gatatatgat
68881 tctaataatt taacattttg gcaaattgat taccttaaag ggtgagttaa tatgcataac
68941 tactcctccg ttgttttttc cctcgttctt tctcttaacg ttgtttgcca tcactctcat
69001 aatgtaaaga tattctaaaa tggtaaactt ttgcatatcg gacgcagaaa ttggtataaa
69061 tgttgtaatt gtattatttc ccgtcaatgg actagtcaca gctccatcag ttttatatcc
69121 tttagagtat ttctcactcg tgtctaacat tctagagcat tccatgatct gtttatcgtt
69181 gatattggcc ggaaagatag atttttttatt ttttattata ttactattgg caattgtaga
69241 tataacttct ggtaaatatt tttctacctt ttcaatctct tctattttca agccggctat
69301 atattctgct atattgttgc tagtatcaat accttttctg gctaagaagt catatgtggt
69361 attcactata tcagttttaa ctggtagttc cattagcctt tccacttctg cagaataatc
69421 agaaattggt tctttaccag aaaatccagc tactataata ggctcaccga tgatcattgg
69481 caaaatccta tattgtacca gattaatgag agcatatttc atttccaata attctgctag
69541 ttcttgagac attgatttat ttgatgaatc tagttggttc tctagatact ctaccatttc
69601 tgccgcatac aataacttgt tagataaaat cagggttatc aaaagtgttta gcgcggctag
69661 aatagtgggc ttgcatgtat taaagaatgc ggtagtatga gtaaaccgtt ttaacgaatt
69721 atatagtctc cagaaatctg tggcgttacs tacatgagcc gaatgacatc gaagattgtc
69781 caatattttt aatagctgct ctttgtccat tatttctata tttgactcgc aacaattgta
69841 gataccatta atcactgatt ccttttcgga tgccggacaa tagcacaatt gtttagcttt
69901 ggactctatg tattcagaat taatagatat atctctcaat acagattgca ctatacattt
69961 tgaaactatg tcaaaaattg tagaacgacg ctgttctgca gccatttaac tttaaataat
70021 ttacaaaaat ttaaaatgag catccgtata aaaatcgata aactgcgcca aattgtggca
70081 tatttttcag agttcagtga agaagtatct atcaaatgtag actcgacgga tgagttaatg
70141 tatatttttg ccgccttggg cggatctgta aacatttggg ccattatacc tctcagtgca
70201 tcagtgttct accgcggagc cgaaaacatt gtgtttaatc ttcctgtgtc caaggtaaaa
70261 tcgtgtttgt gtagttttca caatgatgcc atcatagata tagaacctga tctggaaaat
70321 aatctagtaa aacttttctag ttatcatgta gtaagtgtcg attgtaacaa ggaactgatg
70381 cctattagga cagatactac tatttgtcta agtatagatc aaaagaaatc ttacgtgttt
```

FIG. 22 CONT'D

70441 aattttcaca agtatgaaga aaaatgttgt ggtagaaccg tcattcattt agaatggttg
70501 ttgggcttta tcaagtgtat tagtcagcat cagcatttgg ctattatgtt taaagatgac
70561 aatattatta tgaagactcc tggtaatact gatgcgtttt ccagggaata ttctatgact
70621 gaatgttctc aagaactaca aaagttttct ttcaaaatag ctatctcgtc tctcaacaaa
70681 ctacgaggat tcaaaaagag agtcaatgtt tttgaaacta gaatcgtaat ggataatgac
70741 gataacattc taggaatgtt gttttcggat agagttcaat cctttaagat caacatcttt
70801 atgacgtttt tagattaata ctttcaatga gataaatatg ggtggcagag taagtgttga
70861 gctacctaaa cgggatccgc ctccgggagt acccactgat gagatgttat taaacgtgga
70921 taaaatgcat gacgtgatag ctcccgctaa gcttttagaa tatgtgcata taggaccact
70981 agcaaaagat aaagaggata aagtaaagaa aagatatcca gagtttagat tagtcaacac
71041 aggacccggt ggtctttcgg cattgttaag acaatcgtat aatggaaccg cacccaattg
71101 ctgtcgcact tttaatcgta ctcattattg gaaaaaggat ggaaagatat cagataagta
71161 tgaagagggt gcagtattag aatcgtgttg gccagacgtt cacgacactg gaaaatgcga
71221 tgttgattta ttcgactggt gtcaggggga tacgttcgat agaaacatat gccatcagtg
71281 gatcggttca gcctttaata ggagtgatag aactgtagag ggtcaacaat cgttaataaa
71341 tctgtataat aagatgcaaa cattatgtag taaagatgct agtgtaccaa tatgtgaatc
71401 atttttgcat catttacgcg cacacaatac agaagatagc aaagagatga tcgattatat
71461 tctaagacaa cagtctgcgg actttaaaca gaaatatatg agatgtagtt atcccactag
71521 agataagtta gaagagtcat taaaatatgc ggaacctcga gaatgttggg atccagagtg
71581 ttcgaatgcc aatgttaatt tcttactaac acgtaattat aataatttag gactttgcaa
71641 tattgtacga tgtaatacta gcgtgaacaa cttacagatg gataaaactt cctcattaag
71701 attgtcatgt ggattaagca atagtgatag attttctact gttcccgtca atagagcaaa
71761 agtagttcaa cataatatta aacattcgtt cgacctaaaa ttgcatttga tcagtttatt
71821 atctctcttg gtaatatgga tactaattgt agctatttaa atgggtgccg cggcaagcat
71881 acagacgacg gtgaatacac tcagcgaacg tatctcgtct aaattagaac aagaagcgaa
71941 cgctagtgct caaacaaaat gtgatataga aatcggaaat ttttatatcc gacaaaacca
72001 tggatgtaac ctcactgtta aaaatatgtg ctctgcggac gcggatgctc agttggatgc
72061 tgtgttatca gccgctacag aaacatatag tggattaaca ccggaacaaa aagcatacgt
72121 accagctatg tttactgctg cgttaaacat tcagacgagt gtaaacactg ttgttagaga
72181 ttttgaaaat tatgtgaaac agacttgtaa ttctagcgcg gtcgtcgata acaaattaaa
72241 gatacaaaac gtaatcatag atgaatgtta cggagcccca ggatctccaa caaatttgga
72301 atttattaat acaggatcta gcaaaggaaa ttgtgccatt aaagcgttga tgcaattgac
72361 gactaaggcc actactcaaa tagcacctag acaagttgct ggtacaggag ttcagtttta
72421 tatgattgtt atcggtgtta taatattggc agcgttgttt atgtactatg ccaagcgtat
72481 gttgttcaca tccaccaatg ataaaatcaa acttatttta gccaataagg aaaacgtcca
72541 ttggactact tacatggaca cattctttag aacttctccg atggttattg ctaccacgga
72601 tatgcaaaac tgaaaatata ttgataatat tttaatagat taacatggaa gttatcgctg
72661 atcgtctaga cgatatagtg aaacaaaata tagcggatga aaaatttgta gattttgtta
72721 tacacggtct agagcatcaa tgtcctgcta tacttcgacc attaattagg ttgtttattg
72781 atatactatt atttgttata gtaatttata tttttacggt acgtctagta agtagaaatt
72841 atcaaatgtt gttggcgttg gtggcgctag tcatcacatt aactattttt tattacttta
72901 tactataata gtactagact gacttctaac aaacatctca cctgccataa ataaatgctt
72961 gatattaaag tcttctattt ctaacactat tccatctgtg gaaaataata ctctgacatt
73021 atcgctaatt gacacatcgg tgagtgatat gcctataaag taataatctt ctttgggcac
73081 atataccagt gtaccaggtt ctaacaacct atttactggt gctcctgtag catacttttt
73141 ctttaccttg agaatatcca tcgtttgctt ggtcaatagc gatatgtgat tttttatcaa
73201 ccactcaaaa aagtaattgg agtgttcata tcctctacgg gctattgtct catggccgtg
73261 tatgaaattt aagtaacacg actgtggtag atttgttcta tagagccggt tgccgcaaat
73321 agatagaact accaatatgt ctgtacaaat gttaaacatt aattgattaa cagaaaaaac
73381 aatgttcgtt ctgggaatag aaaccagatc aaaacaaaat tcgttagaat atatgccacg
73441 tttatacatg gaatataaaa taactacagt ttgaaaaata acagtatcat ttaaacattt
73501 aacttgcggg gttaatttca caactttact gttttaaaac tgttcaaaat atagcatcga
73561 tccatgagaa atacgtttag ccgcctttag tagaggaaat cccaccgcct ttctggatct
73621 caccaacgac gatagttctg accagcaact tatttcttca tcatccacct gttttaacat
73681 ataataggca ggagatagat atccgtcatt gcaatattcc ttttcgtagg cacacaatct
73741 aatattgata aaatctccat tctcttctct gcatttatta tcttgtttcg gtggctgatt
73801 aggctgtagt cttggtttag gctttggtat atcgttgttg aatctatttt ggtcattaaa
73861 tctttcattt cttcctggta tatttctatc acctcgtttg gttggatttt tgtctatatt
73921 atcgtttgta acatcggtac gggtattcat ttatcacaaa aaaaacttct ctaaatgagt
73981 ctactgctag aaaacctcat cgaagaagat accatatttt ttgcaggaag tatatctgag
74041 tatgatgatt tacaaatggt tattgccggc gcaaaatcca aatttccaag atctatgctt
74101 tctatttttа atatagtacc tagaacgatg tcaaaatatg agttggagtt gattcataac

FIG. 22 CONT'D

```
74161 gagaatatca cagggcaat gtttaccaca atgtataata taagaaacaa tttgggtcta
74221 ggagatgata aactaactat tgaagccatt gaaaactatt tcttggatcc taacaatgag
74281 gttatgccta ttatcattaa taatacggat atgactgccg tcattcctaa aaaaagtggt
74341 aggagaaaga ataagaacat ggttattttc cgtcaaggat catcacctat cttgtgtatt
74401 ttcgaaactc gtaaaaagat taatatttat aaagaaaata tggaatccgc gtcgactgag
74461 tatacaccta tcggagacaa caaggctttg atatctaaat atgcgggaat taatgtcctg
74521 aatgtgtatt ctccttccac atccatgaga ttgaatgcca tttacggatt caccaataaa
74581 aataaactag agaaacttag tactaataag gaactagaat cgtatagttc tagcctctt
74641 caagaaccca ttaggttaaa tgattttctg ggactattgg aatgtgttaa aaagaatatt
74701 cctctaacag atattccgac aaaggattga ttactataaa tggagaatgt tcctaatgta
74761 tactttaatc ctgtgtttat agagcccacg tttaaacatt ctttattaag tgtttgtatt
74821 cacagattaa tagttttatt tgaagtattc attgtattca ttctaatata tgtatttttt
74881 agatctgaat taaatatgtt cttcatgcct aaacgaaaaa tacccgatcc tattgataga
74941 ttacgacgtg ctaatctagc gtgtgaagac gataaattaa tgatctatgg attaccatgg
75001 atgacaactc aaacatctgc gttatcaata aatagtaaac cgatagtgta taaagattgt
75061 gcaaagcttt tgcgatcaat aaatggatca caaccagtat ctcttaacga tgttcttcgc
75121 agatgatgat tcatttttta agtatttggc tagtcaagat gatgaatctt cattatctga
75181 tatattgcaa atcactcaat atctagactt tctgttatta ttattgatcc aatcaaaaaa
75241 taaattagaa gccgtgggtc attgttatga atctctttca gaggaataca gacaattgac
75301 aaaattcaca gactttcaag attttaaaaa actgtttaac aaggtcccta ttgttacaga
75361 tggaagggtc aaacttaata aaggatattt gttcgacttt gtgattagtt tgatgcgatt
75421 caaaaaagaa tcctctctag ctaccaccgc aatagatcct attagataca tagatcctcg
75481 tcgcgatatc gcattttcta acgtgatgga tatattaaag tcgaataaag tgaacaataa
75541 ttaattcttt attgtcatca tgaacggcgg acatattcag ttgataatcg gccccatgtt
75601 ttcaggtaaa agtacagaat taattagacg agttagacgt tatcaaatag ctcaatataa
75661 atgcgtgact atagaatatt ctaacgataa tagatacgga acgggactat ggacgcatga
75721 taagaataat tttgaagcat tggaagcaac taaactatgt gatgtcttgg aatcaattac
75781 agattttctc gtgataggta tcgatcaagg acagttcttt ccagacattg ttgaattctg
75841 tgagcgtatg gcaaacgaag gaaaaatagt tatagtagcc gcactcgatg ggacatttca
75901 acgtaaaccg tttaataata ttttgaatct tattccatta tctgaaatgg tggtaaaact
75961 aactgctgtg tgtatgaaat gctttaagga ggcttccttt tctaaacgat tgggtgagga
76021 aaccgagata gagataatag gaggtaatga tatgtatcaa tcggtgtgta gaaagtgtta
76081 cgtcggctca taatatttat ttttttatct aaaaaactaa aaataaacat tgattaaatt
76141 ttaatataat acttaaaaat ggatgttgtg tcgttagata aaccgtttat gtattttgag
76201 gaaattgata atgagttaga ttacgaacca gaaagtgcaa atgaggtcgc aaaaaaactg
76261 ccgtatcaag gacagttaaa actattacta ggagaattat tttttcttag taagttacag
76321 cgacacggta tattagatgg tgccacgcta gtgtatatag gatctgctcc cggtacacat
76381 atacgttatt tgagagatca tttctataat ttaggagtga tcatcaaatg gatgctaatt
76441 gacggccgcc atcatgatcc tatttttaaat ggattgcgtg atgtgactct agtgactcgg
76501 ttcgttgatg aggaatatct acgatccatc aaaaaacaac tgcatccttc taagattatt
76561 ttaatttctg atgtgagatc caaacgagga ggaaatgaac ctagtacggc ggatttacta
76621 agtaattacg ctctacaaaa tgtcatgatt agtattttaa accccgtggc gtctagtctt
76681 aaatggagat gcccgtttcc agatcaatgg atcaaggact tttatatccc acacggtaat
76741 aaaatgttac aaccttttgc tccttcatat tcagctgaaa tgagattatt aagtatttat
76801 accggtgaga acatgagact gactcgagtt accaaatcag acgctgtaaa ttatgaaaaa
76861 aagatgtact accttaataa gatcgtccgt aacaaagtag ttgttaactt tgattatcct
76921 aatcaggaat atgactattt tcacatgtac tttatgctga ggaccgtgta ctgcaataaa
76981 acatttccta ctactaaagc aaaggtacta tttctacaac aatctatatt tcgtttctta
77041 aatattccaa caacatcaac tgaaaaagtt agtcatgaac caatacaacg taaaatatct
77101 agcaaaaatt ctatgtctaa aaacagaaat agcaagagat ccgtacgcag taataaatag
77161 aaacgtacta ctgagatata ctaccgatat agagtataat gatttagtta ctttaataac
77221 cgttagacat aaaattgatt ctatgaaaac tgtgtttcag gtatttaacg aatcatccat
77281 aaattatact ccggttgatg atgattatgg agaaccaatc attataacat cgtatcttca
77341 aaaaggtcat aacaagtttc ctgtaaattt tctatacata gatgtggtaa tatctgactt
77401 atttcctagc tttgttagac tagatactac agaaactaat atagttaata gtgtactaca
77461 aacaggcgat ggtaaaaaga ctcttcgtct tcccaaaatg ttagagacgg aaatagttgt
77521 caagattctc taccgtccta atataccatt aaaaattgtt agatttttcc gcaataacat
77581 ggtaactgga gtagagatag ccgatagatc tgttatttca gtcgctgatt aatcaattag
77641 tagagatgag ataagaacat tataataatc aataatatat tttatatctt atatcttgtt
77701 tagaaaaatg ctaatattaa aatagctaac gctagtaatc caatcggaag ccatttgata
77761 tctataatag ggtatctaat ttcctgattc agatagcgga cagctatatt ctcggtagct
77821 actcgtttgg aatcacaaac attatttaca tctaatttac tatctgtaat ggaaacgttt
```

FIG. 22 CONT'D

77881 cccaatgaaa tggtacaatc cgatacattg cattttgtta tatttttttt taaagaggct
77941 ggtaacaacg catcgcttcg tttacatggc tcgtaccaac aataatagcg taatcttgtt
78001 tctattccta tccgtactat gcttttatca ggataaatac atttacatcg tatatcgtct
78061 ttgttagcat cacagaatgc ataaatttgt tcgtccgtca tgataaaaat ttaaagtgta
78121 aatataacta ttatttttata gttgtaataa aaagggaaat ttgattgtat actttcggtt
78181 ctttaaaaga aactgacttg ataaaaatgg ctgtaatctc taaggttacg tatagtctat
78241 atgatcaaaa agagattaat gctacagata ttatcattag tcatgttaaa aatgacgacg
78301 atatcggtac cgttaaagat ggtagactag gtgctatgga tggggcatta tgtaaaactt
78361 gtgggaaaac ggaattggaa tgtttcggtc actggggtaa agtaagtatt tataaaactc
78421 atatagttaa gcctgaattt atttcagaaa ttattcgttt actgaattat atatgtattc
78481 actgcggatt attgcgttca cgagaacgct attccgacga tattaaccta aaagagttat
78541 cgggacacgc tcttaggaga ttaaaggata aaatattatc caagaaaaag tcatgttgga
78601 acagtgaatg tatgcaaccg tatcaaaaaa ttactttttc aaagaaaaag gtttgtttcg
78661 tcaacaagtt ggatgatatt aacgttccta attctctcat ctatcaaaag ttaatttcta
78721 ttcatgaaaa gttttggcca ttattagaaa ttcatcaata tccagctaac ttattttata
78781 cagactactt tcccatccct ccgttgatta ttagaccggc tattagtttt tggatagata
78841 gtataccaaa agaaaccaat gaattaactt acttattagg tatgatcgtt aagaattgta
78901 acttgaatgc tgatgaacag gttatccaga aggcggtaat agaatacgat gatattaaaa
78961 ttatttctaa taacacttcc agtatcaatt tatcatatat cacatccggc aaaaataata
79021 tgattagaag ttatatcgtc gcccggcgaa aagatcagac cgctagatct gtaattggtc
79081 ccagtacatc tatcaccgtt aatgaggtag gaatgcccgc atatattaga aatacactta
79141 cagaaaagat atttgttaat gcctttacag tggataaagt taaacaacta ttagcgtcaa
79201 accaagttaa attttacttt aataaacgat taaaccaatt aacaagaata cgccaaggaa
79261 agtttatcaa aaataaaata catttattgc ctggtgattg ggtagaagta gctgttcaag
79321 aatatacaag tattattttt ggaagacagc cgtctctaca tagatacaac gtcatcgctt
79381 catctatcag agctaccgaa ggagatacta tcaaaatatc tcccggaatt gtcaactctc
79441 aaaatgctga tttcgacgga gatgaagaat ggatgatatt ggagcaaaat cctaaagccg
79501 taattgaaca aagtattctt atgtatccga cgacgttact caaacacgat attcatggag
79561 ccccgtttta tggatctatt caagatgaaa tcgtagcagc gtattcattg tttaggatac
79621 aagatctttg tttagatgaa gtattgaaca tcttggggaa atatggaaga gagttcgatc
79681 ctaaaggtaa atgtaaattc agcggtaaag atatctatac ttacttgata ggtgaaaaga
79741 ttaattatcc gggtctctta aaggatggtg aaattattgc aaacgacgta gatagtaatt
79801 ttgttgtggc tatgaggcat ctgtcattgg ctggactctt atccgatcat aagtcgaacg
79861 tggaaggtat caactttatt atcaagtcat cttatgtttt taagagatat ctatctattt
79921 acggttttgg ggtgacattc aaagatctga gaccaaattc gacgttcact aataaattgg
79981 aggccatcaa cgtagaaaaa atagaactta tcaaagaagc atacgccaaa tatctcaacg
80041 atgtaagaga cgggaaaata gttccattat ctaaagcttt agaggcggac tatgtggaat
80101 ccatgttatc caacttgaca aatcttaata tccgagagat agaagaacat atgagacaaa
80161 cgctgataga tgatccagat aataacctcc tgaaaatggc caaagcgggt tataaagtaa
80221 atcccacaga actaatgtat attctaggta cttatggaca acagaggatt gatggtgaac
80281 cagcagagac tcgagtattg ggtagagtct taccttacta tcttccagac tctaaggatc
80341 cagaaggaag aggttacatt cttaattctt taacaaaagg attaacgggt tctcaatatt
80401 acttttcgat gctggttgca agatctcaat ctactgatat cgtctgtgaa acatcacgta
80461 ccggaacact ggctagaaaa atcattaaaa agatggagga tatggtggtc gacggatacg
80521 gacaagtagt tataggtaat acgctcatca agtacgccgc caattatacc aaaattctag
80581 gctcagtatg taaacctgta gatcttatct atccagatga gtccatgact tggtatttgg
80641 aaattagtgc tctgtggaat aaaataaaac agggattcgt ttactctcag aaacagaaac
80701 ttgcaaaaaa gacattggcg ccgtttaatt tcctagtatt cgtcaaaccc accactgagg
80761 ataatgctat taaggttaag gatctgtacg atatgattca taacgtcatt gatgatgtga
80821 gagagaaata cttctttacg gtatctaata tagattttat ggagtatata ttcttgacgc
80881 atcttaatcc ttctagaatt agaattacaa aagaaacggc tatcactatc tttgaaaagt
80941 tctatgaaaa actcaattat actctaggtg gtggaactcc tattggaatt atttctgcac
81001 aggtattgtc tgagaagttt acacaacaag ccctgtccag ttttcacact actgaaaaaa
81061 gtggtgccgt caaacaaaaa cttggtttca acgagtttaa taacttgact aatttgagta
81121 agaataagac cgaaattatc actctggtat ccgatgatat ctctaaactt caatctgtta
81181 agattaattt cgaatttgta tgtttgggag aattaaatcc aaacatcact cttcgaaaag
81241 aaacagatag gtatgtagta gatataatag tcaatagatt atacatcaag agagcagaaa
81301 ttaccgaatt agtcgtcgaa tatatgattg aacgattcat ctcctttagc gtcattgtaa
81361 aggaatgggg tatggaaaca ttcattgagg atgaggataa tattagattt actgtctacc
81421 taaatttcgt tgaaccggaa gaattgaatc ttagtaagtt tatgatggtt cttccgggtg
81481 ccgccaacaa gggcaagatt agtaaattca agattcctat ctctgattat acgggatatg
81541 acgacttcaa tcaaacaaaa aagctcaata agatgactgt agaactcatg aatctaaaag

FIG. 22 CONT'D

```
81601 aattgggttc tttcgatttg gaaaacgtca acgtgtatcc tggagtatgg aatacatacg
81661 atatcttcgg tatcgaggcc gctcgtgaat acttgtgcga agccatgtta aacacctatg
81721 gagaagggtt cgattatctg tatcagcctt gtgatcttct cgctagttta ctatgtgcta
81781 gttacgaacc agaatcagtg aataaattca agttcggcgc agctagtact cttaagagag
81841 ctacgttcgg agacaataaa gcattgttaa acgcggctct tcataaaaag tcagaaccta
81901 ttaacgataa tagtagctgc cactttttta gcaaggtccc taatatagga actggatatt
81961 acaaatactt tatcgacttg ggtcttctca tgagaatgga aaggaaacta tctgataaga
82021 tatcttctca aaagatcaag gaaatggaag aaacagaaga cttttaattc ttatcaataa
82081 catatttttc tatgatctgt cttttaaacg atggatttte cacaaatgcg cctctcaagt
82141 cctcatagga atgatacacg tataaaaaat atagcatagg caatgactcc ttatttttag
82201 acattagata tgccaaaatc atagccccgc tttctatttac tccgcagcca caatgaacca
82261 acacgggctc gtttcgttga tcaaatttag ataaaaaggc ggttacgtcg tcaaaatatt
82321 tactaatatc ggtagttgta tcatctacca acggtatatg aataatatta atattagagt
82381 taggtaatgt atatttatcc atcgtcaaat ttaaaacata tttgaactta acttcagatg
82441 atggtgcatc catagcattt ttataatttc ccaaatacac attattggtt actcttgtca
82501 ttatagtggg agatttggct ttgtgcatat ctccagttga acgtagtagt aagtatttat
82561 acaaactttt cttatccatt tataacgtac aaatggataa aactacttta tcggtaaacg
82621 cgtgtaattt agaatacgtt agagaaaagg ctatagtagg cgtacaagca gccaaaacat
82681 caacacttat attctttgtt attatattgg caattagtgc gctattacta tggtttcaga
82741 cgtctgataa tccagtcttt aatgaattaa cgagatatat gcgaattaaa aatacggtta
82801 acgattggaa atcattaacg gatagcaaaa caaaattaga aagtgataga ggtagacttc
82861 tagccgctgg taaggatgat atattcgaat tcaaatgtgt ggatttcggc gcctatttta
82921 tagctatgcg attggataag aaaacatatc tgccgcaagc tattaggcga ggtactggag
82981 acgcgtggat ggttaaaaag gcggcaaagg tcgatccatc tgctcaacaa ttttgtcagt
83041 atttgataaa acacaagtct aataatgtta ttacttgtgg taatgagatg ttaaatgaat
83101 taggttatag cggttatttt atgtcaccgc attggtgttc cgatttagt aatatggaat
83161 agtgttagat aaatgcggta acgaatgttc ctgtaaggaa ccataacagc ttagatttaa
83221 cgttaaagat gagcataaac ataataaaca aaattacaat caaacctata acattaatat
83281 caaacaatcc aaaaaatgaa atcagtggag tagtaaacgc gtacataact cctggataac
83341 gtttagcagc tgccgttcct attctagacc aaaaattcgg tttcatgttt tcgaaacggt
83401 attctgcaac aagtcgagga tcgtgttcta catatttggc ggcgttatcc agtatctgcc
83461 tattgatctt catttcgttt tcgattctgg ctatttcaaa ataaaatccc gatgatagac
83521 ctccagactt tataatttca tctacgatgt tcagcgccgt agtaactcta ataatatagg
83581 ctgataagct aacatcatac cctcctgtat atgtgaatat ggcatgattt ttgtccatta
83641 caagctcggt tttaacttta ttgcctgtaa taatttatct catctgtagg atatctattt
83701 ttttgtcatg cattgccttc aagacgggac gaagaaacgt aatatcctca ataacgttat
83761 cgttttctac aataactaca tattctacct ttttatttte taactcggta aaaaaattag
83821 aatcccatag ggctaaatgt ctagcgatat tcctttcgt ttcctctgta cacatagtgt
83881 tacaaaaccc tgaaaagaag tgagtatact tgtcatcatt tctaatgttt cctccagtcc
83941 actgtataaa cgcataatcc ttgtaatgat ctggatcatc cttgactacc acaacatttc
84001 ttttttctgg cataacttca ttgtcctttа catcatcgaa cttctgatca ttaatatgct
84061 catgaacatt aggaaatgtt tctgatggag gtctatcaat aactggcaca acaataacag
84121 gagttttcac cgccgccatt tagttattga aattaatcat atacaactct ttaatacgag
84181 ttatattttc gtctatccat tgtttcacat ttacatattt cgacaaaaag atataaaatg
84241 cgtattgcaa tgcttctctg tttaatgaat tactaaaata tacaaacacg tcactgtctg
84301 gcaataaatg atatcttaga atattgtaac aatttatttt gtattgcaca tgttcgtgat
84361 ctatgagttc ttcttcgaat ggcataggat ctccgaatct gaaaacgtat aaataggagt
84421 tagaataata atatttgaga gtattggtaa tatataaact ctttagcggt ataattagtt
84481 ttttctctc gatttctatt tttagatgtg atggaaaaat gactaatttt gtagcattag
84541 tatcatgaac tctaatcgag atcttaatat cttcgtcaca cgttagttct ttgaagtttt
84601 taagagatgc atcagttggt tcgaccgatg gagtaggtgc aacaatttt tgttcgatgt
84661 atgtatgtac tggagccatt gtcttaacta taatggtgct tgtatcgaaa aactttaatg
84721 cagataatgg aagctcttcg ccgcgacttt ctacatcgta attgggttct aacgccgatc
84781 tctgaatgga tactagtttt ctaagttcta atgtgattct ctgaaaatgt aaatccaatt
84841 cctccggcat tatagatgtg tatacatcgg taaataaaac tatagtatcc aacgatccct
84901 tctcgcaaat tctagtcttа accaaaaaat cgtatataac cacggagatg gcgtatttaa
84961 gagtggattc ttctaccgtt ttgttcttgg atttcatata agaaactata aagtccgcac
85021 tactgttaag aatgattact aacgcaacta tatagtttaa attaagcatc ttggaaacat
85081 aaaataactc tgtagacgat acttgacttt cgaataagtt tgcagacaaa cgaagaaaga
85141 acagaccttt cttaatttca gaagaaaact ttttttcgta ttcctgacgt ctagagttta
85201 tatcaataag aaagttaaga attagtcggt taatgttgta tttcattacc caagtttgag
85261 atttcataat attatcaaaa gacatgataa tattaaagat aaagcgctga ctatgaacga
```

FIG. 22 CONT'D

85321 aatagctata tggttcgctc aagaatatag tcttgttaaa cgtggaaacg ataactgtat
85361 ttttaatcac gtcagcggca tctaaattaa atataggtat atttattcca cacactctac
85441 aatatgccac accatcttca taataaataa attcgttagc aaaattatta attttagtga
85501 aatagttagc gtcaacttta atagcttcct tcaatctaat ttgatgctca cacggtgcga
85561 attccactct aacatccctt ttccatgcct caggttcatc gatctctata atatctagtt
85621 ttttgcgttt cacaaacaca ggctcgtctc tcgcgatgag atctgtatag taactatgta
85681 aatgataact agatagaaag atgtagctat atagatgacg atcctttaag agaggtatga
85741 tgactttacc ccaatcagat agactgttgt tatggtcttc ggaaaaagaa tttttataaa
85801 tttttccagt attttccaaa tatacgtact taacatctaa aaaatcccta atgataatag
85861 gaatggataa tccgtctatt ttataaagaa atacatatcg cacatttatc ttttttttgg
85921 aaatgggaat accgatgtgt ctacataaat atgcaaagtc taaatatttt ttagagaatc
85981 ttagttggtc caaattcttt tccaagtacg gtaatagatt tttcatattg aacggtatct
86041 tcttaatctc tggttctagt tccgcattaa atgatgaaac taagtcacta ttttttataac
86101 taacgattac atcacctcta acatcatcat ttaccagaat actgatcttc ttttgtcgta
86161 aatacatgtc taatgtgtta aaaaaaagat catacaagtt atacgtcatt tcatctgtgg
86221 tattcttgtc attgaaggat aaactcgtac taatctcttc tttaacagcc tgttcaaatt
86281 tatatcctat atacgaaaaa atagcaacca gtgtttgatc atccgcgtca atattctgtt
86341 ctatcgtagt gtataacaat cgtatatctt cttctgtgat agtcgatacg ttataaaggt
86401 tgataacgaa aatattttta tttcgtgaga taaagtcatc gtaggatttt ggacttatat
86461 tcgcgtctag tagatatgct tttatttttg gaatgatctc aattagaata gtctctttag
86521 agtccattta aagttacaaa caactaggaa attggtttat gatgtataat ttttttagtt
86581 tttatagatt ctttattcta tacttaaaaa atgaaaataa atacaaaggt tcttgagggt
86641 tgtgttaaat tgaaagcgag aaataatcat aaatttattc attatcgcga tatccgttaa
86701 gtttgtatcg taatggcgtg gtcaattaca aataaagcgg atactagtag cttcacaaag
86761 atggctgaaa tcagagctca tctaaaaaat agcgctgaaa ataaagataa aaacgaggat
86821 attttcccgg aagatgtaat aattccatct actaagccca aaaccaaacg agccactact
86881 cctcgtaaac cagcggctac taaaagatca accaaaaagg aggaagtgga agaagaagta
86941 gttatagagg aatatcatca aacaactgaa aaaaattctc catctcctgg agtcagcgac
87001 attgtagaaa gcgtggctgc tgtagagctc gatgatagcg acggggatga tgaacctatg
87061 gtacaagttg aagctggtaa agtaaatcat agtgctagaa gcgatctttc tgacctaaag
87121 gtggctaccg acaatatcgt taaagatctt aagaaaatta ttactagaat ctctgcagta
87181 tcgacggttc tagaggatgt tcaagcagct ggtatctcta gacaatttac ttctatgact
87241 aaagctatta caacactatc tgatctagtc accgagggaa aatctaaagt tgttcgtaaa
87301 aaagttaaaa cttgtaagaa gtaaatgcgt gcacttttct ataaagatgg taaactcttt
87361 accgataata attttttaaa tcctgtatca gacgataatc cagcgtatga ggttttgcaa
87421 catgttaaaa ttcctactca tttaacagat gtagtagtat atgaacaaac gtgggaggag
87481 gcgttaacta gattaatttt tgtggcaagt gattcaaaag gacgtagaca atacttttac
87541 ggaaaaatgc atgtacagaa tcgcaacgct aaaagagatc gtatttttgt tagagtatat
87601 aacgttatga aacgaattaa ttgttttata aacaaaaata taaagaaatc gtccacagat
87661 tccaattatc agttggcggt ttttatgtta atggaaacta tgttttttat tagatttggt
87721 aaaatgaaat atcttaagga gaatgaaaca gtagggttat taacactaaa aaataaacac
87781 atagaaataa gtcccgatga aatagttatc aagtttgtag gaaaggacaa agtttcacat
87841 gaatttgttg ttcataagtc taatagacta tataaaccgc tattgaaact gacggatgat
87901 tctagtcccg aagaatttct gttcaacaaa ctaagtgaac gaaaggtata cgaatgtatc
87961 aaacagtttg gtattagaat caaggatctc cgaacgtatg gagtcaatta tacgttttta
88021 tataattttt ggacaaatgt aaagtccata tctcctcttc cgtcaccaaa aaagttaata
88081 gcgttaacta tcaaacaaac tgctgaagtg gtaggtcata ctccatcaat ttcaaaaaga
88141 gcttatatgg caacgactat tttagaaatg gtaaaggata aaaatttttt agatgtagta
88201 tctaaaacta cgttcgatga attcctatct atagtcgtag atcacgttaa atcatctacg
88261 gatggatgat atagatcttt acacaaataa ttacaagacc gataaatgga aatggataag
88321 cgtatgaaat ctctcgcaat gacagctttc ttcggagagc taaacacatt agatattatg
88381 gcattgataa tgtctatatt taaacgccat ccaaacaata ccatttttcc agtggataag
88441 gatggtcagt ttatgattga tttcgaatac gataattata aggcttctca atatttggat
88501 ctgaccctca ctccgatatc tggagatgaa tgcaagactc acgcatcgag tatagccgaa
88561 caattggcgt gtgtggatat tattaaagag gatattagcg aatatatcaa aactactccc
88621 cgtcttaaac gatttataaa aaaatacccc aatagatcag atactcgtat cagtcgagat
88681 acagaaaagc ttaaaatagc tctagctaaa ggcatagatt acgaatatat aaaagacgct
88741 tgttaataag taaatgaaaa aaaactagtc gtttataata aaacacaata tggatgccaa
88801 catagtatca tcttctacta ttgcaacgta tatagacgct ttagcgaaga atgcttcaga
88861 attagaacag aggtctaccg catacgaaat aaataatgaa ttggaactag tatttattaa
88921 gccgccatta attactttga caaatgtagt gaatatctct acgattcagg aatcgtttat
88981 tcgatttacc gttactaata aggaaggtgt taaaattaga actaagattc cattatctaa

FIG. 22 CONT'D

```
89041 ggtacatggt ctagatgtaa aaaatgtaca gttagtagat gctatagata acatagtttg
89101 ggaaaaqaaa tcattagtga cggaaaatcg tcttcacaaa gaatgcttgt tgagactatc
89161 gacagaggaa cgtcatatat ttttggatta caagaaatat ggatcctcta tccgactaga
89221 attagtcaat cttattcaag caaaaccaaa aaacttacg atagacttta agctaaaata
89281 ttttctagga tccggtgccc agtctaaaag ttctttatta cacgctatta atcatccaaa
89341 gtcaaggcct aatacatctc tggaaataga attcacacct agagacaatg aaaaagttcc
89401 atatgatgaa ctaataaagg aattgacgac tctatcacgt catatattta tggcttctcc
89461 agagaatgta attctttctc cgcctattaa cgcgcctata aaaaccttta tgttgcctaa
89521 acaagatata gtaggtttgg atctggaaaa tctatatgcc gtaactaaga ctgacggaat
89581 tcctataact atcagagtta catcaaaagg gttgtattgt tattttacac atcttggtta
89641 tattattaga tatcctgtta agagaataat agattccgaa gtagtagtct ttggtgaggc
89701 agttaaggat aagaactgga ccgtatatct cattaagcta atagagcctg tgaatgcaat
89761 caatgataga ctagaagaaa gtaagtatgt tgaatctaaa ctagtggata tttgtgatcg
89821 gatagtattc aagtcaaaga aatacgaagg tccgtttact acaactagtg aagtcgtcga
89881 tatgttatct acatatttac caaagcaacc agaaggtgtt attctgttct attcaaaggg
89941 acctaaatct aacattgatt ttaaaattaa aaaggaaaat actatagacc aaactgcaaa
90001 tgtagtattt aggtacatgt ccagtgaacc aattatcttt ggagaatcgt ctatctttgt
90061 agagtataag aaatttagca acgataaagg ctttcctaaa gaatatggtt ctggtaagat
90121 tgtgttatat aacggcgtta attatctaaa taatatctat tgtttggaat atattaatac
90181 acataatgaa gtgggtatta agtccgtggt tgtacctatt aagtttatag cagaattctt
90241 agttaatgga gaaatactta aacctagaat tgataaaacc atgaaatata ttaactcaga
90301 agattattat ggaaatcaac ataatatcat agtcgaacat ttaagagatc aaagcatcaa
90361 aataggagat atctttaacg aggataaact atcggatgtg ggacatcaat acgccaataa
90421 tgataaattt agattaaatc cagaagttag ttatttacg aataaacgaa ctagaggacc
90481 gttgggaatt ttatcaaact acgtcaagac tcttcttatt tctatgtatt gttccaaaac
90541 atttttagac gattccaaca aacgaaaggt attggcgatt gattttggaa acggtgcgga
90601 cctggaaaaa tacttttatg gagagattgc gttattggta gcgacggatc cggatgctga
90661 tgctatagct agaggaaatg aaagatacaa caaattaaac tctggaatta aaaccaagta
90721 ctacaaattt gactacattc aggaaactat tcgatccgat acatttgtct ctagtgtcag
90781 agaagtattc tattttggaa agtttaatat catcgactgg cagtttgcta tccattattc
90841 ttttcatccg agacattatg ctaccgtcat gaataactta tccgaactaa ctgcttctgg
90901 aggcaaggta ttaatcacta ccatggacgg agacaaatta tcaaaattaa cagataaaaa
90961 gacttttata attcataaga atttacctag tagcgaaaac tatatgtctg tagaaaaaat
91021 agctgatgat agaatagtgg tatataatcc atcaacaatg tctactccaa tgactgaata
91081 cattatcaaa aagaacgata tagtcagagt gtttaacgaa tacggatttg ttcttgtaga
91141 taacgttgat ttcgctacaa ttatagaacg aagtaaaaag tttattaatg gcgcatctac
91201 aatggaagat agaccgtcta caaaaaactt tttcgaacta aatagaggag ccattaaatg
91261 tgaaggttta gatgtcgaag acttacttag tcactatgtt gtttatgtct tttctaagcg
91321 gtaaataata atatggtatg ggttctgata tccccgttct aaatgcatta aataattcca
91381 atagagcgat ttttgttcct ataggacctt ccaactgtgg atactctgta ttgttaatag
91441 atatatttaa actttttgtcg ggtaacagag gttctacgtc ttctaaaaat aaaagtttga
91501 taacatctgg cctgttcata aataaaaact tggcgattct atatatactc ttattatcaa
91561 atctagccat tgtcttatag atgtgagcta ctgtaggtgt accatttgat tttctttcta
91621 atactatata ttttctctga agaagttctt gcacatcatc tgggaataaa atactactgt
91681 tgagtaaatc agttatttta tttatatcga tattgatgga catttttata gttaaggata
91741 ataagtatcc caaagtcgat aacgacgata acgaagtatt tatactttta ggaaatcaca
91801 atgactttat cagatcaaaa ttaacaaaat taaaggagca tgtatttttt tctgaatata
91861 ttgtgactcc agatacatat ggatctttat gcgtcgaatt aaatgggtct agttttcagc
91921 acggtggtag atatatagag gtggaggaat ttatagatgc tggaagacaa gttagatggt
91981 gttctacatc caatcatata tctgaagata tgcacactga taaattttgtc atttatgata
92041 tttatacgtt tgattcgttc aagaataaac gattggtatt tgtacaggtg cctccatcat
92101 taggagatga tagctatttg actaatccgt tattgtctcc gtattatcgt aattcagtag
92161 ccagccaaat ggtcaatgat atgattttta atcaagattc atttttaaaa tatttattag
92221 aacatctgat tagaagccac tatagagttt ctaaacatat aacaatagtt agatacaagg
92281 ataccgaaga attaaatcta acgagaatat gttataatag agataagttt aaggcgtttg
92341 tattcgcttg gtttaacggc gtttcggaaa atgaaaaggt actagatacg tataaaaagg
92401 tatctaattt gatataatga attcagtgac tgtatcacac gcgccatata ctattactta
92461 tcacgatgat tgggaaccag taatgagtca attggtagag ttttataacg aagtagccag
92521 ttggctgcta cgagacgaga cgtcgcctat tcctgataag ttctttatac agttgaaaca
92581 acccgcttaga aataaacgag tatgtgtgtg tggtatagat ccgtatccga aagatggaac
92641 tggtgtaccg ttcgaatcac caaattttac aaaaaaatca attaaggaga tagcttcatc
92701 tatatctaga ttaaccggag taattgatta taaaggttat aaccttaata taatagacgg
```

FIG. 22 CONT'D

92761 ggttataccc tggaattatt acttaagttg taaattagga gaaacaaaaa gtcacgcgat
92821 ctactgggat aagatttcca agttactgct gcagcatata actaaaacacg ttagtgttct
92881 ttattgtttg ggtaaaacag atttctcgaa tatacgggca aagttagaat ccccggtaac
92941 taccatagtc ggatatcatc cagcggctag agaccgccaa ttcgagaaag atagatcatt
93001 tgaaattatc aacgttttac tggaattaga caacaaggca cctataaatt gggctcaagg
93061 gtttatttat taatgcttta gtgaaatttt aacttgtgtt ctaaatggat gcaactatta
93121 gaggtaatga tgttatcttt gttcttaaga ctataggtgt ccogtcagcg tgcagacaaa
93181 atgaagatcc aagatttgta gaagcatttа aatgcgacga gttagaaaga tatattgaga
93241 ataatccaga atgtacacta ttcgaaagtc ttagggatga ggaagcatac tctatagtca
93301 gaattttcat ggatgtagat ttagacgcgt gtctagacga aatagattat ttaacggcta
93361 ttcaagattt tattatcgag gtgtcaaact gtgtagctag attogcgttt acagaatgcg
93421 gtgccattca tgaaaatgta ataaaatcca tgagatctaa tttttcattg actaagtcta
93481 caaatagaga taaaacaagt tttcatatta tcttttttaga cacgtatacc actatggata
93541 cattgatagc tatgaaacga acactattag aattaagtag atcatctgaa aatccactaa
93601 ccagatcgat agacactgcc gtatatagga gaaaaacaac tcttcgggtt gtaggtacta
93661 ggaaaaatcc aaattgcgac actattcatg taatgcaacc accgcatgat aatatagaag
93721 attacctatt cacttacgtg gatatcaaca acaatagtta ttacttttct ctacaacgac
93781 gattggagga tttagttcct gataagttat gggaaccagg gtttatttca ttcgaagacg
93841 ctataaaaag agtttcaaaa atattcatta attctataat aaactttaat gatctcgatg
93901 aaaataattt tacaacggta ccactggtca tagattacgt aacaccttgt gcattatgta
93961 aaaaacgatc gcataaacat ccgcatcaac tatcgttgga aaatggtgct attagaattt
94021 acaaaactgg taatccacat agttgtaaag ttaaaattgt tccgttggat ggtaataaac
94081 tgtttaatat tgcacaaaga attttagaca ctaactctgt tttattaacc gaacgaggag
94141 accatatagt ttggattaat aattcatgga aatttaacag cgaagaaccc ttgataacaa
94201 aactaattct gtcaataaga catcaactac ctaaggaata ttcaagcgaa ttactctgtc
94261 cgaggaaacg aaagactgta gaagctaaca tacgagacat gttaatagat tcagtggaga
94321 ccgataccta tccggataaa cttccgttta aaaatggtgt attggacctg gtagacggaa
94381 tgttttactc tggagatgat gctaaaaaat atacgtgtac tgtatcaacc ggatttaaat
94441 ttgacgatac aaagttcgtc gaagacagtc cagaaatgga agagttaatg aatatcatta
94501 acgatatcca accattaacg gatgaaaata agaaaaatag agagttgtac gaaaaaactt
94561 tatctagttg tttatgcggt gctaccaaag gatgtttaac attcttttt ggagaaactg
94621 caactggaaa gtcgacaacc aaacgtttgt taaagtctgc tatcggtgac ctgtttgttg
94681 agacgggtca aacaatttta acagatgtat tggataaagg acctaatcca tttatcgcta
94741 acatgcattt gaaaagatct gtattctgta gcgaactacc tgattttgcc tgtagtggat
94801 caaacgaaaat tagatctgac aatattaaaa agttgacaga accttgtgtc attggaagac
94861 cgtgtttctc caataaaatt aataatagaa accatgcgac aatcattatc gatactaatt
94921 acaaacctgt ctttgatagg atagataacg cattaatgag aagaattgcc gtcgtgcgat
94981 tcagaacaca cttttctcaa ccttctggta gagaggctgc tgaaaataat gacgcgtacg
95041 ataaagtcaa actattagac gagggcttag atggtaaaat acaaaataat agatatagat
95101 tcgcatttct atacttgttg gtgaaatggt acaaaaaata tcatgttcct attatgaaac
95161 tatatcctac accggaagag attccggact ttgcattcta tctcaaaata ggtactctgt
95221 tagtatctag ctctgtaaag catatttcat taatgacgga cctctccaaa aagggatata
95261 tattgtacga taatgtggtt actcttccgt tgactacttt ccaacagaaa atatccaagt
95341 attttaattc tagactattt ggcacacgata tagagagctt catcaataga cataagaaat
95401 ttgccaatgt tagtgatgaa tatctgcaat atatattcat agaggatatt tcatctccgt
95461 aaatatatgc tcatatattt atagaagata tcacatatct aaatgaatac cggaatcata
95521 gatttatttg ataatcatgt tgatagtata ccaactatat tacctcatca gttagctact
95581 ctagattatc tagttagaac tatcatagat gagaacagaa gcgtgttatt gttccatatt
95641 atgggatcag gtaaaacaat aatcgctttg ttgttcgcct tggtagcttc cagatttaaa
95701 aaggtttaca ttctagtgcc taatattaac attttgaaaa tttttaatta taatatgggt
95761 gtagctatga acttgtttaa tgacgaattc atagctgaga atatctttat tcattccaca
95821 acaagttttt attctcttaa ttataacgat aacgtcatta attataacgg attatctcgc
95881 tacaataact ctatttttat cgttgatgag gcacataata tctttgggaa taatactgga
95941 gaacttatga ccgtgataaa aaataaaaac aagattcctt ttttactatt gtctggatct
96001 cccattacta acacacctaa tactctgggt catattatag atttaatgtc cgaagagacg
96061 atagattttg gtgaaattat tagtcgtggt aagaaagtaa ttcagacact tcttaacgaa
96121 cgaggtgtga atgtacttaa ggatttgctt aaaggaagaa tatcatatta cgaaatgcct
96181 gataaagatc taccaacgat aagatatcac ggacgtaagt ttctagatac tagagtagta
96241 tattgtcaca tgtctaaact tcaagagaga gattatatga ttactagacg acagctatgt
96301 tatcatgaaa tgtttgataa aaatatgtat aacgtgtcaa tggcagtatt gggacaactt
96361 aatctgatga ataatttaga tactttattt caggaacagg ataaggaatt gtacccaaat
96421 ctgaaaataa ataatggcgt gttatacgga gaagaattgg taacgttaaa cattagttcc

FIG. 22 CONT'D

```
 96481 aaatttaaat actttattaa tcggatacag acactcaacg gaaaacattt tatatacttt
 96541 tctaattcta catatggcgg attggtaatt aaatatatca tgctcagtaa tggatattct
 96601 gaatataatg gttctcaggg aactaatcca catatgataa acggcaaacc aaaaacattt
 96661 gctatcgtta ctagtaaaat gaaatcgtct ttagaggatc tattagatgt gtataattct
 96721 cctgaaaacg atgatggcag tcaattgatg tttttgtttt cgtcaaacat tatgtccgaa
 96781 tcctatactc tgaaagaggt aaggcatatt tggtttatga ctatcccaga tacttttttt
 96841 caatacaacc aaattcttgg acgatctatt agaaaattct cttacgccga tatttctgaa
 96901 ccagttaatg tatatctttt agccgccgta tattccgatt tcaatgacga agtgacgtca
 96961 ttaaacgatt acacacagga tgaattaatt aatgttttac catttgacat caaaaagctg
 97021 ttgtatctaa aatttaagac taaagaaacg aatagaatat actctattct tcaagagatg
 97081 tctgaaacgt attctcttcc accactccca tcaattgtaa aagttttatt gggagaattg
 97141 gtcagacaat ttttttataa taattctcgt attaagtata acgataccaa gttacttaaa
 97201 atggttacat cagttataaa aaataaagaa gacgctagga attacataga tgatattgta
 97261 aacggtcact tctttgtatc gaataaagta tttgataaat ctcttttata caaatacgaa
 97321 aacgatatta ttacagtacc gtttagactt tcctacgaac catttgtttg gggagttaac
 97381 tttcgtaaag aatataacgt ggtatcttct ccataaaact gatgagatat ataaagaaat
 97441 aaatgtcgag ctttgttacc aatggatacc ttccagttac attggagcca cacgagctga
 97501 cgttagacat aaaaactaat attaggaatg ccgtatataa gacgtatctc catagagaaa
 97561 ttagtggtaa aatggccaag aaaatagaaa ttcgtgaaga cgtggaatta cctctcggcg
 97621 aaatagttaa taattctgta gttataaacg ttccgtgtgt aataacctac gcgtattatc
 97681 acgttgggga tatagtcaga ggaacattaa acatcgaaga tgaatcaaat gtaactattc
 97741 aatgtggaga tttaatctgt aaactaagta gagattcggg tactgtatca tttagcgatt
 97801 caaagtactg ctttttttcga aatggtaatg cgtatgacaa tggcagcgaa gtcactgccg
 97861 ttctaatgga ggctcaacaa ggtatcgaat ctagttttgt ttttctcgcg aatatcgttg
 97921 actcataaaa aagagaatag cggtaagtat aaacacgaat actatggcaa taattgcgaa
 97981 tgttttattc ccttcgatat atttttgata atatgaaaaa catgtctctc tcaaatcgga
 98041 caaccatctc ataaaatagt tctcgcgcgc tggagaggta gttgctgctc gtataatctc
 98101 cccagaataa tatacttgcg tgtcgtcgtt caatttatac ggatttctat agttctctgt
 98161 tatataatgc ggttttccat catgattaga cgacgacaat agtgttctaa atttagatag
 98221 ttgatcagaa tgaatgttta ttggcgttgg aaaaattatc catacagcgt ctgcagagtg
 98281 gttgatagtt gttcctagat atgtaaaata atccaactta ctaggcagca aattgtctag
 98341 ataaaatact gaatcaaacg gtgcagacgt attggtggat ctaatggaat ccaattgatt
 98401 aactatcttt tgaaaatata catttttatg atccgatact tgtaagaata tagaaataat
 98461 gataagtcca tcatcgtgtt ttttgcctc ttcataagaa ctatattttt tcttattcca
 98521 atgaacaaga ttaatctctc cagagtattt gtacacatct atcaagtgat tggatccata
 98581 atcgtcttcc tttccccaat atatacgtag tgatgataac acatattcat tggggagaaa
 98641 ccctccactt atatatcctc ctttaaaatt aatccttact agttttccag tgttctggat
 98701 agtggttggt ttcgactcat tataatgtat gtctaacggc ttcaatcgcg cgttagaaat
 98761 tgctttttta gtttctatat taataggaga tagttgttgc ggcatagtaa aaatgaaatg
 98821 ataactgttt aaaaatagct cttagtatgg gaattacaat ggatgaggaa gtgatatttg
 98881 aaactcctag agaattaata tctattaaac gaataaaaga tattccaaga tcaaaagaca
 98941 cgcatgtgtt tgctgcgtgt ataacaagtg acggatatcc gttaatagga gctagaagaa
 99001 cttcattcgc attccaagcg atattatctc aacaaaattc agattctatc tttagagtat
 99061 ccactaaact attacggttt atgtactaca atgaactaag agaaatcttt agacggttga
 99121 gaaaaggttc tatcaacgat atcgatcctc actttgaaga gttaatatta ttgggtggta
 99181 aactagataa aaaggaatct attaaagatt gtttaagaag agaattaaaa gaggaaagtg
 99241 atgaacgtat aacagtaaaa gaatttggaa atgtaattct aaaacttaca acacgggata
 99301 aattatttaa taaagtatat ataagttatt gcatggcgtg ttttattaat caatcgttgg
 99361 aggatttatc gcatactagt atttacaatg tagaaattag aaagattaaa tcattaaatg
 99421 attgtattaa cgacgataaa tacgaatatc tgtcttatat ttatgatatg ctagttaata
 99481 gtaaatgaac ttttacagat ctagtataat tagtcagatt attaagtata atagacgact
 99541 agctaagtct attatttgcg aggatgactc tcaaattatt acactcacgg cattcgttaa
 99601 ccaatgccta tggtgtcata aacgagtatc cgtgtccgct attttattaa ctactgataa
 99661 caaaatatta gtatgtaaca gacgagatag ttttctctat tctgaaataa ttagaactag
 99721 aaacatgtct agaaagaaac gattatttct gaattattcc aattatttgt ccaaacagga
 99781 aagaagtata ctatcgtcat ttttttctct agatccagct actactgata atgatagaat
 99841 agatgctatt tatccgggtg gcataccaaa aaggggtgag aatgttccag agtgtttatc
 99901 cagggaaatt aaagaagaag ttaatatata caatttcttt gtattcatag acactcggtt
 99961 ttttattcat ggcatcatag aagataccat tattaataaa ttttttgagg taatcttctt
100021 tgtcggaaga atatctttaa cgagtgatca aatcattgat acatttaaaa gtaatcatga
100081 aatcaaggat ctaatatttt tagatccgaa ttcaggtaat ggactccaat acgaaattgc
100141 aaaatatgct ctagatactg caaaactcaa atgttatggc catagaggat gttattacga
```

FIG. 22 CONT'D

100201 atcattaaaa aaattaactg aggatgattg attagaaaat ataaattaat ttaccatcgt
100261 gtatttttat aacgggattg tccggcatat catgtagata gttaccgtct acatcgtata
100321 ctcgaccatc tacgcctttа aatcctctat ttattgacat taatctatta gaattggaat
100381 accaaatatt agtaccctca attagtttat tgggtaatatt ttttttagac gatagatcga
100441 tggctcttga aaccaaggtt ttccaaccgg actcattgtc gatcggtgag aagtcttttt
100501 cattagcatg aatccattct aatgatgtat gtttaaacac tctaaacaat tggacaaatt
100561 cttttgattt gctttgaatg atttcaaata ggtcttcgtc tacagtaggc ataccattag
100621 ataatctagc cattataaag tgcacgttta catatctacg ttctggagga gtaagaacgt
100681 gactattgag acgaatggct cttcctacta tctgacgaag agacgcctcg ttccatgtca
100741 tatctaaaat gaagatatca ttaattgaga aaaaactaat accctcgcct ccactagaag
100801 agaatacgca tgttttaatg cattctccgt tagtgtttga ttcttggtta aactcagcca
100861 ccgccttgat tctagtatct tttgttctag atgagaacta tatattagag atacaaaaga
100921 ctttgaaata tagtaataag attttctattc ctgactgatt aacaaatggt tcaaagacta
100981 gacatttacc atgggatgct aatattccca aacatacatc tataaatttg acgcttttct
101041 cttttaattc agtaaatага gagatatcag ccgcactagc atcccctttc aatagttctc
101101 ccttttaaa ggtatctaat gcggatttag aaaactctct atctcttaat gaatttttaa
101161 aatcattata tagtgttgct atctcttgcg cgtattcgcc cggatcacga ttttgtcttt
101221 caggaaagct atcgaacgta aacgtagtag ccatacgtct cagaattcta aatgatgata
101281 tacctgtttt tatttcagcg agtttagcct tctgataaat ttcttcttgc tttttcgaca
101341 tattaacgta tcgcattaat actgtttttct tagcgaatga tgcagaccct tctacgtcat
101401 caaaaatага aaactcgtta ttaactatgt acgaacatag gcctcctagt ttggagacta
101461 attctttctc atcaactaga cgtttattct caaatagcga ttggtgttgt aaggatcctg
101521 gtcgtagtaa gttaaccaac atggtgaatt cttgcacact attaacgata ggtgtagccg
101581 ataaacaaat catcttatgg ttttttaatg cgatggtctt agataaaaaa ttatatactg
101641 aacgagtagg acggatctta ccatcttctt tgattaatga tttagaaatg aagttatgac
101701 attcatcaat aatgacgcat attctactct tggaattaat agttttgata ttagtaaaaa
101761 atttatttct aaaatttiga tcatcgtaat taataaaaat acaatcctic gttatctctg
101821 gagcgtatct gagtatagtg ttcatccaag gatcttctat caaagccttt ttcaccaata
101881 agataatagc ccaattcgta taaatatcct taagatgttt gagaatatat acagtagtca
101941 ttgttttacc aacacccgtt tcatggaaca ataaaagaga atgcatactg tctaatccta
102001 agaaaactct tgctacaaaa tgttgataat ccttgaggcg tactacgtct gttcccatca
102061 tttcaacagg catattagta gttctgcgca atgcataatc gatataggcc gcgtgtgatt
102121 tactcattta tgagtgataa gtaataacta tgttttaaaa atcacagcag tagtttaact
102181 agtcttctct gatgtttgtt ttcgatactt tttgaatcag aagtcatact agaataaagc
102241 aacgagtgaa cgtaatagag agcttcgtat actctattcg aaaactctaa gaacttatta
102301 atgaattccg tatccactgg attgtttaaa atactaaatt gaacactgtt cacatcottc
102361 caagaagaag acttagtgac ggacttaaca tgagacataa ataaatccaa attttttta
102421 caaacatcac tagccaccat aatggcgcta tctttcaacc agctatcgct tacgcatttt
102481 agcagtctaa catttttaaa gagactacaa tatattctca tagtatcgat tacacctcta
102541 ccgaataaag ttggaagttt aataatacaa tatttttcgt ttacaaaatc aaataatggt
102601 cgaaacacgt cgaaggttaa catcttataa tcgctaatgt atagattgtt ttcagtgaga
102661 tgattattag atttaatagc atctcgttca cgtttgaaca gtttattgtg tgcgctgagg
102721 tcggcaacta cggcgtccgc tttagtactc ctcccataat actttacgct attaatcttt
102781 aaaatttcat agactttatc tagatcgctt tctggtaaca tgatatcatg tgtaaaaagt
102841 tttaacatgt cggtcggcat tctatttaga tcattaactc tagaaatctg aagaaagtaa
102901 ttagctccgt atttcagact aggtaatggg cttttaccta aagacaagtt aagttctggc
102961 aatgtttcat aaaatggaag aaggacatgc gttcoctccc ggatattttt tacaatttca
103021 tccatttaca actctatagt ttgttttcat tattattagt tatatctcc cataatcttg
103081 gtaatactta cccottgatc gtaagatacc ttatacaggt cattacatac aactaccaat
103141 tgtttttgta cataatagat tggatggttg acatccatgg tggaataaac tactcgaaca
103201 gatagtttat ctttcccccc agatacattg gccgtaatag ttgtcggcct aaagaatatc
103261 tttggtgtaa agttaaaagt tagggttctt gttccattat tgcttttgt cagtagttca
103321 ttataaattc tcgagatggg tccgttctct gaatatagaa catcatttcc aaatctaact
103381 tctagtctag aaataatatc ggtcttattc ttaaaatcta ttcccttgat gaagggatcg
103441 ttaatgaaca aatcottggc ctttgattcg gctgatctat tatctccgtt atacgcgtta
103501 cgttgactag tccaaagact tacaggaata gatgtatcga tgatgttgat actatgtgat
103561 atgtgagcaa agattgttct cttagtggca tcactatatg ttcgagtaat ggcggaaaac
103621 tttttagaaa tgttatatat aaaagaattt tttcgtgttc caaacattag cagattagta
103681 tgaagataaa cactcatatt atcaggaaca ttatcaattt ttacatacac atcagcatct
103741 tgaatagaaa cgatacoatc ttctggaacc tcaacaatct cggcagactc cggataacca
103801 gtcggtgggc catcactaac aataactaga tcatccaaca atctactcac atatgcatct
103861 atataatctt tttcatcttg tgagtaccct ggatacgaaa taaatttatt atccgtattt

FIG. 22 CONT'D

```
103921 ccataataag gtttagrata aacagagagc gatgttgccg catgaacttc agttacagtc
103981 gccgttggtt ggtttatttg acctattact ctcctaggtt tctctataaa cgatggtttа
104041 atttgtacat tctttaaccat atatccaata aagctcastt caggaacata aacaaatttct
104101 ttgttgaacg tttcaaaagtc gaacgaagag tcacgaataa cgatatcgga tactggattg
104161 aaggttaccg ttacggtaat ttttgaatcg gatagtttaa gactgctgaa tgtatcttcc
104221 acatcaaacg gagttttaat ataaacgtat actgtagatg gttctttaat agtgtcatta
104281 ggagttaggc caatagaaat atcattaagt tcactagaat atccagagtg tttcaaagca
104341 attgtattat tgatacaatt attatataat tcttcgccct caatttccca aataacaccg
104401 ttacacgaag agatagatac gtgattaata catttatatc caacatatgg tacgtaaccg
104461 aatcttccca taccttтaac ttctggaagt tccaaactca gaaccaaatg attaagcgca
104521 gtaatatact gatccctaat ttcgaagcta gcgatagcct gattgtctgg accatcgttt
104581 gtcataacte cggatagaga aatatattgc ggcatataca aagttggaat ttgactatcg
104641 actgcgaaga cattagaccg tttaatagag tcatccccac cgatcaaaga attaatgata
104701 gtattattca ttttctattt aaaatcggaaa aagcttacaa taaactccgt agagaaatat
104761 ctataatttg tgagttttcc ttaaagtaac agcttccgta aacgccgtct ttatctctta
104821 gtaggtttat tgtatttatg accttttcct tatcttcata gaatactaaa ggcaacaaag
104881 aaatttttgg ttcttctcta agagctacgt gagacttaac catagaagcc aacgaatccc
104941 tacatatttt agaaacagaaa tacccaactt caccaccctt gaatgtctca atactaatag
105001 gtctaaaaac caaatcttga ttacaaaacc aacacttatc aattacacta tttgtcttaa
105061 tagacacatc tgccatagat ttataatact ttggtagtat acaagcgagt gcttcttctt
105121 tagcgggctt aaagactgct ttaggtgctg aaataaccac atctggaagg cttactcgct
105181 tagccattta attacggaac tatttttta tacttctaat gagcaagtag aaaacctctc
105241 atctacaaaa acatactcgt gtccataatc ctctaccata gttacacgtt ttttagatct
105301 catatgtgct aaaaagtttt cccatactaa ttggttacta ttatttttcg tataatttt
105361 aacagtttga ggttttagat ttttagttac agaagtgata tcgaatattt tatccaaaaa
105421 gaatgaataa ttaattgtct tagaaggagt gttttcttgg caaaagaata ccaagtgctt
105481 aaatatttct actacttcat taatctttc tgtactcaga ttcagtttct catctttтac
105541 ttgattgatt atttcaaaga ctaacttata atcctttta tttattctct cgttagcctt
105601 aagaaaacta gatacaaaat ttgcatctac atcatccgtg gatattтgat ttttttccat
105661 gatatccaag agttccgaga taatttattcc agaacattga tgagacaata atctccgcaa
105721 tacatttctc aaatgaataa gtttattaga cacatggaag tttgacttтt tttgtacctt
105781 tgtacatttt tgaaatacag actcgcaaaa aatacaatat tcatatcctt gttcagatac
105841 tataccgttg tgtctacaac cgctacataa tcgtagattc atgttaacac tctacgtatc
105901 tcgtcgtcca atattttata taaaaacatt ttatttctag acgttgccag aaaatcctgt
105961 aatatttttа gtttttтggg ctgtgaataa agtatcgccc taatatggtt accgtcctcc
106021 gccaatatag tagttaaatt atccgcacat gcagaagaac accgcttagg cggattcagt
106081 acaatgttat attttтcgta ccaactcatt taaatatcat aatctaaaat agttctgtaa
106141 tatgtctagc gctaatatat tgatcataat cctgtgcata aattaagata caacaatgtc
106201 tcgaaatcat cgacatggct tcttccatag ttagaagatc gtcgtcaaag ttagcaacgt
106261 gattcatcaa catttgctgt tttgaggcag caaatactga acgtcgcca ttcaaccatt
106321 cataaaaacc atcgtctgaa tccattgata atttcttgta ctggttтttg agagctcgca
106381 tcaatctagc atttctagct cccggattga aaacagaaag aggatcgtac atccagggtc
106441 cattttctgt aaatagaatc gtataatgtc ccttcaagaa gatatcagac gatccacaat
106501 caaagaattg gtctccgagt ttgtaacaaa ctgcggactt taacctatac atgataccgt
106561 ttagcatgat ttctggtgat acgtcaatcg gagtatcatc tattagagat ctaaagcggg
106621 tgtaacattc tccaccaaac atattcttat tctgacgtcg ttctacataa aacatcattg
106681 ctccattaac gataacaggg gaatgaacag cactacccat cacattagtt cccaatggat
106741 caatgtgtgt aactccagaa catcttccat atcctatgtt aggaggagcg aacaccactc
106801 ttccactatt gccatcgaat gccatagaat aaatatcctt ggaattgata gaaatcggac
106861 tgtcggatgt tgtgatcatc ttcataggat taacaactat gtatggtgcc gcctgaagtt
106921 tcatatcgta actgatgccg tttataggtc tagccacaga aaccaacgta ggtctaaatc
106981 caactataga caaaatagaa gccaatatct gttcttcatc tgtcataact tgagagcatc
107041 cagtatgaat aatcttcatt agatgcggat ctaccgcatc atcatcgtta caataaaaaa
107101 ttcccattct aatgttcata attgctttтc taatcatggt atgcatgttt gctctctgaa
107161 tctctgtgga aattagatct gatacacctg taatcactat cggattatcc tccgtaagac
107221 gattaaccaa caacatataa ttataagact ttacttttct aaattcataa agttgctgga
107281 ttaggctata ggtgtctcca tgtacatacg cgttctcgag cgcaggaagt ttaatacgga
107341 atagtgccat cagaatagga tgaatatagt aattagtttc tggttttcta taaataaaag
107401 acaaatcttg tgaactagac atatccgtaa aatgcatgga ttggaatcgt gtagtcgaca
107461 gaagaatatg atgattagat ggagagtata ttttatctaa ctctttgagt tggtcaccga
107521 ttctaggact agctcgagaa tgaataagta ctaaaggatg agtacatttc acagaaacac
107581 tagcattgtt caatgtgctc tttacatggg taaggagttg aaatagctcg tttctatttg
```

FIG. 22 CONT'D

```
107641 ttctgacaat atttagttta ttcataatgt taagcatatc ctgaatagta aagttagatg
107701 tgtcatactt gttagtagtt agatatttag caattgcatt cccatcattt ctcaatctcg
107761 tactccaatc atgcgtggat gctacttcgt cgatggaaac catacaatcc tttttgatag
107821 gctgttgaga ttgattattt cctgcacgtt taggtttggt acgttgattt ctagccccctg
107881 cggatataaa gtcatcgtct acaattttgg ataatgaatt gcatacacta caagacaaag
107941 atttatcaga agtgtgaata tgatcttcat ctaccaaaga aagagtttga ttagtataac
108001 tagattttag tcctgcgtta gatgttaaaa aaacatcgct attgaccacg gcttccatta
108061 tttatattcg tagttttac tcgaaagcgt gattttaata ttcaatctta ttacttttgg
108121 aatcgttcaa aaccttttgac taattgtaga atttgatcta ttgccctacg cgtatactcc
108181 cttgcatcat atacgttcgt caccagatcg tttgtttcgg cctgaagttg gtgcatatct
108241 ctttcaacat tcgacatgag atcattaagg gccatatcgt ctagatttta ttgagatgct
108301 gctcctggat ttggattttg ttgtgctgtt gtacatactg taccaccagt aggtgtagga
108361 gtacatacag tggccacaat aggaggttga ggaggtgtaa ccgttggagt agtacaagaa
108421 atacttccat ccgattgttg tgtacatgta gttgttggta acgtctgaga aggttgggta
108481 gatggcggcg tcgtcgtctt ttgatcttta ttaaatttag agataatatc ctgaacagca
108541 ttgctcggcg tcaacgctgg aaggagtgaa ctcgccggcg catcagtatc tgcagacagc
108601 caatcaaaaa gattagacat atcagatgat gtattagttt gttgtcgtgg ttttggtgta
108661 ggagccggtg tagctgttgg aaccggctgt ggagttatat gaatagttgg ttgtagcggt
108721 tggataggct gtctgctggc ggccatcata ttatctctag ctagttgttc tcgcaactgt
108781 ctttgataat acgactcttg agactttagt cctatttcaa tcgcttcatc ctttttcgta
108841 tccggatcct tttcttcaga ataatagatt gacgactttg gtgtagagga ttctgccagc
108901 ccctgtgaga acttgttaaa gaagtccatt taaggcttta aaattgaatt gcgattataa
108961 gattaaatgg cagacacaga cgatattatc gactatgaat ccgatgatct caccgaatac
109021 gaggatgatg aagaagagga agaagatgga gagtcactag aaactagtga tatagatccc
109081 aaatcttctt ataagattgt agaatcagca tccacttcata tagaagatgc gcattccaat
109141 cttaaacata tagggaatca tatatctgct cttaaacgac gctatactag acgtataagt
109201 ctatttgaaa tagcgggtat aatagcagaa agctataact tgcttcaacg aggaagatta
109261 cctctagttt cagaattttc tgacgaaacg atgaagcaaa atatgctaca tgtaattata
109321 caagagatag aggagggttc ttgtcctata gtcatcgaaa agaacggaga attgttgtcg
109381 gtaaacgatt ttgacaaaga tggtctaaaa ttccatctag actatattat caaaatttgg
109441 aaacttcaaa aacgatatta gaatttatac gaatatcgtt ctctaaatgt cacaatcaag
109501 tctcgcatgt tcagcaattt attgtcgtac tttatatcgt gttcattaac gatatctttgc
109561 aaaatagtaa tgattctatc ttccttcgat agatattctt cagagattat tgtcttatat
109621 tctttcttgt tatcagatat gaatttgata agactttgaa cattattgat acccgtctgt
109681 ttaatttttt ctacagatac tttagttttg gcagattcta tcgtatctgt caatagacat
109741 ccaacatcga cattcgacgt caattgtcta taaatcaacg tataaatttt agaaataaca
109801 ttagcgaatt gttgtgcatt gatgtcgtta ttckgaaaca gtatgatttt aggtagcatt
109861 ttcttaacaa agagaacgta tttattgtta ctcagttgaa cagatgatat atccagatta
109921 ctaacgcatc tgattccata taccaaactt tcagaagaaa tggtgtacaa ttgtttgtat
109981 tcattcaatg tctcttttttc agaaattagt ttagagtcga atactgcaat aattttcaag
110041 agatagtttt catcagataa gattttattt agtgtagata tgatcaaaact attgttttgt
110101 tggagaactt gatacgccgc gttctctgta gtcgacgctc tcaaatggga aacaatctcc
110161 attatttttt tggaatcgga tacaatatct tcggtatctt gacgcaatct agtatacata
110221 gagttaagag aaattagagt ttgtacatta agcaacatgt ctctaaatgt ggctgcaaac
110281 ttttcctttt ccaaatcatc tagtttatta tataccgatt tcacaaacggc accagattta
110341 aggaaccaga atgaaaaact ctgatcacta caatatttca tcatagttac gattttatca
110401 tcttctatag ttggtgtaat agcgcatacc tttttctcca agactggaac caacgtcata
110461 aaaatgttta aatcaaaatc catatcaaca tctgatgtgc taagaccagt ctcgcgttca
110521 agattatctt tactaatggt gacgaactca tcgtatagaa ctctaagttt gtccattatt
110581 tatttacaga tttagttgtt taatttattt gtgctcttcc agagttggga tagtattttt
110641 ctaacgtcgg tattatatta ttaggatcta cgttcatatg tatcataata ttaatcatcc
110701 acgttttgat aaatctatct ttagcttctg aaataacgta tttaaacaaa ggagaaaaat
110761 atttagctac ggcatcagac gcaataacat tttttgtaaa tgtaacgtat ttagacgaca
110821 gatcttcgtt aaaaagtttt ccatctatgt agaatccatc ggttgttaac accattcccg
110881 cgtcagattg aataggagtt tgaatagttt gttttggaaa tagatccttc aataacttat
110941 agttgggtgg gaaaaaatcg attttatcac tagactcttt ctttttttact atcattacct
111001 catgaactat ttcttgaatg agtatatgta ttttctttcc tatatcggac gcgttcattg
111061 gaaaatatac catgtcgtta actataagaa tatttttatc ctcgtttaca aactgaataa
111121 tatcagatgt agttcgtaaa cgaactatat catcaccagc acaacatcta actatatgat
111181 atccactagt ttcctttagt cgtttattat cttgttccat attagcagtc attccatcat
111241 ttaagaaggc gtcaaagata atagggagaa atgacatttt ggattctgtt acaactttac
111301 caaaattaag gatatacgga cttactatct ttttctcaac gtcgatttga tgaacacacg
```

FIG. 22 CONT'D

```
111361 atgaaaatgt acttcgatga gattgatcat gtagaaaaca acaagggata caatatttcc
111421 acatatcatg aaatatatta agaaatccca ccttattata tttccccaaa ggatccatgc
111481 atgtaaacat tatgccgtta tcattaataa agacttcttt ctcatcggat ctgtaaaagt
111541 tgttactgat ttttttcatt ccaggatcta gataattaat aatgatgggt tttctattct
111601 tattctttgt attttggcat atcctagacc agtaaaacagt ttccactttg gtaaaatcag
111661 cagacttttg aacgctatta aacatggcat taatggcaat aactaaaaat gtaaaatatt
111721 tttctatgtt aggaatatgg tttttcactt taatagatat atggtttttg gccaaaatga
111781 tagatatttt tttatccgag gatagtaaaa tattattagt cgccgtctct ataaaaatga
111841 agctagtctc gatatccaat tttattctag aattgatagg agtcgccaaa tgtaccttat
111901 acgttatatc tcccttgatg cgttccattt gtgtatctat atcggacaca agatctgtaa
111961 atagttttac gttattaatc atcacggtat cgccgtcgct agataacgct aatgtaccat
112021 ccaagtccca aatggagaga tttaactgtt catcgtttag aataaaatga ttacggtca
112081 tattaataaa gtgttcatcg tatctagata acaacgactt ataattaatg tccaagtctt
112141 gaactcgctg aatgatcttt tttaacccag ttagttttag attggtacga aatatattgt
112201 taaactttga ttctacagta atgtccaaat ctagttgtgg aaatacttcc atcaacattg
112261 tttcaaactt gataatatta ttatctacat cttcatacga tccaaattcc ggaatagatg
112321 tatcgcacgc tctggccacc cagataacca aaaagtcaca cgctccagga tatacattgt
112381 ataaaaagct atcgttttct agtagtgttt ttttctgagt atatacgaag ggattaaaaa
112441 tagtattatc aacgtaacta tattccaaat tattcttatg agaatagata ataatatcgt
112501 ccttaatatc taacaaattt cctaaatatc cctttaattg agtcattcga agcgtcaata
112561 gaatatgtct cttaactatt tccggctgtt gtatatttaa atgacttcgt aaaaaataat
112621 atatgggcga cttctcatct atgtaatcat atggagtgag atatagggct cgttctacct
112681 cctgccccct acccacctgt aataccaatt gcggacttac tatatatcgc atatttatat
112741 cgtgggggtaa agtgaaaatc tactaccgat gatgtaagtc ttacaatgtt cgaaccagta
112801 ccagatctta atttggaggc ctccgtagaa ctaggggagg taaatataga tcaaacaaca
112861 cctatgataa aggaaaatag cggttttata tcccgtagta gacgtctatt cgcccataga
112921 tctaaggatg atgagagaaa actagcacta cgattctttt tacaaagact ttatttttta
112981 gatcatagag agattcatta tttgttcaga tgcgttgacg ctgtaaaaga cgtcactatt
113041 accaaaaaaa ataacattat cgtggcgcct tatatagcac ttttaactat cgcatcaaaa
113101 ggatgcaaac ttacagaaac aatgattgaa gcattctttc cagaactata taatgaacat
113161 agtaagaaat ttaaattcaa ctctcaagta tccatcatcc aagaaaaact cggataccag
113221 tttggaaact atcacgttta tgattttgaa ccgtattact ctacagtagc tctggctatt
113281 cgagatgaac attcatctgg catttttaat atccgtcaag agagttatct ggtaagttca
113341 ttatctgaaa taacatatag attttatcta attaatctaa aatctgatct tgttcaatgg
113401 agtgctagta cgggcgctgt aattaatcaa atggtaaata ctgtattgat tacagtgtat
113461 gaaaagttac aactggtcat agaaaatgat tcacaattta catgttcatt ggctgtggaa
113521 tcaaaacttc caataaaatt acttaaagat agaaatgaat tatttacaaa attcatcaac
113581 gagttaaaaa agaccagttc attcaagata agcaaacgcg ataaggatac gctactaaaa
113641 tattttactt aggacrggag ttagaattta tagacgactc atttcgttta tcattattag
113701 tattcttctt gttatcttgt tcagaaatat acagcaatgc tatgcctaat actaaataca
113761 ttatcatgct tgcaatggct ctaacaacga cgaaccaaaa tgaattggt cgtagctttt
113821 gttcacaaaa atacataaag aaatgtctac ataaatctat ggcgccattg gctacttgaa
113881 atagcgccag tcctcctaca gattttaata tagctgtata acatgacatt tattcatcat
113941 caaaagagac agagtcacca tctgtcatat ttagattttt tttcatgtgt tcaaagtatc
114001 ctctactcat ttcattataa tagtttatca tacttagaat tttaggacgg atcaatgagt
114061 aagacttgac tagatcgtca gtagtaattt gtgcatcgtc tatttctgca ccgcttcgtc
114121 gaataatgta tagcatcgct ttgagattct ccatagctat caagtctttа tacaatgaca
114181 tggaaatatc tgtgaatact ttatacttct ccaacatcga tgccttaaca tcatcgccta
114241 ctttagcatt gaaaatacgt tctattgtgt agatggatgt agcaagattt ttaaacaaca
114301 atgccatttt acacgatgat tgcctcaagt ctccaatcgt ttgtttagaa cgattagcta
114361 cagagtccaa tgcttggctg actagcatat tattatcttt agaaattgta ttcttcaatg
114421 aggcgtttat catatctgtg atttcgttag tcatattaca gtctgactgg gttgtaatgt
114481 tatccaacat atcacctatg gatacggtac acgtaccagc atttgtaata atcctatcta
114541 agatgttgta tggcattgcg cagaaaatat cttctcctgt aatatttcca ctctcgataa
114601 atctactcag attattctta aatgccttat tctctggaga aaagatatca gtgtccatca
114661 tttcattaat agtatacgca gaaaagatac cacgagtatc aattctatcc aagatactta
114721 tcggttccga gtcacwgata atggtttcct ctccttcggg agatcctgca tagaaatatc
114781 taggacaata gtttctatac tgtctgtaac tctgataatc tctaaagtca ctaactgata
114841 ccatgaaatt gagaagatca aacgctgaag taattaattt ttctgcctcg tttttactac
114901 aactagtttt catcaatgta gtgacgatgt attgtttagt tactcttggt ctaatactga
114961 tgatagagat attattactt cccataatgg atcttctagt agtcacctta aagcccattg
115021 atgcaaatag cagatagata aagtcttggt atgactcctt tctaatatag tacggactac
```

FIG. 22 CONT'D

```
115081 ctttgtcacc caactttata cccacataag ccataacaac ctctttaata gccgtttcat
115141 gaggtttatc agccatgagc ctgagtagtt ggaagaatct catgaatcct gtctcagaaa
115201 gtcctatatg catgatagat ttatctttcc tgggaaactc tcgtatagtc atagatgaaa
115261 tactcttcaa agtttctgaa ataagattag taacagtctt acctccgact actctaggta
115321 acaaacaaac tctaataggt gttttctctg cggagataat atcagaaagg atagagcaat
115381 aagtagtatt attgtgatta taaaqaccga atacataaca ggtagaattt ataaacatca
115441 tgtcctgaag gtttttagac ttgtattcct cgtaatccat accgtcccaa aacatggatt
115501 tggtaacttt gatagccgta gatctttgtt ccttcgccaa caggttaaag aaattaataa
115561 agaatttgtg gtttctacct atgtctacaa attgcacgtt tggaagcgcc acggttacat
115621 tcactgcagc attttgagga tcgcgagtat gaagtacgat gttattgttt actggtatat
115681 ctggaaagaa ttctaccagt ctaggaataa gagattgata tcgcatagaa atacaaaagt
115741 tcataatctc atcatctaag agcattttgt taccattgta ataaatatcc actctgtcat
115801 atgtataaat gaagtactgt tcaaacatga tgagatgttt atatgttggc atagtagtga
115861 gatctacgtt tggtaatggc aatgtattaa gattaactcc ataatgtcta gcagcatctg
115921 cgatgttata agcgttgtca aagcgggtc gatcttgtgc tgttatatat tgtctaacac
115981 ctataagatt atcaaaatct tgtctgctta atacaccgtt aacaattttt gccttgaatt
116041 cttttattgg tgcattaata acatccttat agaggatgtt aaacaaataa gtgttatcaa
116101 agttaagatc tggatatttc ttttctgcta gaacatccat tgagtcggag ccatctggtt
116161 taatataacc accgataaat ctagctctgt attctgtatc cgtcaatcta atattaagaa
116221 ggtgttgagt gaaaggtgga agatcgtaaa agctgtgagt attaatgata ggattagttt
116281 ccgaactaat gttaattggg gtattaataa tatctatatt tccagcgtta agtgtaacat
116341 taaacagttt taattcacgt gacgtggtat caattaaata attaatgccc aatttggata
116401 tagcagcctg aagctcatct tgtttagtta cggatcctaa tgagttatta agcaatatat
116461 cgaacggatg aacgaaggtt gttttaagtt ggtcacatac tttgtaatct agacatagat
116521 gcggaagaac ggtagaaact atacgaaata aatattcaga gtcttctaat tgatcaagag
116581 taactattga cttaataggc atcatttatt tagtattaaa tgacgaccgt accagtgacg
116641 gatatacaaa acgatttaat tacagagttt tcagaagata attatccatc taacaaaaat
116701 tatgaaataa ctcttcgtca aatgtctatt ctaactcacg ttaacaacgt ggtagataga
116761 gaacataatg ccgccgtagt gtcatctcca gaggaaatat cctcacaact taatgaagat
116821 ctatttccag atgatgattc tccggccact attatcgaac gagtacaacc tcatactact
116881 attattgacg atactccacc tcctacgttt cgtagagagt tattgatatc ggaacaacgt
116941 caacaacgag aaaaaagatt taatattaca gtatcgaaaa atgctgaagc aataatggaa
117001 tctagatcta tgatatcttc tatgccaaca caaacaccat ccttgggagt agtttatgat
117061 aaagataaaa gaattcagat gttggaggat gaagtggtta atcttagaaa tcaacgatct
117121 aatacaaaat catctgataa tttagataat tttaccagaa tactatttgg taagactccg
117181 tataaatcaa cagaagttaa taagcgtata gccatcgtta attatgcaaa tttgaacggg
117241 tctcccttat cagtcgagga cttggatgtt tgttcagagg atgaaataga tagaatctat
117301 aaaacgatta aacaatatca cgaaagtaga aaacgaaaaa ttatcgtcac taacgtgatt
117361 attattgtca taaatattat cgagcaagca ttgctaaaac tcggatttga agaaatcaaa
117421 ggactgagta ccgatatcac ttcagaaatt atcgatgtgg agatcggaga tgactgcgat
117481 gctgtagcat caaaactagg aatcggtaac agtccggttc ttaatattgt attgtttata
117541 ctcaagatat tcgttaaacg aattaaaatt atttaattta atacattccc atatccagac
117601 aacaatcgtc tggattaatc tgttcctgtc gtctcatacc ggacgacata ttaatctttt
117661 tattagtagg catcttttta gatggtttct ttttcccagc attaactgag tcgataccta
117721 gaagatcgtg attgatctct ccgaccattc cacgaacttc taattggccg tctctgacgg
117781 taccattaaac tattttacca gcattagtaa cagcttggac aatctgacca tccatcgcat
117841 tgtacgatgt agtagtaact gttgttctac gtctaggagc accagaagta tttttggagc
117901 ccttggatgt tgatgtagaa gaagacgagg attttgattt tggtttacat gtaatacatt
117961 ttgtatcaca tgcgccggca gtcacatctg tttgagaatt aagattattg ttgcctcctt
118021 tgacggctgc atctccaccg atttgcgcta gtagattttt aagctgtggt gtaatcttat
118081 taactgtttc gatataatca tcgtaactgc ttctaacggc taaatttttt ttatccgcca
118141 tttagaagct aaaaatattt ttatttatgc agaagattta actagattat acaatgaact
118201 aatatgatcc ttttccagat tatttacaaa cttggtattt tttggttctg gaggaggcga
118261 atttaaattc ggacttggat ttggattttg tgggttcttg atcttattat acagcgcata
118321 taggatggcg acggtaactg ctacgcaaat accgatcaac aaaagaatac caatcattta
118381 ttgacaataa cttcactatt gatcaagtat gcaatatatc atcttttcac taaataagta
118441 gtaataatga ttcaacaatg tcgagatata tggacgataa taatttagtt catggaaata
118501 tcgctatgat tggtatgaat gactccgcta actctgtggg gcgcgcagtg ctttccccac
118561 atagaataaa ttagcattcc gactgtgata ataataccaa gtataaacgc cataatactc
118621 aatactttcc atgtacgagt gggactggta gacttactaa agtcaataaa ggcgaagata
118681 cacgaaagaa tcaaaagaat gattccagcg attagcacgc cggaaaaata atttccaatc
118741 ataagcatca tatccattta actaataaaa attttaaatc gccgaatgaa caaagtggaa
```

FIG. 22 CONT'D

```
118801 tataaaccat ataaaaacaa tagtttgtac tgcaaaaata atatctattt ttgttttcga
118861 agatatggta aaattaaata gtagtacaca gcatgttata actaacagca gcaacggctc
118921 gtaattactt atcatttact agacgaaaag gtggtgggat attttcttgc tcaaataata
118981 cgaatatatc acccatccat tttatgcgat gtttatatac tctaatcttt aatagatcta
119041 tagacgacgg gtttaccaac aatatagatt ttatcgattc atctaattta aacccttcct
119101 taaacgtgaa tgatctatta tctggcataa cgatgactct acccgatgaa tcggacaatg
119161 tactgggcca tgtagaataa attatcaacg aattatcgtc tacgaacatt tatatcattt
119221 gttttaattt tagtacgcga ataaatagat ataaaataga aaataacaga tattacaacc
119281 aatgttatgg ccgcgcccaa ccaggtaggc agttttattt tatcttttac tacaggttct
119341 cctggatgta cgtcaccaac ggcggacgta gttctagtac aattcgacgt aagttccgct
119401 tgggaatttt ttaacgctaa agagttaacg ttaatcgtgc acccaacgta tttacatcta
119461 gttctttgaa catcttgatt ataatataac catttttcat ctctagattc gtcggtgcac
119521 tcatgtaacc aacataccct aggtcctaaa tatttatctc cggaattaga ttttggataa
119581 ttcgcgcacc aacaatttct atttccttta tgatcgttac aaaagacgta taatgccgta
119641 tccccaaaag taaaataatc aggacgaata attctaataa actcagaaca atatctcgca
119701 tccatatgtt tggagcaaat atcggaataa gtagacatag ccggttttcg ttttgcacgt
119761 aaccattcta aacaattggg gtttccagga tcgtttctac aaaatccagt catgaaatca
119821 tcacaatgtt ctgtcttgta attattatta aatatttttg gacagtgttt ggtatttgtc
119881 ttagaacaac attttgccac gctatcacta tcgcccaggg gataatcctt ttttataaaa
119941 tgacatcgtt gcccggatgc tatataatca gtagcgtgtt ttaaatcctt aatatattca
120001 ggagttacct cgttctgata atagattaat gatccaggac gaaatttgaa agaactacat
120061 ggttctccat gaattaatac atattgtttc gcaaattcag gaactataaa actactacaa
120121 tgatctatcg acataccatc tatcaaacaa aacttgggtt taatttctcc cggagatgtt
120181 tcataatagt acgtataact ttcttctgca aacttaacag ctctattata ttcaggataa
120241 ttaaaaccta attccatata tttgtctcgt atatctgcta ttcctggtgc tattttgatt
120301 ctattaagag taacggctgc cccattttt aataatcgtc agtatttaaa ctgttaaatg
120361 ttggtatatc aacatttacc ttatttcccg cagtataagg tttgttgcag gtatactgtt
120421 caggaatggt tacatttata ctttttctat agtcctgtct ttcgatgttc atcacatatg
120481 caaagaacag aataaacaaa ataatgtaag aaataatatt aaatatctgt gaattcgtaa
120541 atacattgat tgccataata attacagcag ctacaataca tacaatagac attcccacag
120601 tgttgccatt acctccacga tacatttgag ttactaagca ataggtaata actaagctag
120661 taagaggcaa tagaaaagat gagataaata tcatcaatat agagattaga ggagggctat
120721 atagagccaa gacgaacaaa atcaaaccga gtaacgttct aacatcatta tttttgaaga
120781 ttcccaaata atcattcatt cctccataat cgttttgcat catacctcca tctttaggca
120841 taaacgattg ctgctgttcc tctgtaaata aatctttatc aagcactcca gcacccgcag
120901 agaagtcgtc aagcatattg taatatctta aataactcat ttatatatta aaaaatgtca
120961 ctattaaaga tggagtataa tctttatgcc gaactaaaaa aaatgacttg tggtcaaccc
121021 ctaagtcttt ttaacgaaga cggggatttc gtagaagttg aaccgggatc atcctttaag
121081 tttctgatac ctaagggatt ttacgcctct ccttccgtaa agacgagtct agtatttgaa
121141 acattaacaa cgaccgataa taaaattact agtatcaatc caacaaatgc gccaaagtta
121201 tatcctcttc aacgcaaagt cgtatctgaa gtagtttcta atatgaggaa aatgatcgaa
121261 tcaaaacgtc ctctatacat cactcttcac ttggcgtgtg gatttggtaa gactattacc
121321 acgtgttatc ttatggctac acacggtaga aaaaccgtca tttgcgtacc caataaaatg
121381 ttaatacatc aatggaagac acaggtagag gcagtcggat tggaacataa gatatccata
121441 gatggagtaa gtagtctatt aaaggaacta aagactcaaa gtccggatgt attaatagta
121501 gtcagtagac atctgacaaa cgatgccttt tgtaaatata tcaataagca ttatgatttg
121561 ttcatcttgg atgaatcaca tacgtataat ctgatgaaca atacagcagt tacaagattt
121621 ttagcgtatt atcctccgat gatgtgttat tttttaactg ctacacctag accatctaac
121681 agaatttatt gtaacagtat tattaatatt gccaagttat ccgatctaaa aaaaactatc
121741 tatgcagtag atagtttttt tgagccatat tccacagata atattagaca tatgataaaa
121801 cgattagatg gaccatctaa taaatatcat atatataccg agaagttatt atctgtagac
121861 gagcctagaa atcaacttat tcttaatacc ctggtagaag aattcaagtc aggaactatt
121921 aatcgcattt tagttattac taaactacgt gaacatatgg tattcttcta caaacgatta
121981 ttagattttt tcggatcaga ggttgtattt ataggagacg cccaaaatag acgtactcca
122041 gatatggtca aatcaatcaa ggaactaaat agatttatat tcgtatccac cttatttat
122101 tccggtactg gtttagatat tcctagtttg gattctttgt tcatttgctc ggcagtaatc
122161 aacaatatgc aaatagagca attactaggg agggtatgtc gagaaacaga actattagat
122221 aggacggtat atgtatttcc tagcacatcc atcaaagaaa taaagtacat gataggaaat
122281 ttcgttcaac gaattattag tctgtctgta gataaactag gatttaaaca aaaaagttat
122341 cggaaacatc aagaatccga tcccacttct gtatgtacaa catcctccag agaagaacgt
122401 gtatttaata gaatatttaa ctcgcaaaat cgttaagaag tttaagcgac gatccgcatg
122461 ctgcgcaggc cagtgtatta cccctcatag tattaatata atccaatgat acttttgtga
```

FIG. 22 CONT'D

```
122521 tgtcggaaat cttaaccaat ttagactgac aggcagaaca cgtcatgcaa tcatcatcgt
122581 catcgataac tgtagtcttg ggcttctttt tgcggctctt cattccggaa cgcacattgg
122641 tgctatccat ttaggtagta aaaaataagt cagaatatgc cctatagcac gatcgtgcaa
122701 aacctggtat atcgtctcta tctttatcac aatatagtgt atcgacatct ttattattat
122761 tgacctcgtt tatcttggaa catggaatgg gaacattttt gttatcaacg gccacctttg
122821 ccttaattcc agatgttgta aaattataac taaacagtct atcatcgaca caaatgaaat
122881 tcttgtttag acgtttgtag tttacgtatg cggctcgttc gcgtctcatt ttttcagata
122941 ttgcaggtac tataatatta aaaataagaa tgaaatanca taggattaaa aataaagtta
123001 tcatgacttc tagcgctgat ttaactaact taaaagaatt acttagtctg tacaaaagtt
123061 tgaaattttc agattctgcg gctatagaaa agtataattc tttggtagaa tggggaacat
123121 ctacttactg gaaaatagge gtgcaaaagg tagctaatgt cgagacgtca atatctgatt
123181 attatgatga ggtaaaaaat aaaccgttta atattgatcc gggctattac attttcttac
123241 cggtatattt tgggagcgtc tttatttatt cgaagggtaa aaatatggta gaacttggat
123301 ctggaaactc ttttcaaata ccagatgata tgcgaagtgc gtgtaacaaa gtattagaca
123361 gcgataacgg aatagacttt ctgagatttg ttttgttaaa caatagatgg ataatggaag
123421 atgctatatc aaaatatcag tctccagtta atatatttaa actagctagt gagtacggat
123481 taaacatacc caaatattta gaaattgaaa tagaggaaga cacattattt gacgacgagt
123541 tatactctat tatagaacgc tctttcgatg ataaatttcc aaaaatatcc atatcgtata
123601 ttaagttggg agaacttagg cggcaagttg tagactttct caaatcctca ttcatgtata
123661 ttgagtccat caaggtagat cgtataggag ataatatttt tattcctagc gttataacaa
123721 aatcaggaaa aaagatatta gtaaaagatg tagaccattt aatacgatcc aaggttagag
123781 aacatacatt tgtaaaagta aaaaagaaaa acacattttc cattttatac gactatgatg
123841 gaaacggaac agaaactaga ggagaagtaa taaaacgaat tatagacact ataggacgag
123901 actattatgt taacggaaag tatttctcta aggttggtag tgcaggctta aagcaattga
123961 ctaataaatt agatattaat gagtgcgcaa ctgtcgatga gttagttgat gagattaata
124021 aatccggaac tgtaaaacga aaaataaaaa accaatcagc atttgattta agcagagaat
124081 gtttgggata tccagaagcg gattttataa cgttagttaa taacatgcgg ttcaaaatag
124141 aaaattgtaa ggttgtaaat ttcaatattg aaaatactaa ttgtttaaat aacccgagta
124201 ttgagactat atatggaaac tttaaccagt tcgtctcaat ctttaatatc gtcaccgatg
124261 tcaaaaaaag attattcgag tgaaataata tgcgcctttg atatagggtgc aaaaaatcct
124321 gccagaactg ttttagaagt caaggataac tccgttaggg tattggatat atcaaaatta
124381 gactggagtt ctgattggga aaggcacata gctaaagatt tgtcacaata tgaatacact
124441 acagttcttc tagaacgtca gcctacaagg tcgccgtacg tcaaatttat ctattttatt
124501 aaaggctttt tatatcatac atcggctgcc aaagttattt gcgtctcgcc tgtcatgtct
124561 ggtaattcat atagagatcg aaaaaacgaga tcggtcgaag catttcttga ttggatggac
124621 acattcggat tgcgagactc cgttccggat agacgcaaat tagacgatgt agcggatagt
124681 ttcaatttgg ctatgagata cgtattagat aaatggaata ctaattatac accttataat
124741 aggtgtaaat ctagaaatta cataaaaaaa atgtaataac gttagtaacg ccattatgga
124801 taatctattt accttctatc atgaaataga agatagatat gccagaacta tttttaactt
124861 tcatctaata agttgcgatg aaatacgaga tatatatggt cttatgaaag aacgcatttc
124921 ctcagaggat atgtttgata atatagtgta taataaagat atacatcatg ccattaagaa
124981 actagtgtat tgcgacatcc aacttactaa acacattatt aatcagaata cgtatccggt
125041 atttaacgat tcttcacaag tgaaatgttg tcattatttc gatataaact cagataatag
125101 caatattagc tctcgtacag tagagatatt tgagagggaa aagtcatctc ttgtatcata
125161 tattaaaact accaataaga agagaaaggt caattatggg gaaatnaaga aaactgtaca
125221 tggaggcact aatgcaaatt actttccggg taaaaagtct gatgagtatc tgagcactac
125281 agtcaggtcc aacatteatc aaccttggat caaaaccatt tctaagagaa tgagagtaga
125341 tatcattaat cactctatag taacgcgtgg aaaaagctct atattacaaa ctatagaaat
125401 tatttttact aatagaacat gtgtgaaaat attcaaggat tctactatgc acattattct
125461 atccaaggac aaggatgaaa agggqtgtat acacatgatt gacaaattat tctatgtcta
125521 ttataattta tttctgttgt tcgaggatat catccaaaac gagtacttta aagaagtagc
125581 taatgttgta aaccacgtac tcacgcctac ggcattagat gagaaattat tcctaattaa
125641 gaaaatggct gaacacgatg tttatggagt tagcaatttc aaaatagggg tgtttaacct
125701 gacatttatt aagtcgttgg atcataccgt tttcccctct ctgttagatg aggatagcaa
125761 aataaagttt tttaagggga aaaagctcaa tattgtagca ttacgatctc tggaggattg
125821 tataaattac gtgactaaat ccgagaatat gatagaaatg atgaaggaaa gatcgactat
125881 ttaaaatagc atagatatag aaacggaatc ggtagatcgt ctaaaagaat tgcttctaaa
125941 atgaaaaaaa aacactaatt cagaaatgga tcaacgactc ggatataagt ttttggtgcc
126001 tgatcctaaa gccggagttt tttatagacc gttacatttc caatatgtat cgtattctaa
126061 ttttatattg catcgattgc atgaaatctt gaccgtcaag cggccactct tatcgtttaa
126121 gaataaatca gaacgaatta tgatagaaat tagcaatgtt aaagtgactc ctccagatta
126181 ctcacctata atcgcgagta ttaaaggtaa gagttatgac gcattagcca cgttcactgt
```

FIG. 22 CONT'D

```
126241 aaatatcttt aaagaggtaa tgaccaaaga gggtatatcc atcactaaaa taagtagtta
126301 tgagggaaaa gattctcatt tgataaaaat tccgctacta ataggatacg ggaataaaaa
126361 tccacttgat acagccaagt atcttgttcc taatgtcata ggtggagtct ttatcaataa
126421 acaatctgtc gaaaaagtag gaatttatct agtagaaaag attacaacat ggccaaaatt
126481 tagggttgtt aagccaaact cattcacttt ctcgttttcc tccgtatccc ctcctaatgt
126541 attaccgaca agatatcgcc attacaagat atctctggat atatcacaat tggaagcgtt
126601 gaatatatca tcgacaaaga catttataac ggtcaatatt gttttgctgt ctcaatattt
126661 atctagagtg agtctagaat tcattagacg tagtttatca tacgatatgc ctccagaagt
126721 tgtctatcta gtaaacgcga taatagatag tgctaaacga attactgaat ctattactga
126781 ctttaatatt gatacataca ttaatgacct ggtggaagct gaacacatta aacaaaaatc
126841 tcagttaacg atcaacgagt tcaaatatga aatgctgcat aacttttac ctcatatgaa
126901 ctatacaccc gatcaactaa agggatttta tatgatatct ttactaagaa agtttctcta
126961 ctgtatctac cacacttcta gatatccaga tagagattcg atggttttgtc atcgcatcct
127021 aacgtacggc aaatattttg agacgttggc acatgatgaa ttagagaatt acataggcaa
127081 catccgaaac gatatcatga acaatcacaa gaacagaggc acttacgcgg taaacattca
127141 tgtactaaca actcctggac ttaatcatgc attttctagt ctattgagtg gaaagttcaa
127201 aaagtcagac ggtagttatc gaacacatcc tcactattca tggatgcaga atatttctat
127261 tcctaggagt gttggatttt atccggatca agtaaagatt tcaaagatgt tttctgtcag
127321 aaaatacctt ccaagtcaat atctttactt ttgttcatcg gacgttccgg aaagaggtcc
127381 tcaggtaggt ttagtatctc aattgtctgt cttgagttcc attacaaata tactaacgtc
127441 tgagtatttg gatttggaaa agaaaatttg tgagtatatc agatcatatt ataaagatga
127501 tataagttac tttgaaacag gatttccaat cactatagaa aatgcttctag tcgcatctct
127561 taatccaaat atgatatgtg attttgtaac tgactttaga cgtagaaaac ggatgggatt
127621 cttcggtaac ttggaggtag gtattacttt agttagggat cacatgaatg aaattcgcat
127681 taatattgga gcgggaagat tagtcagacc attcttggtt gtggataacg gagagctcat
127741 gatggatgtg tgtccggagt tagaaagcag attagacgac atgacattct ctgacattca
127801 gaaagagttt ccgcatgtca tcgaaatggt agatatagaa caatttactt ttagtaacgt
127861 atgtgaatcg gttcaaaaat ttagaatgat gtcaaaggat gaaagaaagc aatacgattt
127921 atgtgacttt cctgccgaat ttagacatgg atatgtagca tcttcactag tgggaatcaa
127981 tcacaattct ggacccagag ctattcttgg atgtgctcaa gctaaacaag ctatctcttg
128041 tctgagctcg gatatacgaa ataaaataga caatggaatt catttgatgt atccagagag
128101 gccaatcgtg attagtaagg ctttacaaac ttcaaagatt gcggctaatt gcttcggcca
128161 acatgttact atagcattaa tgtcgtacaa aggtatcaat caagaggatg gaattatcat
128221 caaaaaacaa tttattcaga gaggcggtct cgatattgtt acagccaaga aacatcaagt
128281 agaaaattccg ttggaaaact ttaataacaa agaaagagat aggtctaacg cctattcaaa
128341 attagaaagt aatggattag ttagactgaa tgctttcttg gaatccggag acgctatagc
128401 acgaaatatc tcatcaagaa ctcttgaaga tgattttgct agagataatc agattagctt
128461 tgatgtttcc gaaaaatata ccgatatgta caaatctcgc gttgaacgag tacaagtaga
128521 acttactgac aaagttaagg tacgagtatt aaccatgaaa gaaagaagac ccattctagg
128581 agacaaattt accactagaa cgagtcaaaa gggaacagtc gcgtatatcg cggatgaaac
128641 ggaacttcca tacgatgaaa atggtatcac accagatgtc attattaatt ctacatccat
128701 cttctctaga aaaactatat ctatgttgat agaggttatt ttaacagccg catattctgc
128761 taagccgtac aacaataagg gagaaaaccg acctgtctgt tttcctagta gtaacgaaac
128821 atccatcgat acatatatgc aattcgctaa acaatgttat gagcattcaa atccgaaatt
128881 gtctgatgaa gaattatcgg ataaaatctt ttgtgaaaag attctctatg atcctgaaac
128941 ggataagcct tatgcatcca aagtatttct tggaccaatt tattacttgc gtctgaggca
129001 tttaactcag gacaaggcaa ccgttagatg tagaggtaaa aagacgaagc tcattagaca
129061 ggcgaatgag ggacgaaaac gtggaggagg tatcaagttc ggagaaatgg agatcgagct
129121 tttaatagcg catggtgcag ccaatactat tacagaagtt ttgaaagatt cggaagaaga
129181 ttatcaagat gtgtatgttt gtgaaaattg tggagacata gcagcacaaa tcaagggtat
129241 taatacatgt cttagatgtt caaaacttaa tctctctcct ctcttaacaa aaattgatac
129301 cacgcacgta tctaaagtat ttcttactca aatgaacgcc agaggcgtaa aagttaaatt
129361 agatttcgaa cgaaggcctc cttcgtttta taaaccatta gataaagttg atctcaaacc
129421 gtcttttctg gtgtaatatt ctagtttggt agtagataca tatcaatatc atcaaattcg
129481 agatccgaat tataaaatgg gcgtggattg ttaactatag aatcggacgt ctgtattcgg
129541 aaaatctgtg gagttttagg ttttggtgga ggtgtaactg ctacttggga tactgaagtc
129601 tgatattcag aaagctgggg gatgttctgg ttcgacatcc accgatggtg tcacatcact
129661 aatcggttcg gtaacgtctg tggacgatgg aggcaccact tctacaggtt ctggttcttt
129721 atcctcagtc atcaacggag ctacttcaat gcgaggaaat gtataatttg gtaatggttt
129781 ctcatgtgga tctgaagaag aggtaagata tctactagaa agatacccgat cacgttctag
129841 ttctcttttg tagaacttaa cttttttctt ctccgcatct agttgatatt ccaacctctt
129901 cacgttcgca tgggttacct ccgcagtttt tacgagcgat ttcacgttca gccttcatgc
```

FIG. 22 CONT'D

```
129961 gtcttatagc atgaattcgc ttatcgttat cgggtttagc ttctgtcacc ttagcaattc
130021 ctttttttatt aaactctaca taatcatatc catttctatt gttttgttcta atataaacga
130081 gtatagcatc attgctaaat ttttcaatag tatcgaaaac agaatatcct aaaccatata
130141 atatatattc aggaacactc aaactaaatg tccaggattc tcctaaatac gtaaacttta
130201 atagtgcgaa atcattcaaa aatctaccac ttatagatag atagatagta cataaatgcg
130261 tatagtagtc tacctatctc tttattatga aaaccgggat tacgatcata tatgtcgtga
130321 tatacctgtg atccgtttac gttaaaccat aaatacatgg gtgatcctat aaacatgaat
130381 ttatttctaa ttctcagagc tatagttaat tgaccgtgta atatttgctt acatgcatac
130441 ttgatacgat cattaataag atttttatca ttgctcgtta tttcagaatc gtatatataa
130501 ggagtaccat cgtgattctt accagatatt atacaaaata ctatatataa aatatattga
130561 cccacgttag taatcatgta aatgtttaac gttttaaatt ttgtattcaa tgatccatta
130621 tcatacgcta gcatggtctt atgatattca ttctttaaaa tataatattg tgttagccat
130681 tgcattgggg ctcctaatgg agatttttta ttctcatcca ttttaggata ggctttcata
130741 aagtcoctaa taacttcgtg aataatgttt ctatgttttc tactgatgca tgtatttgct
130801 tcgatttttt tatcccatgt ttcatctatc atagatttaa acgcagtaat gctcgcaaca
130861 ttaacatctt gaaccgttgg tacaattccg ttccataaat ttataatgtt cgccatttat
130921 ataactcatt ttttgaatat acttttaatt aacaaaangag ttaagttact catatggacg
130981 ccgtccagtc tgaacatcaa tcttttttagc cagagatatc atagccgctc ttagagtttc
131041 agcgtgattt tccaacctaa atagaacttc atcgttgcgt ttacaacact tttctatttg
131101 ttcaaacttt gttgttacat tagtaatctt ttttttccaaa ttagttagcc gttgtttgag
131161 agtttcctca ttgtcgtctt catcggcttt aacaattgct tcgcgtttag cctctggctt
131221 tttagcagcc gttgtagaaa aaaattcagt tgctggaatt gcaagatcgt catctccggg
131281 gaaaagagtt ccgtccattt aaagtacaga ttttagaaac tgacactctg cgttatttat
131341 atttggtaca acacatggat tataaatatt gatgttaata acatccagaaa atgtaaagtc
131401 tatacattgt tgcatcgtgt taaattttct aatggatcta gtattattgg gtccaacttc
131461 tgcctgaaat ccaaatatgg aagcggatac aaaaccgttt cctggataaa ncacacatct
131521 ccacttttgc tttacatcag aaattgtgtn gttgacatct tgaactctcc tatctaatgc
131581 cggtgttcca cctatagatt ttgaatattc gaatgctgca tgagtagcat taaattcctt
131641 aatattgcca taatttttcat atattcagta accctggata aaaagtaaac acaccgcagc
131701 cgtagctacc acaataaaaa aaattgatag agagttcatt tataatctat tagaagctga
131761 caaaatttct ttacacgcat cagacaatgc tttaataaat agttcaacat ctacttttgt
131821 catatcgaac cgatggtatg attctaacct agaattacat ccgaaaaagt tgactatgtt
131881 catagtcatt aagtcattaa caaacaacat tccagactct ggattataag acgatactgt
131941 ttcgtcacaa ttacctacct taatcatgtg attatgaata ttggctatta gagcaccttc
132001 taagaaatct ataatatctt tgaaacacga tttaaaatca aaccacgaat atacttctac
132061 gaagaaagtt agtttaccca taggagaaat aactataaat ggagatctaa atacaaaatc
132121 cggatctatg atagttttaa cattattata ttctctatta aatacctcca catctaaaaa
132181 tgttaatttt gaaactatgt cttcgtttat taccgtacct gaactaaacg ctataagctc
132241 tattgtttga gaactcttta aacgatattc ttgaaataca tgtaacaaag tttcctttaa
132301 ctcggtcggt ttatctacca tagttacaga atttgtatcc ttatctataa tataataatc
132361 aaaatcgtat aaagttatat aattatcgcg ttcagattgg gatcttttca aatagactaa
132421 aaaccccatt tctctagtaa gtatcttatg tatatgtttg taaaatatct tcatggtggg
132481 aatatgctct accgcagtta gccattcctc attgacagcg gtagatgtat tagacaaaac
132541 tattccaatg tttaacaagg gccattttac gagattatta aatccttgtt tgataaatgt
132601 agccaatgag ggttcgagtt caacgacgat tgaattctct tcccgcggat gctgcatgat
132661 gaacgacggg atgttgttcg attgatttgg aattcttttt cgacttttttg tttatattaa
132721 atattttaaa atttatagcg gatagcaatt catgtaccac ggataatgta gacgcgtatt
132781 gcgcatcgat atctttatta ttagataaat ttatcaataa atgtgagaag tttgcctcgt
132841 taaggtcttc catttaaata ttatataaac atttgtgttt gtatcttatt cgtcttttat
132901 ggaatagttt tttactagta aagctgcaat tacacacttt gtccgtaaaa cataaatata
132961 aacaccagct tttatcaatc gttccaaaaa gtcgacggcg gacatttta acatggcatc
133021 tattttaaat acacttaggt ttttgcaaaa aacatcattt tataattgta acgattcaat
133081 aactaaagaa aagattaaga ttaaacataa gggaatgtca tttgtatttt ataagccaaa
133141 gcattctacc gttgttaaat acttgtctgg aggaggtata tatcatgatg atttggttgt
133201 attgggaaag gtaacaatta atgatctaaa gatgatgcta ttttacatgg atttatcata
133261 tcatggagtg acaagtagtg gaacaattta caaattggga tcgtctatcg atagactttc
133321 tctaaatagg actattgtta caaaagttaa taattataat tatgatacat tttttgacga
133381 tgatgattga tcgctattgc acaatttttgt ttttttactt tctaatatag cgtttagatt
133441 cttttttcatg tgcgaatatt gatttactaa aatatctatg tttaactttt gttctataac
133501 gtccttatcg gcggtatcgg tacatatacg taattcacct tcacaaaata cggagtcttc
133561 gataataata gccaatcgat tattggatct agctgtctgt atcatattca acatgtttaa
133621 tatatccttt cgtttcccct ttacaggcat cgatcgtagc atattttccg cgtctgagat
```

FIG. 22 CONT'D

133601 ggaaatgtta aaactacaaa aatgcgtaat gttagcccgt cctaatattg gtacgtgtct
133741 ataagtttgg catagtagaa taatacacgt gtttaaatgc cttccaaagt ttaagaattc
133801 tattagagta ttgcattttg atagtttatc gcctacatca tcaaaaataa gtaaaaagtg
133861 tgctgatttt ttatgatttt gtgcgacagc aatacatttt tctatgttac ttttagttcg
133921 tatcagatta tattctagag attcctgact actaacgaaa ttaatatgat ttggccaaat
133981 gtatccatca taatctggat tataaacggg tgtaaacaag aatacatgtt tatatttttt
134041 aactagtgta gaaaacagag atagtaaata gatagttttt ccagatccag atcctcccgt
134101 taaaaccatt ctaaacggca ttttttaataa attttctctt gaaaattgtt tttcttggaa
134161 acaattcata attatattta cagttactaa attaatttga taataaatca aaatatggaa
134221 aactaaggtc gttagtaggg aggagaacaa agaaggcaca tcgtgacata aataacattt
134281 attatcatga tgacaccaga aaacgacgaa gagcagacat ctgtgttctc cgctactgtt
134341 tacagagaca aaattcaggg aaagaataaa cgcaaacgcg tgattggtct atgtattaga
134401 atatctatgg ttatttcact actatctatg attaccatgt ccgcgtttct catagtgcgc
134461 ctaaatcaat gcatgtctgc taacgaggct gctattactg acgccgctgt tgccgttgct
134521 gctgcatcat ctactcatag aaaggttgcg tctagcacta cgcaatatga tcacaaagaa
134581 agctgtaatg gtttatatta ccaggcttct tgttatatat tacattcaga ctaccagcta
134641 ttctcggatg ctaaagcaaa ttgcactgcg gaatcatcaa cactacccaa taaatccgat
134701 gtcttgacta cctggctcat tgattatgtt aaggatacat ggggatctga tggtaatcca
134761 attacaaaaa ctacatccga ttatcaagat tctgatgtat cacaagaagt tagaaagtat
134821 ttttgtgtta aaacaatgaa ctaatatttta ttttttgtaca ttaataaatg aaatcgctta
134881 atagacaaac tgtaagtagg tttaagaagt tgtcggtgcc ggtcgctata atgatgatac
134941 tctcaaccat tattagtggc ataggaacat ttctgcatta caaagaagaa ctgatgccta
135001 gtgcttgcgc caatggatgg atacaatacg ataaacattg ttatttagat actaacatta
135061 aaatgtctac agataatgcg gtttatcagt gtcgtaaatt acgagccaga ttgcctagac
135121 cggatactag acatctgaga gtattgttta gtatttttta taaagattat tgggtaagtt
135181 taaaaaagac caatgataaa tggttagata ttaataatga taaagatata gatattagta
135241 aattaacaaa ttttaaacaa ctaaacagta cgacggatgc tgaagcgtgt tatatataca
135301 agtctggaaa actggttaaa acagtatgta aaagtactca atctgtacta tgtgttaaaa
135361 aattctacaa gtgacaacaa aaaatcaatt aataataagt cgttaacgta cgccgccatg
135421 gacgccgcgt ttgttattac tccaatgggt gtgttgacta taacagatac attgtatgat
135481 gatctcgata tctcaatcat ggactttata ggaccataca ttataggtaa cataaaaact
135541 gtccaaatag atgtacggga tataaaatat tccgacatgc aaaaatgcta ctttagctat
135601 aagggtaaaa tagttcctca ggattctaat gatttggcta gattcaacat ttatagcatt
135661 tgtgccgcat acagatcaaa aaataccatc atcatagcat gcgactatga tatcatgtta
135721 gatatagaag ataaacatca gccattttat ctattccgat ctattgatgt ttttaacgct
135781 acaatcatag aagcgtataa cctgtataca gctggagatt atcatctaat catcaatcct
135841 tcagataatc tgaaaatgaa attgtcgttt aattcttcat tctgcatatc agacggcaat
135901 ggatggatca taattgatgg gaaatgcaat agtaatttct tatcataaaa gttgtaaagt
135961 aaataataaa acaataaata ttgaactagt agtacgtata ttgagcaatc agaaatgatg
136021 ctggtacctc ttatcacggt gaccgtagtt gcgggaacaa tattagtatg ttatatatta
136081 tatatttgta ggaaaaagat acgtactgtc tataatgaca ataaaattat catgacaaaa
136141 ttaaaaaaga taaagagttc taattccagc aaatctagta aatcaactga tagcgaatca
136201 gactgggagg atcactgtag tgctatggaa caaaacaatg acgtagataa tatttctagg
136261 aatgagatat tggacgatga tagcttcgct ggtagtttaa tatgggataa cgaatccaat
136321 gttatggcgc ctagcacaga acacatttac gatagtgttg ctggaagcac gctgctaata
136381 aataatgatc gtaatgaaca gactatttat cagaacacta cagtagtact taatgaagat
136441 accaaacaga atcctaacta ttcatccaat cctttcgtaa attataataa aaccagtatt
136501 tgtagcaagt caaatccgtt cattacagaa ctcaacaata aatttagtga gaataatccg
136561 tttagacgag cacatagcga tgattatctt aataagcaag aacaagatca tgaacacgat
136621 gatatagaat cattggtgtg attagtttcc tttttataaa attgaagtaa tatttagtat
136681 tattgctgcc gtcacgttgt acaaatggag atattccctg tattcggcat ttctaaaatt
136741 agcaatttta ttgctaataa tgactgtaga tattatatag atacagaaca tcaaaaaatt
136801 atatctgatg agatcaatag acagatggat gaaacggtac ttcttaccaa catcttaagc
136861 gtagaagttg taaatgacaa tgagatgtac catcttattc ctcatagatt atcgacgatt
136921 atactctgta ttagttctgt cggaggatgt gttatctcta tagataatga cgtcaatggc
136981 aaaaatattc taacctttcc cattgatcat gctgtaatca tatccccact gagtaaatgt
137041 gtcgtagtta gcaagggtcc tacaacaata ttggttgtta aagcggatat acctagcaaa
137101 cgattggtaa catcgtttac aaacgacata ctgtatgtaa acaatctatc actgattaat
137161 tattcgccgt tgtctgtatt cattattaga cgagttaccg actatttgga tagacacata
137221 tgcgatcaga tatttgcgaa taataagtgg tattccatta taaccatcga caataagcag
137281 tttcctattc catcaaactg tataggtatg tcctctgcca agtacataaa ttctagcatc
137341 gagcaagata ctttaataca tgtttgtaac ctcgagcatc cattcgactt agtatacaaa

FIG. 22 CONT'D

```
137401 aaaatgcagt cgtacaattc tgtacctatc aaggaacaaa tattgtacgg tagaattgat
137461 aatataaata tgagcattag tatttctgtg gattaataga tttctagtat ggggatcatt
137521 aatcatctct aatctctaaa tacctcataa aacgaaaaaa aagctattat caaatactgt
137581 acggaatgga ttcattctct tctcttttta tgaaactctg ttgtatatct actgataaaa
137641 ctggaagcaa aaaatctgat aaaaacaata agaataagat caaggattat tataaaataa
137701 caatagttcc tggttcctct tccacgtcta ctagctcgtg gtattataca catgcctagt
137761 aatagtctct ttgcgttgac ggaaagcaga ctagaaataa caggctaaaa tgttcagaca
137821 ccataatagt tcccaaccca gataataaca gagtaccatc aacacattcc tttaaactca
137881 atcccaaacc caaaaccgtt aaaatgtatc cggccaattg atagtagata atgaggtgta
137941 cagcgcatga tgatttacac agtaaccaaa atgaaaatac tttagtaatt ataagaaata
138001 tagatggtaa cgtcatcatc aacaatccaa taatatgccg gagagtaaac attgacggat
138061 aaaacaaaaa tgctccgcat aactctatca tggcaataac acaaccaaat acttgtaaga
138121 ttcctaaatt agtagaaaat acaacggata tcgatgtata agtgatctcg agaaataata
138181 agaataaagt aatgcccgta aagataaaca tcaacattgt ttggtaatca ttaaaccaat
138241 tagtatgaag ttgaactaat ttcacagtag attttattcc agtattatcc ccgcatgtat
138301 aagtacctgg taagatatct ttatattcca taatcaatga gacatcacta tctgataacg
138361 aatgaagtct agcactagta tgccatttac ttaatattgt cgtcttggaa gttttattat
138421 aagttaaaat atcatggtta tccaatttcc atctaatata ctttgtcgga ttatctatag
138481 tacacggaat aatgatggta tcattacatg ctgtatactc tatggtcttt gtagttgtta
138541 taacaaccaa cgtatagagg tatatcaacg atatttctaac tcttgacatt ttttatttat
138601 ttaaaatgat acctttgtta tttatttttat tctatttttgc taacggtatt gaatggcata
138661 agtttgaaac gagtgaagaa ataatttcta cttacttatt agacgacgta ttatacacgg
138721 gtgttaatgg ggcggtatac acatttttcaa ataataaact aaacaaaact ggtttaacta
138781 ataataatta tataacaaca tctatcaaag tagaggatgc ggaaccaata acggaaatcc
138841 caaatgttgg aaaatagacg gttcagacga cccaaaacat agaggtagag gatacgctcc
138901 ttatcaaaat agcaaagtaa cgataatcag tcacaacgga tgtgtactat ctgacataaa
138961 catatcaaaa gaaggaatta aacgatggag aagatttgac ggaccatgtg gttatgattt
139021 atacacggcg gataacgtaa ttccaaaaga tggtttacga ggagcattcg tcgataaaga
139081 tggtacttat gacaaagttt acattctttt cactgatact atcggctcaa agagaattgt
139141 caaaattccg tatatagcac aaatgtgcct aaacgacgaa ggtggtccat catcattgtc
139201 tagtcataga tggtcgacgt ttctcaaagt cgaattagaa tgtgatatcg acggaagaag
139261 ttatagacaa attattcatt ctagaactat aaaaacagat aatgatacga tactatatgt
139321 attcttcgat agtccttatt ccaagtccgc attatgtacc tattctatga ataccattaa
139381 acaatctttt tctacgtcaa aattggaagg atatacaaag caattgccgt ctccagctcc
139441 tggtatatgt ttaccagctg gaaaagttgt tccacatacc acgtttgaag tcatagaaaa
139501 atataatgta ctagatgata ttataaagcc tttatctaac caacctatct tcgaaggacc
139561 gtctggtgtt aaatggttcg atataaagga gaaggaaaat gaacatcggg aatatagaat
139621 atacttcata aaagaaaatt ctatatattc gttcgataca aaatctaaac aaactcgtag
139681 ctcgcaagtc gatgcgcgac tattttcagt aatggtaact tcgaaaccgt tatttatagc
139741 agatataggg ataggagtag gaatgccaca aatgaaaaaa atacttaaaa tgtaatctta
139801 atcgagtaca ccgcacgaca atgaacaaac ataagacaga ttatgctggt tatgcttgct
139861 gcgtaatatg cggtctaatt gttggaatta ttttacagc gacactatta aaagttgtag
139921 aacgtaaatt agttcataca ccatcaatag ataaaacgat aaaagatgca tatattagag
139981 aagattgtcc tactgactgg ataagctata ataataaatg tatccattta tctactgatc
140041 gaaaaacctg ggaggaagga cgtaatgcat gcaaagctct aaatccaaat tcggatctaa
140101 ttaagataga gactccaaac gagttaagtt ttttaagaag cattagacgc ggatattggg
140161 taggagaatc cgaaatatta aaccagacaa ccccatataa ttttatagct aaaaatgcca
140221 cgaagaatgg aactaaaaaa cggaaatata tttgtagtac aacgaatact cccaaactac
140281 attttatca taccactact tcggttagat gttttagaaa aaaataaata tcgccgtacc
140341 gttcttgttt ttataaaaat aacaattaac aattatcaaa tttttttctt aatattttac
140401 gtggttgacc attcttggtg gtaaaataat ctcttagtgt tggaatggaa tgctgtttaa
140461 tgtttccgca ctcatcgtat attttgacgt atgcagtcac atcgtttacg caatagtcag
140521 actgtagttc tatcatgctt cctacatcag aaggaggaac agttttaaag tctcttggtt
140581 ttaatctatt gccattagtt ttcatgaaat cctttgtttt atccacttca cattttaaat
140641 aaatgtccac tatacattct tctgttaatt ttactagatc gtcatgggtc atagaattta
140701 taggttccgt agtccatgga tccaaactag caaacttcgc gtatacggta tcgcgattag
140761 tgtatacacc aactgtatga aaattaagaa aacagtttaa taaatcaaca gaaatatttt
140821 atcctccgtt tgatacagat gcgccatatt tatggatttc ggattcacac gttgtttgtc
140881 tgaggtgttc gtctagtgtt gcttctacgt aaacttcgat tcccatatat tctttattgt
140941 cagaatcgca taccgattta tcatcataca ctgtttgaaa actaaatggt atacacatca
141001 aaataaataa taataacgag tacattctgc aatattgtta tcgtaattgg aaaaatagtg
141061 ttcgagtgag ttggattatg tgagtattgg attgtatatt ttatttttata ttttatattt
```

FIG. 22 CONT'D

```
141121 tgtagtaaga atagaatgct aatgtcaagt ttattccaat agatgtctta ttaaaaaaca
141181 tatataataa ataacaatgg ctgaatggca taaaattatc gaggatatct caaaaaataa
141241 taagttcgag gatgccgcca tcgttgatta caagactaca aagaatgttc tagctgctat
141301 tcctaacaga acatttgcca agattaatcc tctcatcact aatcgtaata ttctaaaacc
141361 tcttattggt cagaaatatt gtattgtata tactaactct ctaatggatg agaacacgta
141421 tgctatggag ttgcttactg ggtacgcccc tgtatctccg atcgttatag cgagaactca
141481 taccgcactt atatttttga tgggtaagcc aacaacatcc agacgtgacg tgtatagaac
141541 gtgtagagat cacgctaccc gtgtacgtgc aactggtaat taaaataaaa agtaatattc
141601 atatgtagtg tcaatttaa atgatgatga tgaaatggat aatatccata ttgacgatgt
141661 caataatgcc ggtattggca tacagttcat cgatttttag atttcattca gaggatgtgg
141721 aattatgtta tgggcatttg tattttgata ggatctataa tgtagtaaat ataaaatata
141781 atccgcatat tccatatagg tataatttta ttaatcgcac gttaaccgta gatgaactag
141841 acgataaatgt ctttttttaca catggttatt ttttaaaaca caaatatggt tcacttaatc
141901 ctagtttgat tgtctcatta tcaggaaact taaaatataa tgatatacaa tgctcagtaa
141961 atgtatcgtg tctcattaaa aatttggcaa cgagtacatc tactatatta acatctaaac
142021 ataagactta ttctctacat cggtccacgt gtattactat aataggatac gattctatta
142081 tatggtataa agatataaat gacatctatg attttactgc aatatgtatg ctaatagcgt
142141 ctacattgat agtgaccata tacgtgttta aaaaaataaa aatgaactct taattatgct
142201 atgctattag aaatggataa aatcaaaatt acggttgatt caaaaattgg taatgttgtt
142261 accatatcgt ataacttgga aaagataact attgatgtca cacctaaaaa gaaaaaagaa
142321 aaggatgtat tattagcgca atcagttgct gtcgaagagg caaaagatgt caaggtagaa
142381 gaaaaaaata ttatcgatat tgaagatgac gatgatatgg atgtagaaag cgcataatac
142441 gatctataaa aataagtata taaatacttt ttatttactg tactcttact gtgtagtggt
142501 gataccctac tcgattattt ttttaaaaaa aaatacttat tctgatttct ctagccattt
142561 ccgtgttcgt tcgaatgcca catcgacgtt aaagataggg gagtagttga aatctagttc
142621 tgcattgttg gtacgcacct caaatgtagt gttggatatc ttcaacgtat agttgttgag
142681 tagtgatggt tttctaaata gaattctctt catatcattc ttgcacgcgt acatttttag
142741 catccatctt ggaatcctag atccttgttc tattcccaat ggtttcatca atagaagatt
142801 aaacatatcg tacgaacacg atggagagta atcgtagcaa aagtaagcat ttcctttaat
142861 ctcagatccc ggatactgga tatattttgc agccaacacg tgcatccatg cagcatttcc
142921 tacatatacc cggctatgta ccgcgttatc atcgactgta cgatacataa tgttaccgtg
142981 ttgcttacat tgctcgtaaa agactttcat caatttgtct ccttctccgt aaattccagt
143041 gggtcttagg caacaagtat acaattttgc tccattcatg attacggaat tattggcttt
143101 cataaccagt tgctcggcca tacgtttact ttttgcgtat acatgtcctg gtgatatatc
143161 ataaagggta tgctcatggc cgatgaatgg atcaccgtgt ttattgggtc ctattgcttc
143221 catgctacta gtatagatca aatacttgat tcctaggtcc acacaagctg ccaatatagt
143281 ctgtgttcca taatagttta ctttcatgat ttcattatcg gtgtatttta caaatacatc
143341 cactagagca gctgtatgaa taatcagatt tacccatcct agcgcttctc ttaccttatc
143401 aaagtcgttt atatcacatt gtatatagtt tataacctta actttcgagg ttattggttg
143461 tggatcttct acaatatcta tgactctgat ttcttgaaca tcatctgcac taattaacag
143521 ttttactata tacctgccta gaaatccggc accaccagta accgcgtaca cggccattgc
143581 tgccactcat aatatcagac tacttattct attttactaa ataatggctg tttgtataat
143641 agaccacgat aatatcagag gagttatttа ctttgaacca gtccatggaa aagataaagt
143701 tattggatta aaatccggaa cgtatagttt gataattcat cgttacggag atattagtca
143761 aggatgtgat tccataggca gtccagaaat atttatcggt aacatctttg taaacagata
143821 tggtgtagca tatgtttatt tagatacaga tgtaaatata tctacaatta ttggaaaggc
143881 gttatctatt tcaaaaaatg atcagagatt agcgtgtgga gttattggta tttcttacat
143941 aaatgaaaag ataatacatt ttcttacaat taacgagaat ggcgttgat atatcagtta
144001 atgcgtctaa aacaataaat gcattagttt acttttctac tcagcaaaat aaattagtca
144061 tacgtaatga agttaatgat acacactaca ctgtcgaatt tgatagggac aaagtagttg
144121 acacgtttat ttcatataat agacataatg actccatага gataagaggg gtgcttccag
144181 aggaaactaa tattggttgc gcggttaata cgccggttag tatgacttac ttgtataata
144241 agtatagttt taaactgatt ttagcagaat atataagaca cagaaatact atatccggca
144301 atatttattc ggcattgatg acactagatg atttggctat taaacagtat ggagacattg
144361 atctattatt taatgagaaa cttaaagtag actccgattc gggactattt gactttgtca
144421 actttgtaaa ggatatgata tgttgtgatt ctagaatagt agtagctcta tctagtctag
144481 tatctaaaca ttgggaattg acaaataaaa aatataggtg tatggcatta gccgaacata
144541 tatctgatag tattccaata tctgagctat ctagactacg atacaatcta tgtaagtatc
144601 tacggcgggca cactgagagc atagaggatg aatttgatta ttttgaagac gatgattcgt
144661 ctacatgttc tgccgtaacc gacagggaaa cggatgtata attttttta tagcgtgaag
144721 gatatgataa aaaatataat tgttgtattt atcccattcc aatcacctta tatgattctg
144781 taacacaatg aaggagtctt atagatgtat agaggtcaga tactggtttg ataaactgtt
```

FIG. 22 CONT'D

144841 tattccacat aagtatgttt gactttatgg ttagacccgc atactttaac aaatcactga
144901 aaattggagt tagqtattga cctctcagaa tcagttgccg ttctggaaca ttaaatgtat
144961 ttttttatgat atactccaac gcatttatgt gggcatacaa csagtcatta ctaatggagt
145021 attccaagag aagagatttc aacagactgt ttatgaactc gaatgccgcc tcattgtcgc
145081 ttatattgat gatgtcgaat tctcccaata tcatcaccga tgagtagctc atcttgttat
145141 cgggatccaa gttttctaaa gatgtcatta aaccctcgat catgaatgga tttatcatca
145201 tcgttttttat gttggacatg agcttagtcc gtttgtccac atctatagac gacgatttct
145261 gaattatttc atatatccct ctctttaact ccaggaactt gtcaggatgg tctactttaa
145321 tatgttctcg tctaagagat gaaaatcttt ggatggttgc acgcgacttt tctctaaagg
145381 atcctctctt aaatgaatcc atcttatcct tggacaagat ggacagtcta ttttccttag
145441 atggtttaat atttttgttc cccatgatct ataaaggtag acctaatcgt ctcggatgac
145501 catatattta ttttcagttt tattatacgc ataaattgta aaaaatatgt taggtttaca
145561 aaaatgtctc gtggggcatt aatcgttttt gaaggattgg acaaatctgg aaaaacaaca
145621 caatgtatga acatcatgga atctataccg gcaaacacga taaaatatct taacttttct
145681 cagagatcca ctgtcactgg aaagatgata gatgactatc taactcgtaa aaaaacctat
145741 aatgatcata tagttaatct attatttgt gcaaatagat gggagtttgc atcttttata
145801 caagaacaac tagaacaggg aattacttta atagttgata gatacgcatt ctctggagta
145861 gcgtatgccg ccgctaaagg cgcgtcaatg actctcagta agagttatga atctggattg
145921 cctaaacccg acttagttat attcttggaa tctggtagca aagaaattaa tagaaacgtc
145981 ggcgaggaaa tttatgaaga tgttacattc caacaaaagg tattacaaga atataaaaaa
146041 atgattgaag aaggagatat tcattggcaa attatttctt ctgaattcga ggaagatgta
146101 aagaaggagt tgattaagaa tatagttata gaggctatac acacggttac tggacsagtg
146161 gggcaactgt ggatgtaata gtgaaattac attttttata aatggatgaa gcatattact
146221 ctggcaactt ggaatcagta ctcggatacg tgtccgatat gcataccgaa ctcgcatcaa
146281 tatctcaatt agttattgcc aagatagaaa ctatagataa tgatatatta aacaaggaca
146341 ttgtaaattt tatcatgtgt agatcaaact tggataatcc atttatctct ttcctagata
146401 ctgtatatac tattatagat caagagatct atcagaccga attgattaat tcattagacg
146461 acaatgaaat tatcgattgt atagttaaca agtttatgag cttttataag gataacctag
146521 aaaatatagt agatgctatc attactctaa aatatataat gaataatcca gattttaaaa
146581 ctacgtatgc cgaagtactc ggttccagaa tagcggatat agatattaaa caagtgatac
146641 gtgagaatat actacaattg tctaataata tccgcgaacg atatttgtga aaatattaaa
146701 aaaaaatact ttttttatta aatgacgtcg cttcgcgaat ttagaaaatt atgctgtgat
146761 atatatcacg catcaggata taaagaaaaa tctaaattaa ttagaagctt tataacagat
146821 agggatgata aatatttgat cattaagcta ttgcttcccg gattagacga tagaatttat
146881 aacatgaacg ataaacaaat tataaaatta tatagtataa tatttaaaca atctcaggaa
146941 gatatgctac aagatttagg atacggatat ataggagaca ctattaggac tttcttcaaa
147001 gagaacacag aaatccgtcc acgagataaa agcattttaa ctttagaaga agtggatagt
147061 ttttaaacta cgttatcatc cgtaactaaa gaatcgcatc aaataaaatt attgactgat
147121 atcgcatccg tttgtacatg taatgattta aaatgtgtag tcatgcttat tgataaagat
147181 ctaaaaatta aagcgggccc tcggtacgta cttaacgcta ttagtcctca tgcctatgat
147241 gtgtttagaa aatctaataa cttgaaagag ataatagaaa atgcatctaa acaaaatcta
147301 gactctatat ctatttctgt tatgactcca attaatccca tgttagcgga atcgtgtgat
147361 tctgtcaata aggcgtttaa aaaatttcca tcaggaatgt ttgcggaagt caaatacgat
147421 ggtgaaagag tacaagttca taaaaataat aacgagtttg ccttctttag tagaaacatg
147481 aaaccagtac tctttcataa agtggattat ctcaaagaat acataccgaa agcatttaaa
147541 aaagctacgt ctatcgtatt ggattctgaa attgttcttg tagacgaaca taatgtaccg
147601 ctcccgtttg gaagtttagg tatacacaaa aagaaagaat ataaaaactc taacatgtgt
147661 ttgttcgtgt ttgactgttt gtactttgat ggattcgata tgacggacat tccattgtac
147721 gaacgaagat cttttctcaa agatgttatg gttgaaatac ccaatagaat agtattctca
147781 gagttgacga atattagtaa cgagtctcag ttaactgacg tattggatga tgcactaacg
147841 agaaaattag aaggattggt cttaaaagat attaatggag tatacgaacc gggaaagaga
147901 agatggttaa aaataaagcg agactattg aacgagggtt ccatggcaga ttctgccgat
147961 ttagtagtac taggtgctta ctatggtaaa ggagcaaagg gtggtatcat ggcagtcttt
148021 ctaatgggtt gttacgacga tgaatccggt aaatggaaga cggttaccaa gtgttcagga
148081 cacgatgata atacgttaag ggagttgcaa gaccaattaa agatgattaa aattaacaag
148141 gatcccaaaa aaattccaga gtggttagta gttaataaaa tctatattcc agattttgta
148201 gtagaggatc caaaacaatc tcagatatgg gaaatttcag gagcagagtt tacatcttcc
148261 aagtcccata ccgcaaatgg aatatccatt agatttccta gatttactag gataagagag
148321 gataaaacgt ggaaagaatc tactcatcta aacgatttag taaacttgac taaatcttaa
148381 tagttacata caaattaaaa taacactatt tagttggtgg tcgccatgga tggtgttatt
148441 gtatactgtc taaacgcgtt agtaaaacat ggcgaggaaa taaatcatat aaaaaatgat
148501 ttcatgatta aaccatgttg tgaaaaagtc aagaacgttc acattggcgg acaatctaaa

FIG. 22 CONT'D

```
148561 aacaatacag tgattgcaga tttgccatat atggataatg cggtatccga tgtatgcaat
148621 tcactgtata aaaagaatgt atcaagaata tctagatttg ctaatttgat aaagatagat
148681 gacgatgaca agactcctac tggtgtatat aattatttta aacctaaaga tgccattcct
148741 gttattatat ccataggaaa ggatagagat gtttgtgaac tattaatctc atctgataaa
148801 gcgtgtgcgt gtatagagtt aaattcatat aaagtagcca ttcttcccat ggatgtttcc
148861 ttttttacca aaggaaatgc atcattgatt attctcctgt ttgatttctc tatcgatgcg
148921 gcacctctct taagaagtgt aaccgataat aatgttatta tatctagaca ccagcgtcta
148981 catgacgagc ttccgagttc caattggttc aagttttaca taagtataaa gtccgactat
149041 tgttctatat tatatatggt tgttgatgga tctgtgatgc atgcaatagc tgataatagg
149101 acttacgcaa atattagcaa aaatatatta gacaatacta caattaacga tgagtgtaga
149161 tgctgttatt ttgaaccaca gattaggatt cttgatagag atgagatgct caatggatca
149221 tcgtgtgata tgaacagaca ttgtattatg atgaatttac ctgatgtagg cgaatttgga
149281 tctagtatgt tggggaaata tgaacctgac atgattaaga ttgctctttc ggtggctggt
149341 atttggaaag ttttataggt agttgataga acaaaataca taattttgta aaaataaatc
149401 acttttata ctaatatgac acgattacca atacttttgt tactaatatc attagtatac
149461 gctacacctt ttcctcagac atctaaaaaa ataggtgatg atgcaacttt atcatgtaat
149521 cgaaataata caaatgacta cgttgttatg agtgcttggt ataaggagcc caattccatt
149581 attcttttag ctgctaaaag cgacgtcttg tattttgata attataccaa ggataaaata
149641 tcttacgact ctccatacga tgatctagtt acaactatca caatttaaatc attgactgct
149701 agagatgccg gtacttatgt atgtgcattc tttatgacat cgcctacaaa tgacactgat
149761 aaagtagatt atgaagaata ctccacagag ttgattgtaa atacagatag tgaatcgact
149821 atagacataa tactatctgg atctacacat tcaccggaaa ctagttctga gaaacctgat
149881 tatatagata attctaattg ctcgtcggta ttcgaaatcg cgactccgga accaattact
149941 gataatgtag aagatcatac agacaccgtc acatacacta gtgatagcat taatacagta
150001 agtgcatcat ctggagaatc cacaacagac gagactccgg aaccaattac tgataaagaa
150061 gaagatcata cagttacaga cactgtctca tacactacag taagtacatc atctggaatt
150121 gtcactacta aatcaaccac cgatgatgcg gatctttatg atacgtacaa tgataatgat
150181 acagtaccat caactactgt aggcgctagt acaacctcta ttagcaatta taaaaccaag
150241 gactttgtag aaatatttgg tattaccgca ttaattatat tgtcggccgt ggcaatattc
150301 tgtattacat attatatata taataaacgt tcacgtaaat acaaaacaga gaacaaagtc
150361 tagatttttg acttacataa atgtctggga tagtaaaatc tatcatattg agcgggccat
150421 ctggtttagg aaagacagcc atagccaaaa gactatggga atatatttgg atttgtggtg
150481 tcccatacca ctagatttcc tcgtcctatg gaacgagaag gtgtcgatta ccattacgtt
150541 aacagagagg ccatctggaa gggaatagcc gccggaacat actgagtttt taggaaatat
150601 ttacggaact tctaaaactg ctgtgaatac agcggctatt aataatcgta tttgtgtgat
150661 ggatctaaac atcgacggtg ttagaagttt taaaaatact tacctaatgc cttactcggt
150721 gtatataaga cctacctctc ttaaaatggt tgagaccaag cttcgttgta gaaacactga
150781 agcggatgat gagattcatc gtcgtgtgat gttggcaaaa actgacatgg atgaggcagg
150841 tgaagccggt ctattcgaca ctattatcat tgaagatgat gtgaatttag catatagtaa
150901 gttaattcag atactacagg accgtattag aatgtatttt aacactaatt agagacttaa
150961 gacttaaaac ttgataatta ataatataac tcgttttttat atgtggctat ttcaacgtct
151021 aatgtattag ttaaatatta aaacttacca cgtaaaactt aaaatttaaa atgatatttc
151081 attgacagat agatcacaca ttatgaactt tcaaggactt gtgttaactg acaattgcaa
151141 aaatcaatgg gtcgttggac cattaatagg aaaaggtgga tttggtagta tttatactac
151201 taatgaraat aattatgtag taaaaataga gcccaaagct aacggatcat tatttaccga
151261 acaggcattt tatactagag tacttaaacc atccgttatc gaagaatgga aaaaatctca
151321 caatataaag cacgtaggtc ttatcacgtg caaggcattt ggtctataca aatccattaa
151381 tgtggaatat cgattcttgg taattaatag attaggtgca gatctagatg cggtgatcag
151441 agccaataat aatagattac caaaaaggtc ggtgatgttg atcggaatcg aaatcttaaa
151501 taccatacaa tttatgcacg agcaaggata ttctcacgga gatattaaag cgagtaatat
151561 agtcttggat caaatagata agaataaatt atatctagtg gattacggat tggtttctaa
151621 attcatgtct aatggcgaac atgttccatt tataagaaat ccaaataaaa tggataacgg
151681 tactctagaa tttacaccta tagattcgca taaaggatac gttgtatcta gacgtggaga
151741 tctagaaaca cttggatatt gtatgattag atggttggga ggtatcttgc catggactaa
151801 gatatctgaa acaaagaatt gtgcattagt aagtgccaca aaacagaaat atgttaacaa
151861 tactgcgact ttgttaatga ccagtttgca atatgcacct agagaattgc tgcaatatat
151921 taccatggta aartctttga catattttga ggaaccoaat tacgacaagt ttcggcacat
151981 attaatgcag ggtgtatatt attaagtgtg gtgttggtt gatgtaaaat ttttgtcgat
152041 aaaaattaaa aaataactta atttattatt gatctcgtgt gtacaaccga aatcatggcg
152101 atgttttacg cacacgctct cggtgggtac gacgagaatc ttcatgcctt tcctggaata
152161 tcatcgactg ttgccaatga tgtcagttta taataacaag tatgacattg taaaagacaa
152221 atatatgtgg tgttacagtc aggtgaacaa gagatatatt ggagcactgc tgcctatgtt
```

FIG. 22 CONT'D

```
152281 tgagtgcaat gaatatctac aaattggaga tccgatccat gatcaagaag gaaatcacat
152341 atcgccacaa aaactactat gctctaagcg gaatcgggta cgagagtcta gacttgtgtt
152401 tggaaggagt agggattcat catcacgtac ttgaaacaga aaacgctgta tatggaaaag
152461 ttcaacatga ttattctact atcaaagaga aatgaatgca ctcagttcag
152521 gacctatcat cgattaccac gtctggatag gagattgtat ctgtcaagtt actgctgtgg
152581 acgtacatgg aaaggaaatt atgagaatga gattcaaaaa gggtgcggtg cttccgatcc
152641 caaatctggt aaangttaaa cttgggggaga atgatacaga aaatctttct tctactatat
152701 cggcggcacc atcgaggtaa ccacctatct ggaagacagt gtgaatcatg tactcatgaa
152761 acgtttggaa tctatacgcc atatgtggtc tgttgtatat gatcattttg atattgtgaa
152821 tggtaaagaa tgctgttatg tgcatacgca tttgtctaat caaaatctta tacgagtac
152881 tgtaaaaaca aatttgtact tgaagactat gggatcaaga attcaaatga gtatcttagc
152941 gaactgaagg aatcaggtgg atggagtccc agaccagaaa tgcaggaatt tgaatatcca
153001 gatggagtgg aagacactga atcaattgag agattggtag aggagttctt caatagatca
153061 gaacttcagg ctggtaaatc tatttatgtt aaacatacat ctgtttcagc taagcaacta
153121 agaacacgta tactctcatc ttttgccaac acagagggtg gatatttgtt cattggagtt
153181 gataataata cacacaaagt atttggattc acggtgggtt acgactacct cagactgata
153241 gagaatgata tagaaaaqca tatcaaaaga ctttgtgttg tgtatttctg tgagaagaaa
153301 gaggacatca agtacacgtg tcgattcatc aaggtatata aacctgggga tgaggctacc
153361 tcgacatacg tgtgcgctat caaagtggaa agatgctgtt gtgctgtgtt tgcagattgg
153421 ccagaatcat ggtatcaaga agtattctcc agatgaatag gtgtcacata taaaatttta
153481 attaatgtaa ctatagagaa caaataatag gttgtaatat catatagaca ataactaaca
153541 attaattagt aactgttatc tctttttaac tactaacta tacctattaa tacatcgtaa
153601 ttatagttct taacatctat taatcattga ttcgcttctt taatttttta taaaccaaca
153661 ttgttaattg aaaagggata acatgttaca gaatataaat tatatatgga ttttttttaa
153721 aaaggaaata cttgactgga gtgtatattt atctcttcat tatatagcac gcgtgttttc
153781 caatttttcc acatccata taatacagga ttataatctc gttcgaacat acgagaaagt
153841 ggataaaaca atagttgatt ttttatctag gttgccaaat ttattccata ttttagaata
153901 tgggggaaaat attctacata tttattctat ggatgatgct aatacgaata ttataatttt
153961 ttttctagat agagtattaa atattaataa gaacgggtca tttatacaca atctcaggtt
154021 atcatcatcc attaatataa aagaatatgt atatcaatta gttaataatg atcatccaga
154081 taataggata agactaatgc ttgaaaatgg acgtagaaca agacattttt tgtcctatat
154141 atcagataca gttaatatct atatatgtat tttatataga tgccgaagac agttacggtt
154201 gtacattatt acatagatgt atatatcact ataagaaatc agaatcagaa tcagaatcat
154261 acaatgaatt aattaagata ttgttaaata atggatcaga tgtagataaa aaagatacgt
154321 acggaaacac acctttttatc ctattatgta aacacgatat caacaacgtg gaattgtttg
154381 agatatgttt agagaatgct aatatagact ctgtagactt taatagatat acacctcttc
154441 attatgtctc atgttgtaat aaatatgatt ttgtaaagtt attaatttct aaaggagcaa
154501 atgttaatgc gcgtaataaa ttcggaacta ctccatttta ttgtggaatt atacacggta
154561 tctcgcttat aaaactatat ttggaatcag acacagagtt agaaatagat aatgaacata
154621 tagttcgtca tttaataatt tttgatgctg ttgaatcttt agattatcta ttatccagag
154681 gagttattga tattaactat cgtactattt acgacgctgt cagttataat gcgtataata
154741 cgttggtcta tctattaaac agaaatggtg attttgagac gattactact agtggatgta
154801 catgtatttc ggaagcagtc gcaaacaaca acaaaataat aatggaagta ctattgtcta
154861 aacgaccatc tttgaaaatt atgatacagt ctatgatagc aattactaaa cataaacagc
154921 ataatgcaga tttattgaaa atgtgtataa aatatactgc gtgtatgacc gattatgata
154981 ctcttataga tgtacaatca ctacacccaat ataaatggta tattttaaga tgtttcgatg
155041 aaatagatat catgaagaga tgttatataa aaaataaaac tgtattccaa ttagttttt
155101 gtatcaaaga cattaatact ttaatgagat acggtaaaca tccttctttc gtgaagtgca
155161 ctagtctcga cgtatacgga agtcgtgtac gtaatatcat agcatctatt agatatcgtc
155221 agagattaat tagtctatta tccaacgaagc tggatcctgg agataaatgg tcgtgttttc
155281 ctaacgaaat aaaatataac gataacgaac tgtccacata tctaaaaatc ttataaacac
155341 tatttaaata taaaatcaca ctacatcatt gtttcctttt agtgctcgac agtgtatact
155401 atttttaacg ctcataaata aaaatgaaaa cgatttccgt tgttacgttg ttatgcgtac
155461 tacctgctgt tgtttattca acatgtactg tacccactat gaataacgct aaattaacgt
155521 ctacogaaac atcgtttaat aataaccaga aagttacgtt tacatgtgat cagggatatc
155581 attcttcgga tccaaatgct gtctgcgaaa cagataaatg gaaatacgaa aatccatgca
155641 aaaaaatgtg cacagtttct gattacatct ctgaactata taataaaccg ctatacgaag
155701 tgaattccac catgacacta agttgcaacg gcgaaaacaaa atattttcgt tgcgaagaaa
155761 aaaatggaaa tacttcttgg aatgatactg ttacgtgtcc taatgcggaa tgtcaacctc
155821 ttcaattaga acacggatcg tgtcaacccag ttaaagaaaa atactcattt gggaatatta
155881 taactatcaa ctgtgatgtt ggatatgagg ttattggtgc ttcgtacata agttgtacag
155941 ctaattcttg gaatgttatt ccatcatgtc aacaaaaatg tgatataccg tctctatcta
```

FIG. 22 CONT'D

156001 atggattaat ttccggatct acattttcta tcggtggcgc tatacatctt agttgtaaaa
156061 gtggttttat actaacggga tctccatcat ccacatgtat cgacggtaaa tggaatccca
156121 tactcccaac atgtgtacga tctaacgaaa aatttgatcc agtggatgat ggtcccgacg
156181 atgagacaga tttgagcaaa ctctcgaaag acgttgtaca atatgaacaa gaaatagaat
156241 cgttagaagc aacttatcat ataatcatag tggcgttaac aattatgggc gtcatatttt
156301 taatctccgt tatagtatta gtttgttcct gtgacaaaaa taatgaccaa tataagttcc
156361 ataaattgct accgtgaata taaatccgtt aaaataatga ataattaata attaataatt
156421 taataacaaa caagtatcaa aagattaaag acttatagct agaatcaatt gagatgtctt
156481 cttcagtgga tgttgatatc tacgatgccg ttagagcatt tttactcagg cactattata
156541 acaagagatt tattgtgtat ggaagaagta acgccatatt acataatata tacaggctat
156601 ttacaagatg cgccgttata ccgttcgatg atatagtacg tactatgcca aatgaatcac
156661 gtgttaaaca atgggtgatg gatacactta atggtataat gatgaatgaa cgcgatgttt
156721 ctgtaagcgt tggcaccgga atactattca tggaaatgtt tttcgattac aataaaaata
156781 gtatcaacaa tcaactaatg tatgatataa ttaatagcgt atctataatt ctagctaatg
156841 agagatatag aagcgctttt aacgacgatg gtatatacat ccgtagaaat atgattaaca
156901 agttgtacgg atacgcatct ctaactacta ttggcacgat cgctggaggt gtttgttatt
156961 atctgttgat gcatctagtt agtttgtata aataattatt tcaatatact agttaaaatt
157021 ttaagatttt aaatgtataa aaaactaata acgtttttat ttgtaatagg tgcattagca
157081 tcctattcga ataatgagta cactccgttt aataaactga gtgtaaaact ctatatagat
157141 ggagtagata atatagaaaa ttcatatact gatgataata atgaattggt gttaaatttt
157201 aaagagtaca caatttctat tattacagag tcatgcgacg tcggatttga ttccatagat
157261 atagatgtta taaacgacta taaaattatt gatatgtcta ctattcaacg cagaggtcac
157321 acgtgtagaa tatctaccaa attatcatgc cattatgata agtaccctta tattcacaaa
157381 tatgatggtg atgagcgaca atattctatt actgcagagg gaaaatgcta taaaggaata
157441 aaatatgaaa taagtatgat caacgatgat actctattga gaaaacatac tcttaaaatt
157501 ggatctactt atatatttga tcgtcatgga catagtaata catattattc aaaatatgat
157561 ttttaaaaat ttaaaatata ttatcacttc agtgacagta gtcaaataac aaacaacacc
157621 atgagatata ttataattct cgcagttttg ttcattaata gtatacacgc taaaataact
157681 agttataagt ttgaatccgt caattttgat tccaaaattg aatggactgg ggatggtcta
157741 tacaatatat cccttaaaaa ttatggcatc aagacgtggc aaacaatgta tacaaatgta
157801 ocagaaggaa catacgacat atccgcattt ccaaagaatg atttcgtatc tttctgggtt
157861 aaatttgaac aaggcgatta taaagtggaa gagtattgta cgggaccacc gactgtaaca
157921 ttaactgaat acgacgacca tccgtatgct actagaggta gcaaaaaagat tcctatttac
157981 aaacgcggtg acatgtgtga tatctacttg ttgtatacgg ctaacttcac attcggagat
158041 tctaaagaac cagtaccata tgatatcgat gactacgatt gcacgtctac aggttgcagc
158101 atagactttg tcacaacaga aaaagtgtgc gtgacagcac agggagccac agaagggttt
158161 ctcgaaaaaa ttactccatg gagttcgaaa gtatgtctga cacctaaaaa gagtgtatat
158221 acatgcgcaa ttagatccaa agaagatgtt cccaatttca aggacaaaat ggccagagtt
158281 atcaagagaa aatttaacta aatttctcgg tagcacatca aatgatgtta ccacttttct
158341 tagcatgctt aacttgacta aatattcata actaattttt attaatgata caaaaacgaa
158401 ataaaactgc atattataca ctggttaacg cccttatagg ctctaaccat tttcaagatg
158461 aggtccctga ttatagtcct tctgttccac tatatcatct actccatgtc tattagacga
158521 tgtgagaaga ctgaagagga aacatgggga ttgaaaatag ggttgtgtat aattgccaaa
158581 gatttctatc ccgaaagaac tgattgcagt gttcatctcc caactgcaag tgaaggcaat
158641 ggattcaggg atatacgaaa caccgataaa ttataaaaaa agcaatgtgt accgctgttc
158701 cgttaataat actattttcg taactgggcgg attattcata aataactcta atagcacgat
158761 cgtggttaac aatatggaaa aacttgacat ttataaagac aaacaatggt cgattataga
158821 aatgcctatg gctagggtat atcacggcat cgactcgaca tttggaatgt tatattttgc
158881 cggaggtcta tccgttaccg aacaatatgg taatttagag aaaaacaacg agatatcttg
158941 ttacaatcct agaacgaata agtggtttga tatttcatat actatttata agatatccat
159001 atcatcattg tgtaaactaa ataacgtctt ctatgtattt agtaaggaca ttggatatgt
159061 ggaaaagtat gatggtctcc ccgctataaa ggcattatca acttctcctt attgattgaa
159121 aatgaaaata taaatagttt ttatgtatag cagtattacc ctatagtttt attgcttact
159181 actaacatgg atacagatac agatgttaca aatgtagaag atatcatgaa tgaaatagat
159241 agagagaaag aagaaatact aaaaaatgta gaaattgaaa ataataaaaa cattaacaag
159301 aatcatccca atgaatatat tagagaagca ctcgttatta atacaagtag taatagtgat
159361 tccattgata aagaagttat agaatgtatc agtcacgatg taggaatata gatcatatct
159421 actaattttt ataatcaata caaaacataa aaaacaactc gttattacat agcaggcatg
159481 gaatccttca agtattgttt tgataacgat ggcaagaaat ggattatcgg aaatacttta
159541 tattctggta attcaatact ctataaggtc agaaaaaatt tcactagttc gttctacaat
159601 tacgtaatga agatagatca caaatcacac aagccattgt tgtctgaaat acgattctat
159661 atatctgtat tggatccttt gactatcgac aactggacac gggaacgtgg tataaagtat

FIG. 22 CONT'D

159721 ttggctattc cagatctgta tggaattgga gaaaccgatg attatatgtt cttcgttata
159781 aagaatttgg gaagagtatt cgcccaaaag gatactgaat cagtcttcga agcatgcgtc
159841 actatgataa acacgttaga gtttatacac tctcgaggat ttacccatgg aaaaatagaa
159901 ccgaggaata tactgattag aaataaacgt ctttcactaa ttgactattc tagaactaac
159961 aaactataca agagtggaaa ctcacatata gattacaacg aggacatgat aacttcagga
160021 aatatcaatt atatgtgtgt agacaatcat cttggagcaa cagtttcaaa acgaggagat
160081 ttagaaatgt tgggatattg catgatagaa tggttcggtg gcaaacttcc atggaaaaac
160141 gaaagtagta taaaagtaat aaaacaaaaa aaagaatata aaaaatttat agctacttte
160201 tttgaggact gttttcctga aggaaatgaa cctctggaat tagttagata tatagaatta
160261 gtatacacgt tagattattc tcaaactcct aattatgaca gactacgtag actgtttata
160321 caagattgaa atattctttt tttatagagt gtggtagtgt tacggatatc taatattaat
160381 attagactat ctctatcgcg ctacacgacc aatatcgatt actatggata tcttctatga
160441 aaggagagaa tgtattcatt tctccagcgt caatctcgtc agtattgaca atactgtatt
160501 atggagctaa tggatccact gctgaacagc tatcaaaata tgtagaaaag gaggagaaca
160561 cggataaggt tagcgctcag aatatctcat tcaaatccat gaataaagta tatggacgat
160621 attctgccgt gtttaaagac tccttttttga gaaaaattgg cgataagttt caaactgttg
160681 acttcactga ttgtcgcact atagatgcaa tcaacaagtg tgtagatatc tttactgagg
160741 ggaaaatcaa tccactattg gatgaacaat tgtctcctag caattagtgc cgtatacttt
160801 aaagcaaaat ggttgacgcc attcgaaaag gaatttacca gtgattatcc ctttacgta
160861 tcaccaacgg aaatggtaga cgtaagtatg atgtctatgt acggcgagct atttaatcac
160921 gcatctgtaa aagaatcatt cggtaacttt tcaatcatag aactgccata tgttggagat
160981 actagtatga tggtcattct tccagacaag attgatggat tagaatccat agaacaaaat
161041 ctaacagata caaattttaa gaaatggtgt aactctctgg aagctacgtt tatcgatgtt
161101 cacattccca agtttaaggt aacagcctcg tataatctgg tggatactct agtaaagtca
161161 ggactgacag aggtgttcgg ttcaactgga gattatagca atatgtgtaa tttagatgtg
161221 agtgtcgacg ctatgatcca caaaacgtat atagatgtca atgaagagta tacagaagca
161281 gctgcagcaa cttgtgcact ggtgtcagac tgtgcatcaa caattacaaa tgagttctgt
161341 gtagatcatc cgttcatcta tgtgattagg catgttgatg gaaaaatttt tttcgttggt
161401 agatattgct ctccgacaac taattgttaa ccatttttt taaaaaaata gaaaaaacat
161461 gtggtattag tgcaggtcgt tatttcttcca attgcaattg gtaagatgac ggccaacttt
161521 agtacccacg tcttttcacc acagcactgt ggatgtgaca gactgaccag tattgatgac
161581 gtcaaacaat gtttgactga atatatttat tggtcgtcct atgcataccg caacaggcaa
161641 tgcgctggac aattgtattc cacactccta tcttttagag atgatgcgga attagtgttc
161701 atcgacattc gcgagctggt aaaaaatatg ccgtgggatg atgtcaaaga ttgtgtagaa
161761 atcatccgtt gttatatacc ggatgagcaa aaaaccatca tcggactttg tgcatatgct
161821 gctacttact ggggaggtga agaccatccc actagtaaca gtctgaacgc attgtttgtg
161881 atgcttgaga tgctaaatta cgtggattat aacatcatat tccggcgtat gaattgatga
161941 gttgtacatc ttgacatttt cttctttctt ctcttctccc tttcccagaa acaaacttt
162001 tttacccact ataaaataaa atgagtataa tacctgttat atttctttct atatttttt
162061 attcttcatt cgttcagact tttaacgcgc ctgaatgtat cgacaaaggg caatattttg
162121 catcattcat ggagttagaa aacgagccag taatcttacc atgtcctcaa ataaatacgc
162181 tatcatccgg atataatata ttagatattt tatgggaaaa acgaggagcg gataatgata
162241 gaattataac gatagataat ggtagcaata tgctaattct gaacccgaca caatcagact
162301 ctggtattta tatatgcatt accacgaacg aaacctactg tgacatgatg tcgttaaatt
162361 tgacaatcgt gtctgtctca gaatccaata tagatcttat ctcgtatcca caaatagtaa
162421 atgagagatc tactggcgaa atggtatgtc ccaatattaa tgcatttatt gctagtaacg
162481 taaacgcaga tattatatgg agcgggcatc gacgccttag aaataagaga cttaaacaac
162541 ggacacctgg aattattacc atagaagatg ttagaaaaaa tgatgctggt tattatacat
162601 gtgttttaga atatatatac ggtggcaaaa catataacgt aaccagaatt gtaaaattag
162661 aggtacggga taaaataata ccttctacta tgcaattacc agaaggtgtt gtaacttcaa
162721 taggtagtaa tttgactatt gcgtgtagag tatcgttgag acctcccaca acggatgcag
162781 acgtcttttg gataagtaat ggtatgtatt acgaagaaga tgatggggac ggagacggta
162841 gaataagtgt agcaaataaa atctatatga ccgataagag acgtgttatt acatcccggt
162901 taaacattaa tcctgtcaag gaagaagatg ctacaacgtt tacgtgtatg gcgtttacta
162961 ttcctagcat cagcaaaaca gttactgtta gtataacgtg aatgtagttt gttacatttc
163021 catgtcaatt gagtttataa gaatttttat acattatctt ccaacaaaca attgacgaac
163081 gtattgctat gattaactcc cacgatacta tgcatattat taatcattaa cttgcagact
163141 atacctagtg ctattttgac atactcatgt tcttgtgtaa ttgcggtatc tatattatta
163201 aagtacgtaa atctagctat agttttatta tttaatttta gataatatac cgtctcctta
163261 tttttaaaaa ttgccacatc ctttattaaa tcatgaatgg gaatttctat gtcatcgttc
163321 atatattgtg aacaacaaga gcagatatct ataggaaagg gtggaatgcg atacattgat
163381 ctatgtagtt ttaaaacaca cgcgaacttt gaagaattta tataaatcat tccatcgata

FIG. 22 CONT'D

163441 catccttcta tgttgacatg tatatatcca ggaattcttt tattaatgtc aggaaatgta
163501 taaactaaaa cattgcccga aagcggtgcc tctatctgcg ttatatccgt tcttaacttа
163561 caaaatgtaa ccaatacctt tgcatgactt gttttgttcg gcaacgttag tttaaacttg
163621 acgaatggat taattacaat agcatgatcc gcgcatctat taagtttttt tactttaacg
163681 gccttgtatg tttttacaga gactttatct aaatttctag tgcttgtatg tgttataaat
163741 ataacgggat ntagaactga atcacctacc ttagataccc aattacattt tatcagatcc
163801 agataataaa caaattttgt cgccctaact aattctatat tgttatatat tttacaattg
163861 gttatgatat catgtaataa cttggagtct aacgcgcatc gtcgtacgtt tatacaattg
163921 tgatttagtg tagtatatct acacatgtat ttttccgcac tatagtattc tggactagtg
163981 ataaaactat cgttatatct gtcttcaatg aactcatcga gatattgctc tctgtcatat
164041 tcatacacct gcataaactt tctagacatc ttacaatccg tgttatttta ggatcatatt
164101 tacatattta cgggtatatc aaagatgtta gattagttaa tgggaatcgt ctataataat
164161 gaatattaaa caattatatg aggactttta ccacaaagca tcataaaaat gagtcgtcgt
164221 ctgatttatg ttttaaatat caaccgcgaa tcaactcata aaatacaaga gaatgaaata
164281 tatacatatt ttagtcattg caatatagac catacttcta cagaacttga ttttgtagtt
164341 aaaaactatg atctaaacag acgacaacct gtaactgggt atactgcact acactgctat
164401 ttgtataata attactttac aaacgatgta ctgaagatat tattaaatca tggagtggat
164461 gtaacgatga aaaccagtag cggacgtatg cctgtttata tattgcttac tagatgttgt
164521 aatatttcac atgatgtagt gatagatatg atagacaaag ataaaaacca cttatcgcat
164581 agagactatt ccaacctact actagagtat ataaaatctc gttacatgtt attgaaggaa
164641 gaggatatcg atgagaacat agtatccact ttattagata agggaatcga tcctaacttt
164701 aaacaagacg gatatacagc gttacattat tattatttgt gtctcgcaca cgtttataaa
164761 ccaggtgagt gtagaaaacc gataacgata aaaaaggcca agcgaattat ttctttgttt
164821 atacaacatg gagctaatct aaacgcgtta gataattgtg gtaatacacc attccatttg
164881 tatcttagta ttgaaatgtg taataattatt catatgacta aaatgctgtt ggcttttaat
164941 ccgaatttca aaatatgtaa taatcatgga ttaacgccta tactatgtta tataacttcc
165001 gactacatac aacacgatat tcttgttatg ttaatacatc actatgaaac aaatgttgga
165061 gaaatgccga tagatgagcg tcgtataatc gtattcgagt ttatcaaaac atattctaca
165121 cgtccggcag attcgataac ttatttgatg aataggttta aaaatataga tatttatacc
165181 cgctatgaag gaaagacatt attacacgta gcatgtgaat ataataatac acacgtaata
165241 gattatctta tacgtatcaa cggagatata aatgcgttaa ccgacaataa caaacacgct
165301 acacaactca ttatagataa caaagaaaat tcacccatata ccattaattg tttactgtat
165361 atacttagat atattgtaga taagaatgtg ataagatcgt tggtggatca acttccatct
165421 ctaccratct tcgatataaa atcatttgag aaattcatat cctactgtat acttttagat
165481 gacacatttt acaatagaca cgttacgaat cgcaatttcta aaacgtatcg atacgcattt
165541 tcaaaataca tgtcgtttga taaatacgat ggtataataa ctaaatgtca taaagaaaca
165601 atattgctca aactatccac tgttctagac actacactat atgcagtttt aagatgccat
165661 aattcgaaaa agttaagaag atacctcaac gagttaaaaa aatataataa cgataagtcc
165721 tttaaaatat attctaatat tatgaatgag agatacctta atgtatatta taaagatatg
165781 tacgtgtcaa aggtatatga taaactattt cctgttttca cagataaaaa ttgtctacta
165841 acattactac cttcagaaat tatatacgaa atattataca tgctgacaat taacgatctt
165901 tataatatat cgtatccacc tacaaaagta tagttgtatt tttctcatgc gatgtgtgta
165961 aaaaaactga tattatataa atatttttagt gccgtataat gaagatgacg atgaaaatga
166021 tggtacatat atatttcgta tcattattgt tattgctatt ccacagttac gccatagaca
166081 tcgaaaatga aatcacagaa ttcttcaata aaatgagaga tactctacca gctaaagact
166141 ctaaatggtt gaatccagca tgtatgttcg gaggcacaat gaatgatata gccgctctag
166201 gagagccatt cagcgcaaag tgtcctccta ttgaagacag tcttttatcg cacagatata
166261 aagactatgt ggttaaatgg gagaggctag aaaaaaatag acggcgacag gtttctaata
166321 aacgtgttaa acatggtgat ttatggatag ccaactatac atctaaattc agtaaccgta
166381 ggtatttgtg taccgtaact acaaagaatg gtgactgtgt tcagggtata gttagatctc
166441 atattaaaaa acctccttca tgcattccaa aaacatatga actaggtact catgataagt
166501 atggcataga cttatactgt ggaattcttt acgcaaaaca ttataataat ataacttggt
166561 ataaagataa taaggaaatt antatcgacg atattaagta ttcacaaacg ggaaagaaat
166621 taattattca taatccagag ttagnagata gtggaagata caactgttac gttcattacg
166681 acgacgttag aatcaagatg taaaatactt acggttatac cgtcgcaaga ccacaggttt
166741 aaactaatac tagatccaaa aatcaacgta acgataggag aacntgccaa tataacatgc
166801 actgctgtgt caacgtcatt attgattgac gatgtactga ttgaatggga aaatccatcc
166861 ggatggctta taggattcga ttttgatgta tactctgttt taactagtag aggcggtatc
166921 accgaggcga ccttgtactt tgaaaatgtt actgaagaat atataggtaa tacatataaa
166981 tgtcgtggac acaactatta ttttgaaaaa acccttacaa ctacagtagt attggagtaa
167041 atacacaatg catttttata tacattactg aataattatt attattattt atatcgtatt
167101 tgtgctataa cgcgactatc taggtatttg tatctcaccg atagagaaca tataaatgta

FIG. 22 CONT'D

```
167161 gactctatta aacagttgtg taaaatatca gatcctaata gatgtggatg tacggctttg
167221 gaaatgagtt cattaaaata tgtgatatca acggaacata tttatataat tatactattg
167281 ctgttagtat aattattgat tccacggaag aactaccaac agttactcca attacaacaa
167341 catataatta tactatcgat gatagcacta ctgaagaact acaagtgact cctcatatgg
167401 atctccatcg atgatacatg tattaaaata ctttccgaat aagtctttta aatattgtat
167461 taattatgaa aaactatgct atgcgagtat gatacgatac tagattttat ctctagcgag
167521 agatgtcgtt agaatcattt atcaacgaat atcgataaca tgtgtcattt atacgttaaa
167581 gtctgtccgt cttctctatt gtttagactg tttgtagaat gctgtgatat aaacaaacta
167641 gtagacacaa atatttaact catgatgaag ttgagaatga tatgctttag ctaatataaa
167701 aatatattaa tccactatat attctagact tgatttaaaa ccgataaact actactacgt
167761 actgtataag ttaggagcag accctaatta tgtagatgat agaggtaata cttctgcatc
167821 tatatgtcca cttatgagaa aacgtcattt aataagatgc atcgtgaaaa gaaatttatt
167881 aaagagttgg taaaatatga aaccgaaagt aaataatata ggaaatacac ctctacataa
167941 ctacgtatct caatatgata tcactctcat tcctcatcca caacccatta aaaaatggaa
168001 attaaagccc tctattagca taaacggcta caggtctacc tttacaatgg cctttccttg
168061 tgcccagttc agaccctgtc attgccacgc tactaaggac tccctgaata ccgtggccga
168121 cgtcagacat tgtctgactg aatacatcct gtgggtttct catagatgga cccatagaga
168181 aagcgcaggg tctctctaca ggcttctcat ctctttcaga actgatgcaa cggagctctt
168241 tggtggtgag ttgaaggatt cacctccgtg gagatcatta aatgactcca tgaaaacgcc
168301 cgaagaactt cgtgcaatca ttggactttg tactcaatca gctatcgtct ctggaagagt
168361 cttcaacgat aagtatatcg acatactact tatgctgcga aagattctga acgagaacga
168421 ctatctcacc ctcttggatc atatccgcac tgctaaatac taaatctcct tcatgctctc
168481 tcactacact ttttatcatc ttatgaggaa taattagcac cagaatagct atggattgca
168541 catgtattct atgtcgtcta ctggatgaag atgtgacgta caaaaaaata aaactagaaa
168601 ttgaaacgtg tcacaactta tcaaaacata tagatagacg aggaaacaat gcgctacatt
168661 gttacgtctc caataaatgc gatacagaca ttaagattgt tcgactgtta ctctctcgcg
168721 gagtcgagag actttgtaga aacaacgaag gattaactcc gctaggagca tacagtaagc
168781 atagatacgt aaaatctcag attgtgcatc tactgatatc cagctattcg aattcctcta
168841 acgaactcaa gtcgaatata aatgatttcg acttacgtct gctaaaatac ctaattgtgg
168901 ataaacggat acgtccgtcc aagaatacga attatgcaat caatggtctc ggattggtgg
168961 atatatacgt aacgacgcct aatccgagac cagaagtatt gctatggctt cttaaatcag
169021 aatgttacag caccggttac gtatttcgta cctgtatgta caacagtgat atgtgtaaga
169081 actctcttca ttactaatga tcgtctcata gagaatctct atccaaggat gtaattaaat
169141 gtttgatcga taacaatgtt tccatccaat actactggtc ttgctcaacc atagatatag
169201 agattattaa taaaggatgt ggacacgtgt agagtatacg acgtcagccc tatattagag
169261 gcgtattatc taaacaagcg atttagagta accccatata atgtagacat ggaaatcgtt
169321 aatctttcta ttgagagacg tcatactctt gtcgacgtaa tgcgtagtat tacttcgtac
169381 gattccagag aatataacca ctacatcatc gataacattc taaagagatt tagacaacag
169441 gatgaatcca tcgtacaagc catactgata aactacttac attacggcga tatggtaagt
169501 atacctatca ttcaatgcat gttggataag acgacggaca acaactttgt taatаataat
169561 ctcgtcgatg taaacgtcgt aaggtttatc gtggaaaata tggacacgcg gctgtaaatc
169621 acatatctaa caatggccgt ctatgtatgt acggtctgat attatcgaga tttaataatt
169681 gcgggtatca ctgttatgaa gatgtatttg atatactaag caagtacatg gatgatatag
169741 atatgatcga taactctact atattacgcg gtcgatgtca ataatataca atttgcaaag
169801 cggttattgg aatatggagc gagtgtcacg ctcgataatc aatacggcca tccagaaaag
169861 cagttaccaa agagaagcta gttgatttat tactgagtta ccatcccact ctagagacta
169921 tgattgacgc atttaataga gatatcgct atctatatcc tgaaccatta ttcgcctgta
169981 tcagatacgc cttaatccta gatgatgatt ttccttctaa agtaagtatg atatcgccgg
170041 tcgtcataag gaactaaagc gctatagagc agacattaat agaatgaaga atgcctacat
170101 atcaggcgtc tccatgtttg atatattatt taaacgaagc aaacgccaca gattgagata
170161 cgcaaagaac aatgagagga tcgactccat taaataattt atcatggagt gataatgtcc
170221 tgtttccatg gcatattaca aaatcgattc cgtccaagat gataaaaaca tttaccggca
170281 tcataaacac ggagtttatt ttatatgtct cgcataaaca ttactaaaaa aatatattgt
170341 tcggtttttct ttcacatctt taatttatgaa aaagtaaatc attatgagat ggacgcatcg
170401 ttcgcgacag tatgtggtac atacctaacg tatttatgga cgacggtaag aatgaaggtc
170461 acgtttctgt caacaatgtc gacgcgatcg tgtaacacga ctcacaatag aatctgtgaa
170521 tgctctcccg atcatggatg caaggcatgt gtttcccaaa caaaatgtgg aataggatac
170581 ggagtatccg gagacgtcat ctgttctccg tgtggtctcg gaacatattc tcacaccgtc
170641 tcttccgcag ataaatgcga acccgtaccc agaaataccc ttaactatat cgatgtggaa
170701 attaacctgt atccagttaa cgacacatcg tgtactcgga cgaccactac cggtctcagc
170761 gaatccatct caacgtcgga actaactatt actatgaatc ataaagactg cgatcccgtc
170821 ttcttaataa ggtagcgact tcaggtttct ttacaggaga aaggtgtgca ctctgaattt
```

FIG. 22 CONT'D

```
170881 cgagattaaa tgcaataaca aagattcttc ctccaaacag ttaacgaaag caaagaatga
170941 tactatcatg ccgcattcgg agacagtaac tctagcgtcg acatctatat actatatagt
171001 aataccaata ctcaagacta cgaaactgat acaatctctt atcatgtggg taatgtagcc
171061 atatgcccgg tagttgcgat atacataaac tgatcactaa ttccaaaccc acccgctttt
171121 tatagtaagt ttttcacoca taaatacaat aattaatttc tcgtaaaagt agaaaatata
171181 ttctaattta ttgcacggta aggaagtaga atcataaaga acagtactca atcaatagca
171241 atcatgaaac aatatatcgt actggcatgc atgtgcctgc cagtcttcag caatcatcct
171301 catcgtgtac ggaagaagaa aacaaacatc atatgggaat cgatgttatt atcaaagtca
171361 caaagcaaga ccaaaacacg acogatgata agatttgcca atccgtaacg gaaattacag
171421 agtccgagtc agatccagat cccgaggtgg aatcagtcga ggatgtagat cctcctacca
171481 cttattactc catcatcggt ggaggtctga gaatgaactt tggattcacc aaatgtcctc
171541 agattaaatc catcacgaa tccgctgatg gaaagactgt gaggtgtcta tcgacatcag
171601 atgtagcgaa gaagagaaag acagcgacat caagacccat ccagtactcg ggtctaacat
171661 ctctcataag aaagtgagtt acgaagatat catcggttca acgatcgtcg atacaaaatg
171721 tgtcaagaat ctagagttta gcgttcgtat cggagacatg tgcaaggaat catctgaact
171781 tgaggtcaag tatgtcgacg gatcggcatc tgaaggtgca accgatgata cttcactcat
171841 cgattcaaca aaactcaaag cgtgtgtctg aatcgataac tctattcatc tgaaattgga
171901 tgagtagggt taatcgaacg attcaggcac accacgaatt aaaaaagtgt accggacact
171961 atattccggt ttgcaaaaca aaaagttacc tctcgcgact tcttctttct ctgtctcaat
172021 agtgtgatac gattatgaca ctattcctat ttcctttcag ggtatcacaa aaatattaaa
172081 cctctttctg atggtctcat acaaaaatat ttttattctc tttctctctt tgatggtctc
172141 ataaaaaata tttttattct ctttctctct ttgatggtct cataaaatat ttttattctc
172201 tttctctctt tgatggtctc ataaaaaata tttttattct ctttctctct ttgatggtct
172261 cataaaatat ttttattctc tttctctctt tgatggtctc ataaaaaata tttttattct
172321 ctttctctct ttgatggtct cataaaaaat attaaacctc tttctgatgg tgtcactaaa
172381 atatttttat tctctttctc tcttcaatgg agtcataaaa tatttttatt ctctttctct
172441 cttcgatggt ctcacaaaaa tattaaacct ctttctgatg gtgtcactaa aatattttta
172501 ttctctttct ctctttcaatg gagtcataaa atatttttat tctctttctc tctttgatgg
172561 tctcacaaaa atatttttat tctctttctc tctttgatgg tctcacaaaa atatttttat
172621 tctctttctc tctttgatgg tctcacaaaa atatttttat tctctttctc tctttgatgg
172681 tctcataaaa aaagttttac aaaaatattt ttattctctt tctctctttg atggtctcat
172741 aaaaaaagtt ttacaaaaat attttattc tctttctctc tttgatggtc tcataaaaaa
172801 agttttacaa aaatattttt attctctttc tctctttgat ggtctcataa aaaatattaa
172861 acctctttct gatggtgtca ctaaaatatt tttattctca ttctctcttc aatggagtca
172921 taaaatattt ttattctctt tctctcttcg atggtctcac aaaaatatta aacctctttc
172981 tgatggtgtc actaaaatat ttttattctc attctctctt caatggagtc ataaaatatt
173041 tttattctct ttctctcttc gatggtctca caaaaatatt aaacctcttt ctgatggtgt
173101 cactaaaata ttttattctc cattctctct tcaatggagt cataaaatat ttttattctc
173161 tttctctctt tgatggtctc ataaaaaaag ttttacaaaa atatttttat tctctttctc
173221 tctttgatgg tctcataaaa aatattaaac ctctttctga tggtgtcact aaaatatttt
173281 tattctcttt ctctcttcaa tggagtcata aaatatttct attctctttc tctcttcgat
173341 ggtctcacaa aaatattaaa cctctttctg atggtgtcac taaaatattt ttattctcat
173401 tctctcttca atggagtcat aaaatatttt tattctcttt ctctctttga tggtctcata
173461 aaaaaagttt tacaaaaata ttttttttct ctttctctct ttgatggtct cataaaaaaa
173521 gttttacaaa aatattttta ttctctttct ctctttgatg gtctcataaa aaaagttta
173581 caaaaatatt tttattctct ttctctcttt gatggtctca taaaaaaagt tttacaaaaa
173641 tatttttatt ctctttctct ctttgatggt ctcataaaaa atattaaacc tctttctgat
173701 ggtgtcacta aaatatttt attctcattc tctcttcaat ggagtcataa aatatttta
173761 ttctctttct ctcttcgatg gtctcacaaa aatattaaac ctctttctga tggtgtcact
173821 aaaatatttt tattctcatt ctctcttcaa tggagtcata aaatatttt attctctttc
173881 tctctttgat ggtctcataa aaaaagtttt acaaaaatat ttttattctc tttctctctt
173941 tgatggtctc ataaaaaaag ttttacaaaa atatttttat tctctttctc tctttgatgg
174001 tctcataaaa aaagttttac aaaaatattt ttattctctt tctctctttg atggtctcat
174061 aaaaaaagtt ttacaaaaat attttattc tctttctctc tttgatggtc tcacaaaaat
174121 attaaacctc tttctgatgg agtcgtaaaa aagttttatc tctttctcct tcgatggtct
174181 cacaaaaata ttaaacctct ttctgatgga gtcgtaaaaa agttttatct ctttctctct
174241 tcgatggtct cacaaaaata ttaaacctct ttctgatgga gtcgtaaaaa agttttatct
174301 ctttctctct tcgatggtct cactaaaata ttttttattc tctttctgat gcatcaacta
174361 tttcttaaac aataacgtcc aacaacatat actcgtcgag cttatcaaca tcccctatgc
174421 ccatctaggt taccagacaa ttgtatatca taaaataatg tttataattt ttacaaaaat
174481 atttttattc tctttctctc tttgatggtc tcataaaaaa agttttacaa aaatattttt
174541 attctctttc tctctttgat ggtctcataa aaaatattaa acctctttct gatggtgtca
```

FIG. 22 CONT'D

```
174601 ctaaaatatt tttattctca ttctctcttc aatggagtca taaaatattt ttattctctt
174661 tctctcttcg atggtctcac aaaaatatta aacctctttc tgatggtgtc actaaaatat
174721 ttttattctc attctctctt caatggagtc ataaaatatt tttattctct ttctctcttt
174781 gatggtctca taaaaaaagt tttacaaaaa tatttttatt ctctttctct ctttgatggt
174841 ctcataaaaa aagttttaca aaaatatttt tattctcttt ctctctttga tggtctcata
174901 aaaaaagttt tacaaaaata tttttattct ctttctctct ttgatggtct cataaaaaaa
174961 gttttacaaa aatattttta ttctctttct ctctttgatg gtctcataaa aaaagttttа
175021 caaaaatatt tttattctct ttctctcttt gatggtctca taaaaaaagt tttacaaaaa
175081 tatttttatt ctctttctct ctttgatggt ctcataaaaa aagttttaca aaaatatttt
175141 tattctcttt ctctctttga tggtctcata aaaaatatta aacctctttc tgatggtgtc
175201 actaaaatat ttttattctc tttctctctt caatggagtc ataaaatatt tttattctct
175261 ttctctcttc gatggtctca caaaaatatt aaacctcttt ctgatggtgt cactaaaata
175321 tttttattct cattctctct tcaatggagt cataaaatat ttttattctc tttctctctt
175381 tgatggtctc ataaaaaaag ttttacaaaa atatttttat tctctttctc tctttgatgg
175441 tctcataaaa aaagttttac aaaaatattt ttattctctt tctctctttg atggtctcat
175501 aaaaaaagtt ttacaaaaat atttttattc tctttctctc tttgatggtc tcataaaaaa
175561 agttttacaa aaatatttтt attctctttc tctctttgat ggtctcataa aaaaagtttt
175621 acaaaaatat ttttattctc tttctctctt tgatggtctc ataaaaaata ttaaacctct
175681 ttctgatggt gtcactaaaa tatttttatt ctctttctct cttcaatgga gtcataaaat
175741 atttttattc tctttctctc ttcgatggtc tcacaaaaat attaaacctc tttctgatgg
175801 tgtcactaaa atatttttat tctctttctc tcttcaatgg agtcataaaa tatttttatt
175861 ctctttctct ctttgatggt ctcataaaaa aagttttaca aaaatatttt tattctcttt
175921 ctctctttga tggtctcata aaaaaagttt tacaaaaata ttttttattct ctttctctct
175981 ttgatggtct cataaaaaaa gttttacaaa aatatttttа ttctctttct ctctttgatg
176041 gtctcataaa aaaagtttta caaaaatatt tttattctct ttctctcttt gatggtctca
176101 taaaaaaagt tttacaaaaa tatttttatt ctctttctct ctttgatggt ctcataaaaa
176161 aagttttaca aaaatatttt tattctcttt ctctctttga tggtctcata aaaaaagttt
176221 tacaaaaata ttttattctt ctttctctct ttgatggtct cataaaaaat attaaacctc
176281 tttctgatgg tgtcactaaa atatttttat tctcattttc tctttctctc ttcaatggag
176341 tcataaaata ttttattctt ctttctctct ttgatggtct cataaaaaat attaaacctc
176401 tttctgatgg tgtcactaaa atatttttat tctcattctc tcttcaatgg agtcataaaa
176461 aagttttatc tctttctctc ttcgatggtc tcacaaaaat attaaacctc tttctgatgg
176521 agtcgtaaaa aagttttatc tctttctctc ttcgatggtc tcacaaaaat attaaacctc
176581 tttctgatgc atcaactatt tcttaaacaa taacgtccaa caacatatac tcatccccta
176641 tgcccatcta ggttaccaga caattgtata tcataaaata atgtttataa tttacacgtt
176701 aaaatcatat aataaaacgt agatcgtata atatttttтg gtatataaat gatctagtaa
176761 aatccatgta ggggatactg ctcacatttt ttctttggta caaaatttca cacaagtttt
176821 tatacagaca aattcttgtc catatatttt aaaacattga cttttgtact aagaaaaata
176881 tctagactaa ctatctcttt ctctttctct cttcgatggt ctttctgatg gagtcgtaaa
176941 aaagttttat ctctttctct cttcgatggt ctcacaaaaa tattaaacct ctttctgatg
177001 gagtcgtaaa aaagttttat ctctttctct cttcgatggt ctcacaaaaa tattaaacct
177061 ctttctgatg gagtcgtaaa aaagttttat ctctttctcc ttcgatggtc tcacaaaaat
177121 attaaacctc tttctgatgg agtcgtaaaa aagttttatc tctttctctc ttcgatggtc
177181 tcacaaaaat attaaacctc tttctgatgg tgtcactaaa atatttttat tctctttctc
177241 tcttcgatgg tctcacaaaa atattaaacc tctttctgat ggagtcgtaa aaaagttttа
177301 tctctttctc cttcgatggt ctcacaaaaa tattaaacct ctttctgatg gagtcgtaaa
177361 aaagttttat ctctttctct cttcgatggt ctcacaaaaa tattaaacct ctttctgatg
177421 gagtcgtaaa aaagttttat ctctttctcc ttcgatggtc tcacaaaaat attaaacctc
177481 tttctgatgg agtcgtaaaa aagttttatc tctttctcct tcgatggtct cacaaaaata
177541 ttaaacctct ttctgatgga gtcgtaaaaa agttttatct ctttctcctt cgatggtctc
177601 acaaaaatat taaacctctt tctgatggag tcgtaaaaaa gttttatctc tttctctctt
177661 cgatggtctc acaaaaatat taaacctctt tctgatggag tcgtaaaaaa gttttatctc
177721 tttctctctt cgatggtctc acaaaaatat taaacctctt tctgatggag tcgtaaaaaa
177781 gttttatctc tttctcctтc gatggtctca caaaaatatt aaacctcttt ctgatggtct
177841 ctataaagcg attgattttt cttaccctct agagtttcct acggtcgttg gtcacacatt
177901 ttttctaga cactaaataa ata
```

FIG. 23

Vírus vaccinia WR, genoma completo (GenBank nº de Acesso: AY243312.1; SED ID NO:2)

```
   1 atttaaaata taatattaat gtactaaaac ttatatatta ttaatttatc taactaaagt
  61 tagtaaatta tatatataat tttatcatta atttaatttt actaatttta tttagtgtct
 121 agaaaaaaat gtgtgaccca tgactgtagg aaactctaga gtgtaagaaa gatcgatcgc
 181 tttatagaga ccatcagaaa gaggtttaat atttttgtga gaccatcgaa gagagaaaga
 241 gataaaactt ttttacgact ccatcagaaa gaggtttaat atttttgtga gaccatcgaa
 301 gagagaaaga gataaaactt ttttacgact ccatcagaaa gaggtttaat atttttgtga
 361 gaccatcgaa ggagaaagag ataaaacttt tttacgactc catcagaaag aggtttaata
 421 ttttttgtgag accatcgaag gagaaagaga taaaactttt ttacgactcc atcagaaaga
 481 ggtttaatat ttttgtgaga ccatcgaaga gagaaagaga taaaactttt ttacgactcc
 541 atcagaaaga ggtttaatat ttttgtgaga ccatcgaaga gagaaagaga taaaactttt
 601 ttacgactcc atcagaaaga ggtttaatat ttttgtgaga ccatcgaagg agaaagagat
 661 aaaacttttt tacgactcca tcagaaagag gtttaatatt tttgtgagac catcgaagag
 721 agaaagagat aaaacttttt tacgactcca tcagaaagag gtttaatatt tttgtgagac
 781 catcgaagag agaaagagat aaaacttttt tacgactcca tcagaaagag gtttaatatt
 841 tttgtgagac catcgaagag agaaagagat aaaacttttt tacgactcca tcagaaagag
 901 gtttaatatt tttgtgagac catcgaagag agaaagagat aaaacttttt tacgactcca
 961 tcagaaagag gtttaatatt tttgtgagac catcgaagag agaaagagat aaaacttttt
1021 tacgactcca tcagaaagag gtttaatatt tttgtgagac catcgaagag agaaagagaa
1081 agagatagtt gatctagata ttttttcttag tacaaaagtc aatgttttaa aatatatgga
1141 caagaatttg tctgtataaa aacttgtgtg aaattttgta ccaaagaaaa aatgtgagca
1201 gtatcccccta catggatttt actagatcat ttatatacca aaaaatatta tacgatctac
1261 gttttattat atgattttaa cgtgtaaatt ataaacatta ttttatgata tacaattgtc
1321 tggtaacctа gatgggcata ggggatgttg ataagctcga cgagtatatg ttgttggacg
1381 ttattgttta agaaatagtt gatgcatcag aaagagaata aaaaatattt tagtgagacc
1441 atcgaagaga gaaagagata aaacttttt acgactccat cagaaagagg tttaatattt
1501 ttgtgagacc atcgaagaga gaaagagata aaacttttt acgactccat cagaaagagg
1561 tttaatattt ttgtgagacc atcgaagaga gaaagagata aaacttttt acgactccat
1621 cagaaagagg tttaatattt ttgtgagacc atcgaagaga gaaagagata aaacttttt
1681 acgactccat cagaaagagg tttaatattt ttgtgagacc atcgaagaga gaaagagata
1741 aaacttttt acgactccat cagaaagagg tttaatattt ttgtgagacc atcgaagaga
1801 gaaagagata aaacttttt acgactccat cagaaagagg tttaatattt ttgtgagacc
1861 atcgaagaga gaaagagata aaacttttt acgactccat cagaaagagg tttaatattt
1921 ttgtgagacc atcgaagaga gaaagagata aaacttttt acgactccat cagaaagagg
1981 tttaatattt ttgtgagacc atcgaagaga gaaagagata aaacttttt acgactccat
2041 cagaaagagg tttaatattt ttgtgagacc atcgaagaga gaaagagata aaacttttt
2101 acgactccat cagaaagagg tttaatattt ttgtgagacc atcgaagaga gaaagagata
2161 aaacttttt acgactccat cagaaagagg tttaatattt ttgtgagacc atcgaagaga
2221 gaaagagata aaacttttt acgactccat cagaaagagg tttaatattt ttgtgagacc
2281 atcgaagaga gaaagagata aaacttttt acgactccat cagaaagagg tttaatattt
2341 ttgtgagacc atcgaagaga gaaagagata aaacttttt acgactccat cagaaagagg
2401 tttaatattt ttgtgagacc atcgaagaga gaaagagata aaacttttt acgactccat
2461 cagaaagagg tttaatattt ttgtgagacc atcgaagaga gaaagagata aaacttttt
2521 acgactccat cagaaagagg tttaatattt ttgtgagacc atcgaagaga gaaagagata
2581 aaacttttt acgactccat cagaaagagg tttaatattt ttgtgagacc atcgaagaga
2641 gaaagagata aaacttttt acgactccat cagaaagagg tttaatattt ttgtgagacc
2701 atcgaagaga gaaagagaat aaaaatattt tatgactcca ttgaagagag aaagagaaaa
2761 tgagaatgag aataaaaata ttttagtgac accatcagaa agaggtttaa tatttttgtg
2821 agaccatcga agagagaaag agaataaaaa tattttatga ctccattgaa gagagaaaga
2881 gaaaatgaga atgagaataa aaatatttta gtgacaccat cagaaagagg tttaatattt
2941 tttatgagac catcaaagag agaaagagaa taaaaatatt tttgtaaaac tttttttatg
```

FIG. 23 CONT'D

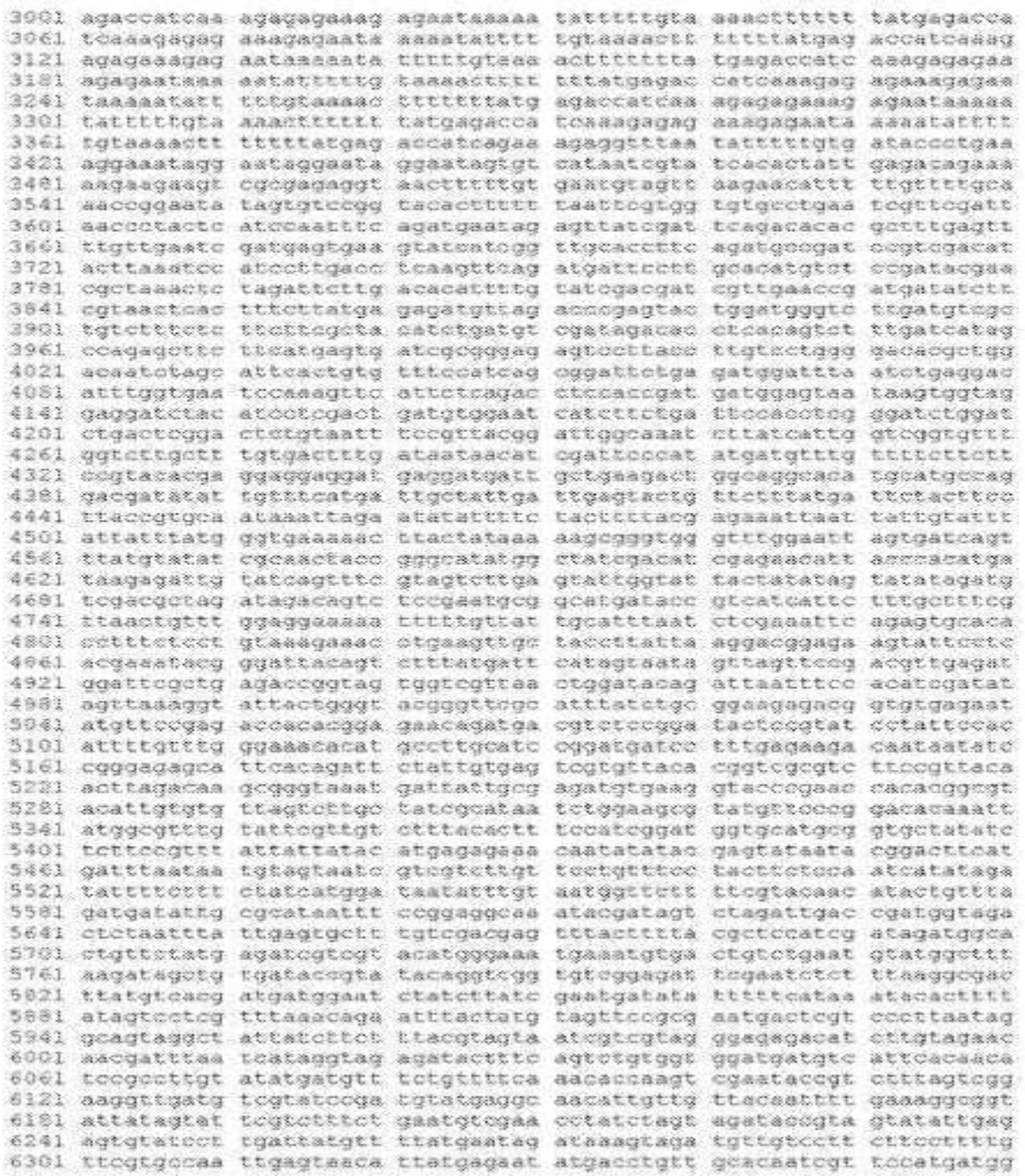

3001 agaccatcaa agagagaaag agaataaaaa tatttttgta aaacttttct tatgagacca
3061 tcaaagagag aaagagaata aaaatatttt tgtaaaactt ttttatgag accatcaaag
3121 agagaaagag aataaaaata tttttgtcaa actttttta tgagaccatc aaagagagaa
3181 agagaataaa aatatttttg taaaacttct tttatgagac catcaaagag agaaagagaa
3241 taaaaatatt tttgtaaaac tttttttatg agaccatcaa agagagaaag agaataaaaa
3301 tatttttgta aaantttttt tatgagacca tcaaagagag aaagagaata aaaatatttt
3361 tgtaaaactt ttttatgag accatcagaa agaggtttaa tatttttgtg ataccctgaa
3421 aggaaatagg aataggaata ggaatagtgt cataatcgta tcacactatt gagacagaaa
3481 aagaagaagt cgcgagaggt aacttttttgt gaatgtagtt aagaacattt ttgttttgca
3541 aaccggaata tagtgtccgg tacacttttt taattcgtgg tgtgcctgaa tcgttcgatt
3601 aaccctactc atccaatttc agatgaatag agttatcgat tcagacacac gctttgagtt
3661 ttgttgaatc gatgagtgaa gtatcatcgg ttgcaccttc agatgccgat ccgtcgacat
3721 acttaaatcc atccttgacc tcaagttcag atgattcctt gcacatgtct ccgatacgaa
3781 cgctaaactc tagattcttg acacattttg tatcgacgat cgttgaaccg atgatatctt
3841 cgtaactcac tttcttatga gagatgttag acccgagtac tggatgggtc ttgatgtcgc
3901 tgtctttctc ttcttcgcta catctgatgt cgatagacac ctcacagtct ttgatcatag
3961 ccagagcttc ttcatgagtg atcgcgggag agtccttacc ttgtcctggg gacacgctgg
4021 acaatctagc attcactgtg tttccatcag cggattctga gatggattta atctgaggac
4081 atttggtgaa tccaaagttc attctcagac ctccaccgat gatggagtaa taagtggtag
4141 gaggatctac atcctcgact gatgtggaat catctttcga ttccacctcg ggatctggat
4201 ctgactcgga ctctgtaatt tccgttacgg attggcaaat cttatcattg gtcggtgttt
4261 ggtcttgctt tgtgactttg ataataacat cgattcccat atgatgtttg tttttcttct
4321 ccgtacacga ggaggaggat gaggatgatt gctgaagact ggcaggcaca tgcatgccag
4381 gacgatatat tgtttcatga ttgctattga ttgagtactg ttcttttatga ttctacttcc
4441 ttaccgtgca ataaattaga atatattttc tacttttacg agaaattaat tattgtattt
4501 attatttatg ggtgaaaaac ttactataaa aagcgggtgg gtttggaatt agtgatcagt
4561 ttatgtatat cgcaactacc gggcatatgg ctatcgacat cgagaacatt acccacatga
4621 taagagattg tatcagtttc gtagtcttga gtattggtat tactatatag tatatagatg
4681 tcgacgctag atagacagtc tccgaatgcg gcatgatacc gtcatcattc tttgctttcg
4741 ttaactgttt ggaggaaaaa tttttgttat tgcatttaat ctcgaaattc agagtgcaca
4801 cctttctcct gtaaagaaac ctgaagttgc tacttttata aggacggaga agtattcctc
4861 acgaaatacg ggattacagt ctttatgatt catagtaata gttagttccg acgttgagat
4921 ggattcgctg agaccggtag tggtcgttaa ctggatacag attaatttcc acatcgatat
4981 agttaaaggt attactgggt acgggttcgc atttatctgc ggaagagacg gtgtgagaat
5041 atgttccgag accacacgga gaacagatga cgtctccgga tactccgtat cctattccac
5101 attttgtttg ggaaacacat gccttgcatc cggatgatcc tttgagaaga caataatatc
5161 cgggagagca ttcacagatt ctattgtgag tcgtgttaca cggtcgcgtc ttccgttaca
5221 acttagacaa gcgggtaaat gattactgcg agatgtgaag gtaccgaac cacacggcgt
5281 acattgtgtg ttagtcttgc tatcgcataa tctggaagcg tatgttccgg gacacaaatt
5341 atggcgtttg tattcgttgt ctttacactt tccatcggat ggtgcatgcg gtgctatatc
5401 tcttccgttt attattatac atgagagaaa caatatatac gagtataata cggacttcat
5461 gatttaataa tgtagtaatc gtcgtcttgt tcctgtttcc tacttcttcca atcatatagg
5521 tattttcttt ctatcatgga taatatttgt aatggttctt ttcgtacaac atactgttta
5581 gatgatattg cgcataattt ccggaggcaa atacgatagt ctagattgac cgatggtaga
5641 ctctaattta ttgagtgctt tgtcgacgag tttacttttta cgctccatcg atagatggca
5701 ctgttctatg agatcgtcgt acatggcaaa tgaaatgtga ctgtctgaat gtatggcttt
5761 aagatagctg tgataccgta tacaggtcgg tgtcggagat tcgaatctct ttaaggcgac
5821 ttatgtcacg atgatggaat ctatcttatc gaatgatata tttttcataa atacactttt
5881 atagtcctcg tttaaacaga atttactatg tagttccgcg aatgactcgt cccttaatag
5941 gcagtaggct attatcttct ttacgtagta atcgtcgtag ggaggagacat cttgtagaac
6001 aacgatttaa tcataggtag agatactttc agtctgtggt ggatgatgtc attcacaaca
6061 tccgccttgt atatgatgtt tctgttttca aacaccaagt cgaataccgt ctttagtcgg
6121 aaggttgatg tcgtatccga tgtatgaggc aacattgttg ttacaatttt gaaaggcggt
6181 attatagtat tcgtctttct gaatgtcgaa cctatctagt agataccgta gtatattgag
6241 agtgtatcct tgattatgtt ttatgaatag ataaagtaga tgttgtcctt cttcctttg
6301 ttcgtgccaa ttgagtaaca ttatgagaat atgacctgtt gcacaatcgt tccatgatgg

FIG. 23 CONT'D

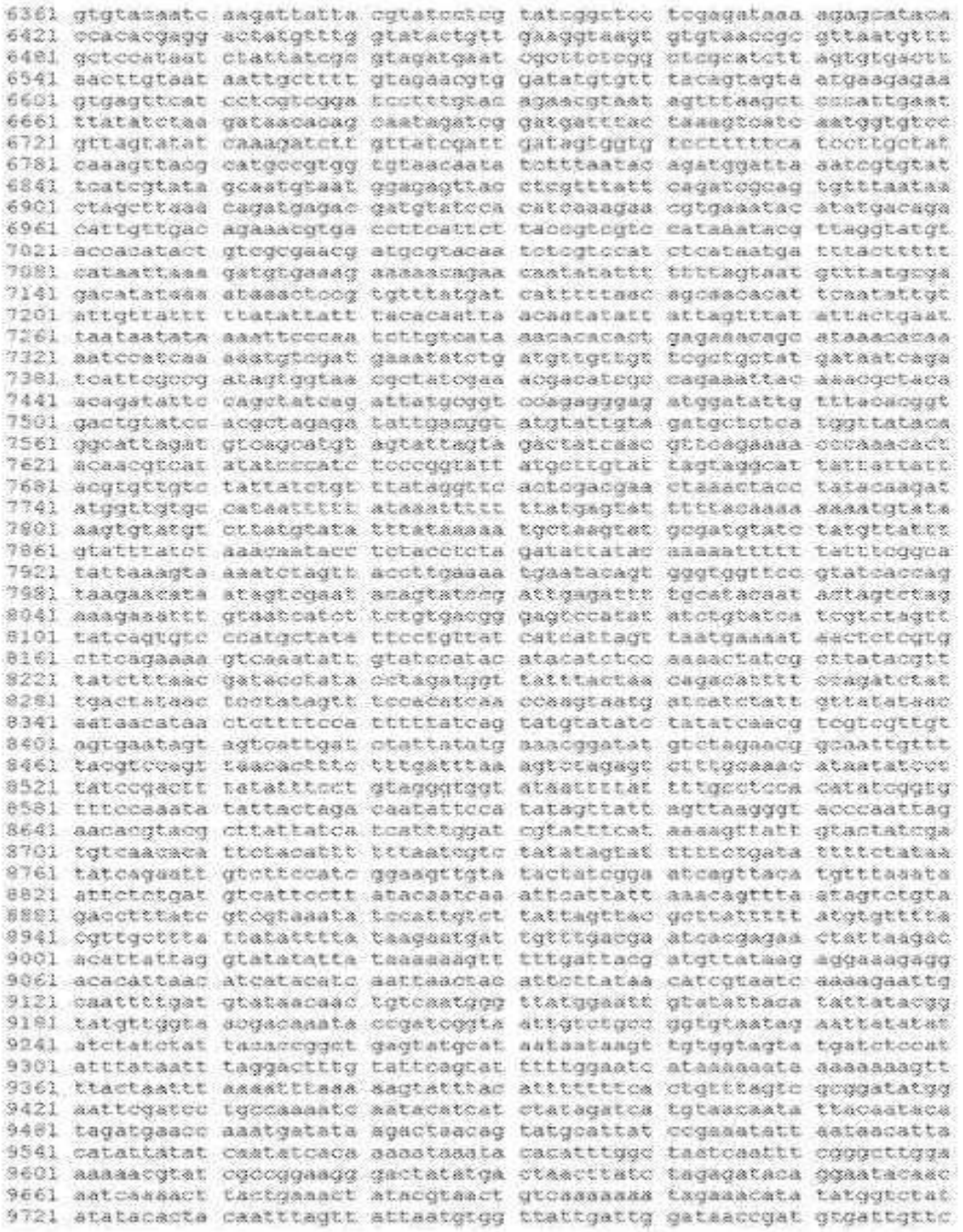

6361 gtgtacaatc aagattatta cgtatcctcg tatcggctcc tcgagataaa agagcataca
6421 ccacacgagg actatgtttg gtatactgtt gaaggtaagt gtgtaaccgc gttaatgttt
6481 gctccataat ctattatcgc gtagatgaat cgcttctcgg ctccgcatct agtgtgactt
6541 aacttgtaat aattgctttt gtagaacgtg gatatgtgtt tacagtagta atgaagagaa
6601 gtgagttcat cctcgtcgga tcctttgtac agaacgtaat agtttaagct cccattgaat
6661 ttatatctaa gataacacag caatagatcg gatgatttac taaagtcatc aatggtgtcc
6721 gttagtatat caaagatctt gttatcgatt gatagtggtg tccttttcca tccttgctat
6781 caaagttacg catgccgtgg tgtaacaata tctttaatac agatggatta aatcgtgtat
6841 tcatcgtata gcaatgtaat ggagagttac ctcgtttatt cagatcgcag tgtttaataa
6901 ctagcttaaa cagatgagac gatgtatcca catcaaagaa cgtgaaatac atatgacaga
6961 cattgttgac agaaacgtga ccttcattct tacccgtcgtc cataaatacg ttaggtatgt
7021 accacatact gtcgcgaacg atgcgtacaa tctcgtccat ctcataatga tttacttttt
7081 cataattaaa gatgtgaaag aaaaacagaa caatatattt ttttagtaat gtttatgcga
7141 gacatataaa ataaactccg tgtttatgat catttttaac agcaacacat tcaatattgt
7201 attgttattt ttatattatt tacacaatta acaatatatt attagtttat attactgaat
7261 taataatata aaattcccaa tcttgtcata aacacacact gagaaacagc ataaacacaa
7321 aatccatcaa aaatgtcgat gaaatatctg atgttgttgt tcgctgctat gataatcaga
7381 tcattcgccg atagtggtaa cgctatcgaa acgacatcgc cagaaattac aaacgctaca
7441 acagatattc cagctatcag attatgcggt ccagagggag atggatattg tttacacggt
7501 gactgtatcc acgctagaga tattgacggt atgtattgta gatgctctca tggttataca
7561 ggcattagat gtcagcatgt agtattagta gactatcaac gttcagaaaa cccaaacact
7621 acaacgtcat atatcccatc tcccggtatt atgcttgtat tagtaggcat tatttattatt
7681 acgtgttgtc tattatctgt ttataggttc actcgacgaa ctaaactacc tatacaagat
7741 atggttgtgc cataatttct ataaatttct ttatgagtat ttttacaaaa aaaatgtata
7801 aagtgtatgt cttatgtata tttataaaaa tgctaagtat gcgatgtatc tatgttattt
7861 gtatttatct aaacaatacc tctacctcta gatattatac aaaaattttt tatttcggca
7921 tattaaagta aaatctagtt accttgaaaa tgaatacagt gggtggttcc gtatcaccag
7981 taagaacata atagtcgaat acagtatccg attgagattt tgcatacaat actagtctag
8041 aaagaaattt gtaatcatct tctgtgacgg gagtccatat atctgtatca tcgtctagtt
8101 tatcagtgtc ccatgctata ttcctgttat catcattagt taatgaaaat aactctcgtg
8161 cttcagaaaa gtcaaatatt gtatccatac atacatctcc aaaactatcg cttatacgtt
8221 tatctttaac gatacctata cctagatggt tatttactaa cagacatttt ccagatctat
8281 tgactataac tcctatagtt tccacatcaa ccaagtaatg atcatctatt gttatataac
8341 aataacataa ctcttttcca tttttatcag tatgtatatc tatatcaacg tcgtcgttgt
8401 agtgaatagt agtcattgat ctattatatg aaacggatat gtctagaacg gcaattgttt
8461 tacgtccagt taacactttc tttgatttaa agtctagagt ctttgcaaac ataatatccc
8521 tatccgactt tatatttcct gtagggtggt ataattttat tttgcctcca catatcggtg
8581 tttccaaata tattactaga caatattcca tatagttatt agttaagggt acccaattag
8641 aacacgtacg cttattatca tcatttggat cgtatttcat aaaagttatt gtactatcga
8701 tgtcaacaca ttctacattt tttaatcgtc tatatagtat ttttctgata ttttctataa
8761 tatcagaatt gtctttccatc ggaagttgta tactatcgga atcagttaca tgtttaaata
8821 attctctgat gtcattcctt atacaatcaa attcattatt aaacagttta atagtctgta
8881 gacctttatc gtcgtaaata tccattgtct tattagttac gcttatttct atgtgtttta
8941 cgttgctta ttatatttta taagaatgat tgtttgacga atcacgagaa ctattaagac
9001 acattattag gtatatatta taaaaaagtt tttgattacg atgttataag aggaaagagg
9061 acacattaac atcatacatc aattaactac attcttataa catcgtaatc aaaagaattg
9121 caattttgat gtataacaac tgtcaatggg ttatggaatt gtatattaca tattatacgg
9181 tatgttggta acgacaaata ccgatcggta attgtctgcc ggtgtaatag aattatatat
9241 atctatctat tacaccggct gagtatgcat aataataagt tgtggtagta tgatctccat
9301 atttataatt taggactttg tattcagtat ttttggaatc ataaaaaata aaaaaaagtt
9361 ttactaattt aaaatttaaa aagtatttac atttttttca ctgtttagtc gcggatatgg
9421 aattcgatcc tgccaaaatc aatacatcat ctatagatca tgtaacaata ttacaatata
9481 tagatgaacc aaatgatata agactaacag tatgcattat ccgaaatatt aataacatta
9541 catattatat caatatcaca aaaataaata cacatttggc taatcaattt cgggcttgga
9601 aaaaacgtat cgccggaagg gactatatga ctaacttatc tagagataca ggaatacaac
9661 aatcaaaact tactgaaact atacgtaact gtcaaaaaaa tagaaacata tatggtctat
9721 atatacacta caatttagtt attaatgtgg ttattgattg gataaccgat gtgattgttc

FIG. 23 CONT'D


9781 aatcaatatt aagagggttg gtaaattggt acatagctaa taatacctat acacccaata
9841 atacaacaac catttctgag ttggatatca tcaaaatact ggataaatac gaggacgtgt
9901 atagagtaag taaagaaaaa gaatgtggaa tttgctatga agttgtttac tcaaaacgat
9961 agatactttg gtttattgga ttcgtgtact catatatttt gcataacatg catcaatata
10021 tggcataaaa cacgaagaga aaccggtgcg tcggataatt gtcctatatg tcgtacccgt
10081 tttagaaaca taacaatgag caagttctat aagctagtta actaataaat aaaaagttta
10141 atttgttgac gangtatgtc gttatttttc tcgtatgaaa gattaaattc aattcaattc
10201 gttgttttta atataatctg ccgtattgga tggattctca agacaattgc attttagatta
10261 tattatcatg aataaaaata gtagcacgca ctacttcagc caaatattct tttttgaaac
10321 gccatctatc gtagtgagga cacaagtgaa cctataatta tcaaaatttat tagtatcagt
10381 cacatgaagg actttctgta gagtgacgat tctaccatct atggtactaa cggtttcatc
10441 ctccttgata ccctcaccca aatgttctat aaatttagca tcctcgtccg atctcatatc
10501 ctttgccaac caatacatgt agctaaaatt aggcataaat ttcacacatc cagtgcaacg
10561 aaattctcca ggagatgtta cgatgtttag gttaggacat ttgatttcgt cggcattaac
10621 atatgggtga acacacccat acatgaaagc gatgagaaat aggattctca tcttgccaaa
10681 atatcactag aaaaaattta tttatcaatt ttaaaggtat aaaaaatact tattgttgct
10741 cgaatatttt gtatttgatg gtatacggaa gattagaaat gtaggtatta tcatcaactg
10801 attctatggt tttatgtatt ctatcatgtt tcactattgc gtcggaaata atatcatatg
10861 cttccacata tattttattt tgttttaact cataatactc acgtaattct ggattattgg
10921 catatctatg aataatttta gctccatgat cagtaaatat taatgagaac atagtattac
10981 cacctaccat tatttttttc atttcgttca attcttgatt gcaaagatct atataatcat
11041 tatagcgttg acttatggac tctggaatct tagacgatgt acagtcatct ataatcatgg
11101 catatttaat acattgtttt ategcatagt agttatctac gatgttagat atttctctca
11161 atgaatcaat cacacaatct aatgtaggtt tatgacataa tagcattttc agcagttcaa
11221 tgtttctaga ttcgttgatg gcaatggcta tacatgtata tccgttattt gatctaatgt
11281 tgacatctga acoggattct agcagtaaag atactagaga ttgtttatta tatctaacag
11341 ccttgtgaag aagtgtttct cctcgtttgt caatcatgtt aatgtcttta agataaggta
11401 ggcaaatgtt tatagtacta agaattgggc aagcataaga catgtcacaa agaccctttt
11461 tgtatgtata agtgtaaaaa ttataacatt catagttgga tttacatagg tgtccaatcg
11521 ggatctcrcc atcatcgaga taattgatgg catctccctt cctttttag tagatatttc
11581 atcgtgtaag aatcaatatt aatatttcta aagtattcgt gtatagcctc tttatttacc
11641 acagttccat attccactag agggatatcg ccgaatgtca tatactcaat tagtatatgt
11701 tggaggacat ccgagttcat tgttttcaat atcaaaaaga tggtttcctt atcatttctc
11761 catagtggta caatactaca cattattccg tgcggctttc cattttccaa aaacaatttg
11821 accaaatcta aatctacatc tttattgtat ctataatcac tatttagata atcagccata
11881 attactcgag tgcaacatgt tagatcgtct atatatgaat aagcagtgtt atctattcct
11941 ttcattaaca atttaacgat gtctatatct atatgagatg acttaatata atattgaaga
12001 gctgtacaat agttttatc tatagaagac ggcttgattc cgtgattaat tagacattta
12061 acaacttccg gacgcacata tgctctcgta tccgactttg aatacagatg agagatgata
12121 tacagatgca atacggtacc gcaatttcgt agttgataat catcatacgc gtatcagtac
12181 tcgtcctcat aaagaacact gcagccattt tctatgaaca aatcaataat tttaggaaca
12241 ggatcattgt cattacataa ttttctataa ctgaacgatg gttttcacat ttaacactca
12301 agtcaaatcc atgttctacc aacaccttta tcaagtcaac gtctacattt ttggatttca
12361 tatagctgaa tatattaaag tcatttatgt tgctaaatcc agtggcttct agtagagcca
12421 tcgctatatc ctttaacttt aacatgtcta ctatttgtgt attcttctaa tggggtagct
12481 gtctccaatt tttgcgtaat ggattagtgc cactgtctag tagtagtttg acgacctcga
12541 cattattaca atgctcatta aaaaggtatg cgtgtaaagc attattcttg aattggttcc
12601 tggtatcatt aggatcttcg tctctcaaca tctgtttaag ttcatcgaga gccacctcct
12661 catttccag atagtcaaac attttgactg aatgagctac tgtgaactct atacacccac
12721 acaactaatg tcattaaata ttatttttt gaatgtattt ataccatgtc aaaaacttgt
12781 acaattatta ataaaaataa tttagtgttt aaatttacc agttccagat tttacacctc
12841 cgttaacccc acttttaca ccactggacg atcctcctcc ccacattcca ccgccaccag
12901 atgtataagt tttagatcct ttattactac catcatgtcc atggataaag acactccaca
12961 tgccgccact actaccccct ttagaagaca tattaataag acttaaggac aagtttaaca
13021 ataaaattaa tcacgagtac cctactacca acctacacta ttatatgatt atagtttcta
13081 tttttacagt acattaacta aagtctctag tcacaagagc aatactacca acctacacta
13141 ttatatgatt atagtttcta ttttttatagg aacgcgtacg agaaaatcaa atgtctaatt

FIG. 23 CONT'D


13201 tctaacggta gtgttgataa acgattatcg tcaatggata cctcctctat catgtcgtct
13261 attttcttac tttgttctat taacttatta gcattatata ttatttgatt ataaaacttа
13321 tattgcttat tagcccaatc tgtaaatatc ggattattaa catatcgttt ctttgtaggt
13381 ttatttaaca tgtacatcac tgtaagcatg tccgtaccat ttatttaat ttgacgcata
13441 tccgcaattt ctttttcgca gtcggttata aattctatat atgatggata catgctacat
13501 gtgtacttat aatcgactaa tatgaagtac ttgatacata ttttcagtaa cgatttatta
13561 ttaccacota tgaataagta cctgtgatcg tctaggtaat caactgtttt cttaatacat
13621 tcgatggttg gtaatttact cagaataatt tccaatatct taatatataa ttctgctatt
13681 tctgggatat atttatctgc cagtataaca caaatagtaa tacatgtaaa cccatatttt
13741 gttattatat taatgtctgc gccattatct attaaccatt ctactaggct gacactatgc
13801 gacttaatac aatgataaag tatactacat ccatgtttat ctattttgtt tatatcatca
13861 atatacggct tacaaagttt tagtatcgat aacacatcca actcacgcat agagaaggta
13921 gggaataatg gcataatatt tattaggtta tcatcattgt cattatctac aactaagttt
13981 ccatttttta aaatatactc gacaacttta ggatcttcta tgccaaattt ttgaaaatat
14041 ttatttatat gcttaaatct atataatgta gctccttcat caatcataca tttaataaca
14101 ttgatgtata ctgtatgata agatacatat tctaacaata gatcttgtat agaatctgta
14161 tatcttttaa gaattgtgga tattaggata ttattacgta aactattaca caattctaaa
14221 atataaaacg tatcacggtc gaataatagt tgatcaacta tataattatc gattttgtga
14281 ttttcttcc taaactgttt acgtaaatag ttagatagaa tattcattag ttcatgacca
14341 ctatagttac tatcgaataa cgcgtcaaat atttcccgtt taatatcgca tttgtcaaga
14401 taataatага gtgtggtatg ttcacgataa gtataataac gcatctcttt tttgtgtgaa
14461 attaaatagt ttatcacgtc caaagatgta gcataaccat cttgtgacct agtaataata
14521 taataataga gaactgtttt acccattcta tcatcataat cagtggtgta gtcgtaatcg
14581 taatcgtcta attcatcatc ccaattataa tattcaccag cacgtctaat ctgttctatt
14641 ttgatcttgt atccatactg tatgttgcta catgtaggta ttcctttatc caataatagt
14701 ttaaacacat ctacattggg atttgatgtt gtagcgtatt tctctacaat attaatacca
14761 tttttgatac tatttatttc tatacctttc gaaattagta atttcaataa gtctatatcg
14821 atgttatcag aacatagata ttcgaatata tcaaaatcat tgatattttt atagtcgact
14881 gacgacaata acaaaaatcac aacatcgttt ttgatattat tatttttctt ggtaacgtat
14941 gcctttaatg gagtttcacc atcatactca tataatggat ttgcaccact ttctatcaat
15001 gattgtgcac tgctggcatc gatgttaaat gttttacaac tatcatagag tatcttatcg
15061 ttaaccatga ttggttgttg atgctatcgc atttttggt ttctttcatt tcagttatgt
15121 atggatttag cacgtttggg aagcatgagc tcatatgatt tcagtactgt agtgtcagta
15181 ctattagttt cgatcagatc aatgtctaga tctatagaat caaaacacga taggtcagaa
15241 gataatgaat atctgtacgc ttctttttgt actgtaactt ctggttttgt tagatggttg
15301 catcgtgctt taacatcaat ggtacaaatt ttatcctcgc tttgtgtatc atattcgtct
15361 ctagtataaa attctatatt cagattatca tgcgatgtgt atacgctaac ggtatcaata
15421 aacggagcac accatttagt cataacagta atccaaaatt ttttaaagta tatcttaacg
15481 aaagaagttg tgtcattgtc tacggtgtat ggtactagat cctcataagt gtatatatct
15541 agagtaatgt ttaatttatt aaatggttga taatatggat cctcatgaca atttccgaag
15601 atggaaatga gatatagaca tgcaataaat ctaatcgaag acatggttac tccttaaaaa
15661 aatacgaata atcaccttgg ctatttagta agtgtcattt aacactatac tcatattaat
15721 ccatggactc ataatctcta tacgggatta acggatgttc tatatacggg gatgagtagt
15781 tttcttcttt aactttatac tttttactaa tcatatttag actgatgtat gggtaatagt
15841 gtttaaagag ttcgttctca tcatcagaat aaatcaatat ctctgttttt ttgttataca
15901 gatgtattac agcctcatat attacgtaat agaacgtgtc atctaccttа ttaactttca
15961 ccgcatagtt gtttgcaaat acggttaatc ctttgacctc gtcgatttcc gaccaatctg
16021 ggcgtataat gaatctaaac tttaatttct tgtaatcatt cgaaataatt tttagtttgc
16081 atccgtagtt atcccctttа tgtaactgta aatttctcaa cgcgatatct ccattaataa
16141 tgatgtcgaa ttcgtgctgt ataccatac tgaatggatg aactaacgaa tatcaacggc
16201 gttaatagta atttacttтt tcatctttac atattgggta ctagttttac tatcataagt
16261 ttataaattc cacaagctac tatggaataa gccaaccatc ttagtatacc acacatgtct
16321 taaagtttat taattaatta catgttgttt tatatatatc gctacgaatt taaagagaaa
16381 tcagtttagg aagaaaaaaa ttatctatct acatcatcac gtctctgtat tctacgatag
16441 agtgctactt taagatgaga catatccgtg tcatcaaaaa tatactccat taaaatgatt
16501 attccggcag cgaacttgat attggatata tcacaacctt tgttaatatc tacgacaata
16561 gacagcagtc ccatggttcc ataaacagtg agtttatctt tctttgaagc gatagtttgt

FIG. 23 CONT'D

```
16621 agagatcttа taaaaccgtc aaacgacatc gcatttatat ctttagctaa ttcatatatg
16681 ttaccatcgt aatatctaac cgcgtctatc ttaaacgttt ccatcgcttt aaagacgttt
16741 ccgatagatg gtctcatttc atcagtcata ctgagccaac aaatataatc gtgtataaca
16801 tctttgatag aatcagactc taaagaaaac gaatcggctt tattatacgc attcatgata
16861 aacttaatga aaaatgtttt tcgttgttta agttggatga atagtatgtc ttaataattg
16921 ttattatttc attaattaat atttagtaac gagtacactc tataaaaacg agaatgacat
16981 aactagttat caaagtgtct aggacgcgta attttcatat ggtatagatc ctgtaagcat
17041 tgtctgtatt ctggagctat tttcttatc gcattagtaa gttcagaata tgttataaat
17101 ttaaatcgaa taacgaacat gacttttagta aagtcgtcta tattaactct tttatttttct
17161 agccatcgta ataccatgtt taagatagta tattcttag ttactacgat ctcatcgttg
17221 tctagaatat cacatactga atctacatcc aattttagaa attggtctgt gttacatatc
17281 tcttctatat tattgttgat gtattgtcgt agaaaactat tacgtagacc attttcttta
17341 taaaacgaat atatagtact ccaattatct ttaccgatat atttgcacac ataatccatt
17401 ctctcaatca ctacatcttt aagattttcg ttgttaagat atttggctaa actatataat
17461 tctattagat catcaacaga atcagtatat attttttctag atccaaagac gaactctttg
17521 gcgtcctcta taatattccc agaaaagata ttttcgtgtt ttagtttatc gagatctgat
17581 ctgttcatat acgccatgat tgtacggtac gttatgataa ccgcataaaa taaaaatcca
17641 ttttcatttt taacaatatc tattcataat tgagattgat gtaatacttt gttactttga
17701 acgtaaagac agtacacgga tccgtatctc caacaagcac gtagtaatca aattttggtgt
17761 tgttaaactt cgcaatattc atcatttag atagaaactt atactcatca tctgttttag
17821 gaatccatgt attattacca ctttccaact tatcattatc ccaggctatg tttcgtccat
17881 catcgttgcg cagagtgaat aattcttttg tattcggtag ttcaaatata tgatccatgc
17941 atagatcggc aaagctattg tagatgtgat ttttcctaaa tctaatataa aactcgttta
18001 ctagcaaaca ctttcctgat ttatcggcca agacacatat ggtttctaaa tctatcaagt
18061 ggtggggatc catagttatg acgcagtaac atagattatt acattcttga ctgtcgctaa
18121 tatctaaata tttattgtta tcgtattgga ttctgcatat agatggcttg tatgtcaaag
18181 atatagaaca cataaccaat ttatagtcgc gctttacatt ctcgaatcta aagttaagag
18241 atttagaaaa cattatatcc tcggatgatg ttatcactgt ttctggagta ggatatatta
18301 aagtctttac agattttcgtc cgattcaaat aaatcactaa ataatatccc acattatcat
18361 ctgttagagt agtatcatta aatctattat attttatgaa agatatatca ctgctcacct
18421 ctatatttcg tacatttttа aactgtttgt ataatatctc tctgatacaa tcagatatat
18481 ctattgtgtc ggtagacgat accgttacat ttgaattaat ggtgttccat tttacaactt
18541 ttaacaagtt gaccaattca tttctaatag tatcaaactc tccatgatta aatattttaa
18601 tagtatccat tttatatcac tacggacaca aagtagctga cataaaccat tgtataattt
18661 ttatgttttа tgtttattag cgtacacatt ttggaagttc cggcttccat gtatttcctg
18721 gagagcaagt agatgatgag gaaccagata gtttatatcc gtacttgcac ttaaagtcta
18781 cattgtcgtt gtatgagtat gatcttttaa acccgctaga caagtatccg tttgatattg
18841 taggatgtgg acatttaaca atctgacacg tgggtggatc ggaccattct cctcctgaac
18901 acaggacacc agagttacca atcaacgaat atccactatt gcaactataa gttacaacgc
18961 tcccatcggt ataaaaatcc tcgtatcogt tatgtcttcc gttggatata gatggagggg
19021 attggcattt aacagattca caaataggtg cctcgggatt ccataccata gatccagtag
19081 atcctaattc acaatacgat ttagattcac cgatcaaatg atatccgcta ttacaagagt
19141 acgttatact agagccaaag tctactccac caatatcaag ttggccatta tcgatatctc
19201 gaggcgatgg gcatctccgt ttaatacatt gattaaagag tgtccatcca gtacctgtac
19261 atttagcata tataggtccc atttttgct ttctgtatcc aggtagacat agatattcta
19321 tagtgtctcc tatgttgtaa ttagcattag catcagtctc cacactattc ttaaatttca
19381 tattaatggg tcgtgacgga atagtacagc atgatagaac gcatcctatt cccaacaatg
19441 tcaggaacgt cacgctctcc accttcatat ttatttatcc gtaaaaatgt tatcctggac
19501 atcgtacaaa taataaaaag cccatatatg ttcgctattg tagaaattgt ttttcacagt
19561 tgctcaaaaa cgatggcagt gacttatgag ttacgttaca ctttggagtc tcatctttag
19621 taaacatatc atattattcg atattacgag ttgacatatc gaacaaattc caaagtattg
19681 attttggata atattcgtat tttgcatctg ctataattaa gatataatca ccgcaagaac
19741 acacgaacat ctttcctaca tggttaaagt acatgtataa ttctatccat ttgtcttcct
19801 taactatata tttgtatagа taattacgag tctcgtgagt aattccagta attacatagа
19861 tgtcgccgtc gtactctaca gcataaacta tactatgatg tctaggcatg ggagacttct
19921 ttatccaacg attttttagtg aaacattcca catcgtttaa tactacatat ttttcatacg
19981 tggtataaac tccacccatt acatatatat catcgtttac gaataccgac gcgcctgaat
```

FIG. 23 CONT'D

```
20041 atctaggagt aattaagttt ggaagtctta tccatttcga agtgccgtgt ttcaaatatt
20101 ctgccacacc cgttgaaata gaaaattcta atcctcctat tacatataac tttccatcgt
20161 taacacaagt actaacttct gattttaacg acgacatatt agtaaccgtt ttccattttt
20221 tcgtttcaag atctacccgc gatacggaat aaacatgtct attgttaatc atgccgccaa
20281 taatgtatag acaattatgt aaaacatttg cattatagaa ttgtctatct gtattaccga
20341 ctatcgtcca atattctgtt ctaggagagt aatgggttat tgtggatata taatcagagt
20401 ttttaatgac tactatatta tgttttatac catttcgtgt cactggcttt gtagatttgg
20461 atatagttaa tcccaacaat gatatagcat tgcgcatagt attagtcata aacttgggat
20521 gtaaaatgtt gatgatatct acatcgtttg gatttttatg tatccacttt aataatatca
20581 tagctgtaac atcctcatga tttacgttaa cgttttcgtg ggataagata gttgtcagtt
20641 catcctttga taatttttcca aattctggat cggatgtcac cgcagtaata ttgttgatta
20701 tttctgacat cgacgcatta tatagttttt taattccata tcttttagaa aagttaaaca
20761 tccttatata atttgtggaa ttaatattat gaatcatagt ttttacacat agatctacta
20821 caggcggaac atcaattatt atggcagcaa ctagtatcat ttctacattg tttatggtga
20881 tgtttatctt cttccagcgt atatagtcta atagcgattc aaacgcgtga tagtttatac
20941 cattcaatat aatcgcttca tcttttagat ggtgatcctg aattcgttta aaaaaattat
21001 acggagatgc cgtaataatt tccttattca cttgtataat ttccccattg atagaaaata
21061 tcacgctttc catttttgaa gtactataag taattatagt ataatgtaaa ggtttatata
21121 ttcaatattt tttataaaaa aatcattttg acattaattc ctttttaaat ttccgtctat
21181 catctataga aacgtattct atgaatttat aaaatgcttt tacgtgtcct atcgtaggcg
21241 atagaaccgc taaaaagcct atcgaatttc tacaaaagaa tctgttatat ggtataggga
21301 gagtataaaa cattaaatgt acgtacttat taaagtattc agtagccaat cctaactctt
21361 tcgaatactt attaatggct cttgttctgt acgaatctat ttttttgaac aacggaccta
21421 gtggtatatc ttgttctatg tatcttaaaat aatgtctgac tagatccgtt agtttaatat
21481 cctcagtcat cttgtctaga atggcaaatc taactgcggg tttaggcttt agtttagttt
21541 ttatatctac atctatgtct ttatctaaca ccaaaaatat aatagctaat attttattac
21601 aatcatccgg atattcttct acgatctcac taactaatgt ttctttggtt atactagtat
21661 agtcactatc ggacaaataa agaaaatcag atgatcgatg aataatacat ttaaattcat
21721 catctgtaag atttttgaga tgtctcatta aaatattatt agggtcagta ctcattatca
21781 ttcggcagct attacttatt ttatttttct gtattttatt atttttcacc atatagatca
21841 atcattagat catcaaaata tgtttcaatc atcctaaaga gtatggtgaa tgactctcc
21901 catctaattt ctgaacgttc accaatgtct ctagccactt tggcactaat agcgatcatt
21961 cgcttagcgt cttctatatt attaactggt tgattcaatc tatctagcaa tggaccgtcg
22021 gacagcgtca ttctcatgtt cttaatcaat gtacatacat cgccgtcatc taccaattca
22081 tccaatcaaca taagcttttt aaaatcatca ttataatagg tttgatcgtt gtcatttctc
22141 caaagaatat atctaataag tagagtcctc atgcttagta atttaactat tttagttaac
22201 aactattttt tatgttaaat caattagtac acccctatgt ttaatactta ttcatatttt
22261 agtttttagg attgagaatc aatacaaaaa attaatgcat cattaatttt agaaatactt
22321 agtttccacg tagttaatga aacatttgaa ctcatcgtac aggacgttct cgtacaggac
22381 gtaactataa accggtttat atttgttcaa gatagataca aatccgataa ctttttttac
22441 gaattctccg ggatccactt taaaagtgtc ataccgggtt cttttattc ttttaaacag
22501 atcaatggtg tgatgttgat taggtctttt acgaatttga tatagaatag cgttcacata
22561 tcctccataa tggtcaatcg ccatttgttc gtatgtcata aattctttaa ttatatgaca
22621 ctgtgtatta tttagttcat ccttgttcat cattaggaat ctatccaaaa tggcaattat
22681 actagaacta taggtgcgtt gtatacacat attgatgtgt ctgtttatac aatccatgat
22741 atttggatcc atgctactac cttcgggtaa aattgtagca tcatatacca tttctagtac
22801 tttaggttca ttattatcca ttgcagagga cgtcatgatc gaatcctaaa aaaatatatt
22861 atttttatgt tattttgtta aaaataatca tcgaatactt cgtaagatac tccttcatga
22921 acataaatcag ttacaaaacg tttatatgaa gtaaagtatc tacgattttt acaaaagtcc
22981 ggatgcataa gtacaaagta cgcgataaac ggaataataa tagatttatc tagtctatct
23041 ttttctatag ctttcatagt tagatacatg gtctcagaag taggattatg taacatcagc
23101 ttcgataaaa tgactgggtt atttagtctt acacattcgc tcatacatgt atgaccgtta
23161 actacaaagt ctacactaaa atgattgaac aatagatagt ctaccattgt ttcgtattca
23221 gatagtacag cgtagtacat agcatcttca caaattatat cattgtctaa tagatatttg
23281 acgcatctta tggatcccac ttcaacagcc atcttaaaat cggtagaatc atattgcttt
23341 cctttatcat taatattttc taaaacatca tctctatcat aaaagataca aatattaact
23401 gtttgatccg taataacatt gctagtcgat agcaatttgt taataagatg cgctgggctc
```

FIG. 23 CONT'D

```
23461 aatgtcttaa taagaagtgt aagaggacta tctccgaatt tgttttgttt attaacatcc
23521 gttgatggaa gtaaaaagatc tataatgtct acattcttga ctgttttaga gcatacaata
23581 tggagaggtg tatttccatc atgatctggt tttgagggac taattcctag tttcatcatc
23641 catgagattg tagaagcttt tggattgtct gacataagat gtctatgaat atgatttttg
23701 ccaaatttat ccactatcct ggcttcgaat ccgatggaca ttatttttct aaaacactct
23761 tctgaaggat ctgtacacgc caacaacgga ccacatcctt cttcatcaac cgagttgtta
23821 atcttggctc catactgtac caataaattt attctctcta tgacttcatc atctgttccc
23881 gagagataat atagaggtgt tttattatgt ttatcacacg cgtttggatc tgcgccgtgc
23941 gtcagcagca tcgcgactat tctattatta ttaattttag aagctatatg caatggataa
24001 tttccatcat catccgtctc atttggagag tatcctctat gaagaagttc ttcgacaaat
24061 cgttcatcta gtcctttaat tccacaatac gcatgtagaa tgtgataatt atttccagaa
24121 ggttcgatag cttgtagcat attcctaaat acatctaaat ttttactatt atatttggca
24181 taaagagata gataatactc ggccgacata atgttgtcca ttgtagtata aaaattaata
24241 tttctatttc tatttctgta tatttgcaac aatttactct ctataacaaa tatcataact
24301 tagttctttt atgtcaagaa ggcactggtt tagttcatct ataaatgtca cgccataact
24361 accacgcatg ctatactcag aattatgata aagatattta tccttggggt gtaggtaatg
24421 gggattaatc tttgttggat cagtcttcaa gttaacacat gtcacacatg atccatttat
24481 agttatatca cacgatgatg atttatgaat tgattccgga agatcgctat cgtatttgtt
24541 ggttccacaa ttcatttcca tacatgttat tgtcacacta atattatgat gaactttatc
24601 tagccgctga gtggtaaaca acagaacaga tagtttatta tctttaccaa cacctcagc
24661 cgctgccaca aatctctgat ccgtatccat gatggtcatg tttatttcta gtccgtatcc
24721 agtcaacact atgttagcat ttctgtcgat atagctttca ctcatatgac actcaccaat
24781 aatagtagaa ttaatgtcgt aatttacacc aatagtgagt tcggcggcaa agtaccaata
24841 ccggtaatct tgtcgaggag gacatatagt attcttgtat tctaccgaat acccgagaga
24901 tgcgatacaa aagagtaaga ctaatttgta aaccatctta ctcaaaatat gtaacaatag
24961 tacgatgcaa tgagtaagac aataggaaat ctatcttata tacacataat tattctatca
25021 attttaccaa ttagttagtg taatgttaac aaaaatgtgg gagaatctaa ttagttttc
25081 tttacacaat tgacgtacat gagtctgagt tccttgtttt tgctaattat ttcatccaat
25141 ttattattct tgactatatc gagatctttt gtataggagt cagacttgta ttcaacatgc
25201 ttttctataa tcattttagc tattttcggca tcatccaata gtacatttcc cagattagca
25261 gaatagatat taatgtcgta tttgaacaga gcctgtaaca tctcaatgtc tttattatct
25321 atagccaatt taatgtccgg aatgaagaga agggaattat tggtgtttgt cgacgtcata
25381 tagtcgagca agagaatcat catatccacg tgtccatttt ttatagtgat gtgaatacaa
25441 ctaaggagaa tagccagatc aaaagtagat ggtatctctg aaagaaagta ggaaacaata
25501 cttacatcat taagcatgac ggcatgataa aatgaagttt tccatccagt ttttccatag
25561 aacatcagtc tccaattttt cttaacaaac agttttaccg tttgcatgtt accactatca
25621 accgcataat acaatgcggt gtttcccttg tcatcaaatt gtgaatcatc cagtccactg
25681 aatagcaaaa tctttactat tttggtatct tccaatgtgg ctgcctgatg taatggaaat
25741 tcatttctta gaagatttct caatgctcca gcgttcaaca acgtacatac tagaagcacg
25801 ttattatcag cttattgcata atacaaggca ctatgtccat ggacatccgc cttaaatgca
25861 tctttgctag agagaaagct tttcagctgc ttagacttcc aagtattaat tcgtgacaga
25921 tccatgtctg aaacgagacg ctaattagtg tatatttttt catttttttat aattttgtca
25981 tattgcacca gaattaataa tatctctaat agatctgatt agtagataca tggctatcgc
26041 aaaacaacat atacacattt aataaaaata atatttatta agaaaattca gatttcacgt
26101 acccatcaat ataaataaaa taatgattcc ttacaccgta cccatattaa ggagattcca
26161 ccttacccat aaacaatata aatccagtaa tatcatgtct gatgatgaac acaaatggtg
26221 tattaaattc cagtttttca ggagatgatc tcgccgtagc taccataata gtagatgcct
26281 ctgctacagt tcattgttcg tcgacatcta tctttgcatt ctgaaacatt ttataaatat
26341 ataatgggtc cotagtcata tgtttaaacg acgcattatc tggattaaac atactaggag
26401 ccatcatttc ggctatcgac ttaatatccc tcttatttta gatagaaaat ttagggagtt
26461 taagattgta cactttattc cctaattgaa acgaccaata gtctaatttt gcagccgtaa
26521 tagaatctgt gaaatgggtc atattatcac ctattgccag gtacatacta atattagcat
26581 ccttatacgg aaggcgtacc atatcatatt cttcgtcatc gattgtgatt gtatttcctt
26641 gcaatttagt aactacgttc atcatgggaa ccgttttcgt accgtactta ttagtaaaaac
26701 tagcattgcg tgttttagtg atatcaaacg gatattgcca tatacctta aaatatatag
26761 tattaatgat tgcccataga gtattattgt cgagcatatt agaatctact acattagaca
26821 taccggatct acgttctact atagaattaa ttttattaac cgcatctcgt ctaaagttta
```

FIG. 23 CONT'D

```
26881 atctatatag gccgaatcta tgatattgtt gataatacga cggtttaatg cacacagtat
26941 tatctacgaa actttgataa gttagatcag tgtacgtata tttagatgtt ttcagcttag
27001 ctaatcctga tattaattct gtaaatgctg gacccagatc tctttttctc aaatccatag
27061 tcttcaataa ttctattcta gtattacctg atgcaggcaa tagcgacata aacatagaaa
27121 acgaataacc aaacggtgag aagacaatat tatcatcttg aatattttta tacgctacta
27181 taccggcatt ggtaaatcct tgcagacgat aggtagacac tgaacacgtt aacgatagta
27241 tcaataacgc aatcatgatt ttatggtatt aataattaac cttattttta tgttcggtat
27301 aaaaattatt gatgtctaca catccttttg taattgacat ctatatatcc ttttgtataa
27361 tcaactctaa tcactttaac ttttacagtt ttccctacca gtttatccct atattcaaca
27421 tatctatcca tatgcatctt aacactctct gccaagatag cttcaaagtg aggatagtca
27481 aaaagataaa tatatagagc ataatccttc tcgtatactc tgccctttat tacatcaccc
27541 gcattgggca acgaataaca aaatgcaagc atcttgttaa cgggctcgta aattgggata
27601 aaaattatgt ttttatatct attttattca agagaatatt caggaatttc tttttccggt
27661 tgtatctcat cgcagtatat atcatttgta cattgtttca tatttttaa tagtctacac
27721 cttttagtag gactagtatc gtacaattca tagctgtatt ttgaattcca atcacgcata
27781 aaaatatctt ccaattgttg acgaagacct aatccatcat ccggtgtaat attaatagat
27841 gctccacatg tatccgtaaa gtaatttcct gtccaatttg aggtacctat atacgccgtt
27901 ttatcggtta ccatatattt ggcatggttt accctagaat acggaatggg aggatcagca
27961 tctggtacaa taaatagctt tacttctata tttatgtttt tagattttag catagcgata
28021 gatcttaaaa agtttctcat gataaacgaa gatcgttgcc agcaactaat caatagctta
28081 actgacactt gtctgtctat agcggctctt cttaattcat cttctatata aggccaaaac
28141 aaaatattgc ctgccttcga ataaataata gggataaagt tcataacaga tacataaacg
28201 aatttactcg catttctgat acatgacaat aaagcggtta aatcattggt tctttccata
28261 gtacatagtt gttgcggtgc agaagcaata aatacagagt gtggaacgcc gcttacgtta
28321 atactaagag gatgatctgt attataatac gacggataaa agttttttcca attatatggt
28381 agattgttaa ctccaagata ccagtatacc tcaaaaattt gagtgagatc cgctgccaag
28441 ttcctattat tgaagatcgc aatacccaat tctttgacct gagttagtga tctccaatcc
28501 atgttagcgc ttcctaaata aatatgtgta ttatcagata tccaaaattt tgtatgaaga
28561 actcctccta ggatatttgt aatatctatg tatcgtactt ccactccggc catttgtagt
28621 ctttcaacat cctttaatgg tttgtttgat ttattgacgg ctactctaac tcgtactcct
28681 cttttgggta attgtacaat cttgtttaat attatcgtgc cgaaattcgt acccacttca
28741 tccgataaac tccaataaaa agatgatata tctagtgttt ttgtggtatt ggatagaatt
28801 tccctccaca tgttaaatgt agacaaatat actttatcaa attgcatacc tatagggaata
28861 gtctctgtaa tcactgcgat tgtattatcc ggattcattt tatttgttaa aagaataatc
28921 ctatatcact tcactctatt aaaaatccaa gtttctattt ctttcatgac tgatttttta
28981 acttcatccg tttccttatg aagatgatgt ttggcacctt cataaatttt tatttctcta
29041 ttacaatttg catgttgcat gaaataatat gcacctaaaa catcgctaat cttattgttt
29101 gttcccctgga gtatgagagt cgggggggtgt taatcttgga aattatttct ctaaccttgt
29161 tggtagcctt caagacctga ctagcaaatc cagccttaat ttttcatga ttgattaatg
29221 ggtcgtattg gtatttataa actttatcca tatctctaga tactgattct ggacataget
29281 ttccgactgg cgcatttagt gtgatggttc ccataagttt ggcagctagc agattcagtt
29341 ttgaaacagc atctgcatta actagaggag acattagaat cattgctgta aacaagtttg
29401 gattatcgta agaggctagc tcccatggaa tgacccaata agtagattta atagttacca
29461 cgtgctgtac caaagtcatc aatcatcatt ttttcaccat tacttcttcc atgtccaata
29521 tgatcatgtg agaatactaa aattcctaac gatgatatgt tttcagctag ttcgtcataa
29581 cgtccagaat gtttaccagc tccatgactt atgaatacta atgccttagg atatgtaata
29641 ggtttccaat atatgtaatc attgtccaga ttgaacatac agtttgcact catgattcac
29701 gttatataac tatcaatatt aacagttcgt ttgatgatca tattatttt atgttttatt
29761 gataattgta aaaacataca attaaatcaa tatagaggaa ggagacggct actgtctttt
29821 gtgagatagt catggcgact aaattagatt atgaggatgc tgttttttac tttgtggatg
29881 atgataaaat atgtagtcgc gactccatca tcgatctaat agatgaatat attacgtgga
29941 gaaatcatgt tatagtgttt aacaaagata ttaccagttg tggaagactg tacaaggaat
30001 tgatgaagtt cgatgatgtc gctatacggt actatggtat tgataaaatt aatgagattg
30061 tcgaagctat gagcgaagga gaccactaca tcaatttttac aaaagtccat gatcaggaaa
30121 gtttattcgc taccatagga atatgtgcta aaatcactga acattgggga tacaaaaaga
30181 tttcagaatc tagattccaa tcattgggaa acattacaga tctgatgacc gacgataata
30241 taaacatctt gatacttttt ctagaaaaaa aattgaattg atgatatagg ggtcttcata
```

FIG. 23 CONT'D

30301 acgcataatt attacgttag cattctatat ccgtgttaaa aaaaatttatc ctatcatgta
30361 tttgagagtt ttatatgtag caaacatgat agctgtgatg ccaataagct ttagatattc
30421 acgcgtgcta gtgttaggga tggtattatc tggtggtgaa atgtccgtta tataatctac
30481 aaaataatca tcgcatatag tatgcgatag tagagtaaac atttttatcg tttctactgg
30541 gttcatacat cgtctaccca attcggttat aaatgaaatt gtcgccaatc ttacacccaa
30601 ccccttgtta tccattagta tagtattaac ttcgttattt atgtcataaa ctgtaaatga
30661 ttttgtagat gccatatcat acatgatatt catgtcccta ttataatcat tactaacttt
30721 atcacaatat atgttgataa tatctatata tgatctagtc tttgtgggca actgtctata
30781 caagtcgtct aaacgttgtt tactcatata gtatcgaaca gccatcatta catggtcccg
30841 ttccgttgat agataatcga gtatgttagt ggacttgtca aatctatata ccatatttte
30901 tggaagtgga tatacatagt cgtgatcaac attattgcta gcctcatctt ctatatcctg
30961 tactatacca ttatctatat catctacata atctacgata ttattacaca taaacatcga
31021 caacatacta ttgtttatta tctaagtcct gttgatccaa acccttgatc tcctctattt
31081 gtactatcta gagattgtac ttcttccagt tctggataat atatacgttg atagattagc
31141 tgagctattc tatctccagt atttacatta aacgtacatt ttccattatt aataagaatg
31201 actcctatgt ttccccctata atcttcgtct attacaccgc ctcctatatc aatgcctttt
31261 agggacagac cagacctagg agctattcta ccatagcaga acttaggcat ggacatacta
31321 atatctgtct taattaactg tcgttctcct ggagggatag tataatcgta agcgctatat
31381 aaatcatatc cggcggcgta aggtgattgc ctagtaggag atttagctct gttagtttcc
31441 ttaacaaatc taactggtga gttaatattc atgttgaaca taaaactaat attttatttc
31501 aaaattattt accatcccat atattccatg aataagtgtg atgattgtac acttctatag
31561 tatctatata cgattcacga taaaatcctc ctatcaatag cagtttatta tccactatga
31621 tcaattctgg attatccctc ggataaatag gatcatctat cagagtccat gtattgctgg
31681 attcacaata aaattccgca tttctaccaa ccaagaataa ccttctaccg aacactaacg
31741 cgcatgattt ataatgagga taataagtgg atggtccaaa ctgccactga tcatgattgg
31801 gtagcaaata ttctgtagtt gtatcagttt cagaatgtcc tcccattacg tatataacat
31861 tgtttatgga tgccactgct ggattacatc taggtttcag aagactcggc atattaaccc
31921 aagcagcatc cccgtggaac caacgctaaa cagatgtggg atttggtaga cctactacta
31981 cgtataattt attgttagcg ggtatcccgc tagcatacag tctggggcta ttcatcggag
32041 gaattggaat ccaattgttt gatatataat ttaccgctat agcattgtta tgtatttcat
32101 tgttcatcca tccaccgatg agatatacta cttctccaac atgagtactt gtacacatat
32161 ggaatatatc tataatttga tccatgttca taggatactc tatgaatgga tacttgtatg
32221 atttgcgtgg ttgtttatca caatgaaata ttttggtaca gtctagtatc catttacat
32281 tatttatacc tctgggagaa agataatttg acctgattac atttttgata aggagtagca
32341 gatttcctaa tttatttctt cgctttatat accacttaat gacaaaatca actacataat
32401 cctcatctgg aacatttagt tcatcgcttt ctagaataag tttcatagat agataatcaa
32461 aattgtctat gatgtcatct tccagttcca aaaagtgttt ggcaataaag tttttagtat
32521 gacataagag attggatagt ccgtattcta tacccatcat gtaacactcg acacaatatt
32581 cctttctaaa atctcgtaag ataaagttta tacaagtgta gatgataaat tctacagagg
32641 ttaatatata agcacgtaat aaattgacga cgttatgact atctatatat acctttccag
32701 tatacgagta aataactata gaagttaaac tgtgaatgtc aaggtctaga caaaccctig
32761 taactggatc tttatttttc gtgtatttit gacgtaaatg tgtgcgaaag taaggagata
32821 actttttcaa tatcgtagaa ttgactatta tattgccacc tatagcatca ataattgttt
32881 tgaatttctt agtcatagac aatgctaata tattcttaca gtacacagta ttaacaaata
32941 tcggcattta tgtttctttа aaagtcaaca tctaaagaaa aatgattatc ttcttgagac
33001 ataactccca ttttttggta ttcacccaca cgtttttcga aaaaattagt ttttccttcc
33061 aatgatatat tttccatgaa atcaaacgga ttggtaacat tataaatttt tttaaatccc
33121 aattcagaaa tcaatctatc cgcgacgaat tctatatatg ttttcatcat ttcacaattc
33181 attcctataa gtttaactgg aagagccgca gtaagaaatt cttgttcaat ggataccgca
33241 tctgttataa tagatctaac ggtttcttca ctcggtggat gcaataaatg tttaaacatc
33301 aaacatgcga aatcgcagtg cagaccctcg tctctactaa ttagttcgtt ggaaaacgtg
33361 agtccgggca ttaggccacg cttttaagc caaaatatgg aagcgaatga tccagaaaag
33421 aagattcctt ctactgcagc aaaggcaata agtctctctc cataaccggc gctgtcatgt
33481 atccactttt gagcccaatc ggccttcttt tttacacaag gcatcgtttc tatggcatta
33541 aagagatagt ttttttcatt actatctttа acataagtat cgatcaaaag actatacatt
33601 tccgaatgaa tgttttcaat ggccatctga aatccgtaga aacatctagc ctcggtaatc
33661 tgtacttctg tacaaaatcg ttccgccaaa ttttcattca ctattccgtc actggctgca

FIG. 23 CONT'D

```
33721 aaaaacgcca atacatgttt tataaaatat ttttcgtctg gtgttagttt attccaatca
33781 ttgatatctt tagatatatc tacttcttcc actgtccaaa atgatgcctc tgccttttta
33841 tacatgttcc agatgtcata atattggatt gggaaaataa caaatctatt tggatttggt
33901 gcaaggatgg gttccataac taaattaaca ataacaataa atttttttcc agttatctat
33961 atgcctgtac ttggatcttt tgtacatcga tatcgccgca atcactacaa taattacaag
34021 tattattgat agcattgtta ttagtactat cataattaaa ttatcgacat tcatgggtgc
34081 tgaataatcg ttattatcat cattatcatt ttgtaattgt gacatcatac tagataaatc
34141 gtttgcgaga ttgttgtggg aagcgggcat ggaggatgaa ttatcgttat tattatttaa
34201 cgcctcccat tcggattcac aaatgttacg cacattcaac attttatgga aactataatt
34261 ttgtgaaaac agataacaag aaaactcgtc atcgttcaaa tttttaacga tagtaaaccg
34321 attaaacgtc gagctaattt ctaacgctag cgactctgtt ggatatgggt ttccagatat
34381 atatcttttc agttccccta cgtatctata atcatctgta ggaaatggaa gatatttcca
34441 tttatctact gttcctaata tcatatgtgg tgttgtagta gaaccattaa gcgcgaaaga
34501 tgttatttcg catcgtattt taacttcgca ataatttctg gttagataac gcactctacc
34561 agtcaagtca atgatattag cctttacaga tatattcata gtagttgtaa cgatgactcc
34621 atcttttaga tgcgatactc ctttgtatgt accagaatct tcgtaccgca aactcgatat
34681 atttaaaacaa gttaatgaga tattaacgcg ttttatgaat gatgatatat aacccagaagt
34741 tttatcctcg gtggttagcg ctataacctt atcattataa taccaactag tgtgattaat
34801 atgtgaccag ttagtgtggg tacaaatatg tacattatcg tctacgtcgt attcgataca
34861 tccgcatacg gccaacaaat ataaaatgac aaatactcta acgccgttcg taccatcttt
34921 gatgcggttt aataaatgtt ttgatttcaa tttattgtaa aaaaagattc ggttttatac
34981 tgttcgatat tctcattgct tatattttca tctatcatct ccacacagtc aaatccgtgg
35041 ttagcatgca cctcatcaac cggtaaaaga ctatcggact cttctatcat tataactcta
35101 gaatatttaa tttggtcatt attaatcaag tcaattatct tatttttaac aaacgtgagt
35161 attttacrca ttttttataa aaactttag aaatatacag actctatcgt gtgtctatat
35221 cttcttttta tatccaatgt atttatgtct gatttttctt catttatcat atataatggt
35281 ccaaattcta cacgtgcttc ggattcatcc agatcattaa ggttcttata attgtaacat
35341 crttctcttc cctcttctac atcttcrttc ttattcttat tcttagcgtc acagaatcta
35401 ccacagcagg atcccatgac gagcgtcata ttaaactaat ccattttcaa ttataatata
35461 cgattagtaa tgaccattaa aataaaaaat attcttcata accggcaaga aagtgaaaag
35521 ttcacattga aactatgtca gtagtataca tcatgaaatg atgatatata tatactctat
35581 tttggtggag gattatatga tataattcgt ggataatcat tcttaagaca catttcttca
35641 ttcgtaaatc ttttcacgtt aaatgagtgt ccatattttg caatttcttc atatgatggc
35701 ggtgtacgtg gacgaagctg ctcctgttct tgttgtagtc gccgactgtc gtgtttgcgt
35761 ttagatcccc ccattatcgc gattgcgtag atggagtact attatatacc ttgtaattaa
35821 atttttttat taattaaacg tataaaaacg ttccgtatct gtatttaaga gccagatttc
35881 gtctaataga acaaatagct acagtaaaaa taactagaat aattgctaca cccactagaa
35941 accacggatc gtaatacggc aatcggtttt cgataatagg tggaacgtat attttattta
36001 aggacttaac aattgtctgt aaaccacaat ttgcttccgc ggatcctgta ttaactatct
36061 gtaaaagcat atgttgacog ggcggagccg aacattctcc gatatctaat ttctgtatat
36121 ctatantatt attaacctcc gcatacgcat tacagttctt ttctagcttg gataccgcac
36181 taggtacatc gtctagatct attcctattt cttcagcgat agctcttcta tccttttccg
36241 gaagcaatga aatcacttca atAaatgatt caaccatgay tgtgaaacta agtcgagaat
36301 tactcatgca tttgttagtt attcggagcg cgcaatttct aaactgtcct ataacctctc
36361 ctatatgaat agcacaagtg acattagtag ggatagaatg ttgagctaat ttttgtaaat
36421 aactatctat aaaaagatta tacaaagttt taaactcttt agtttccgcc atttatccag
36481 tctgagaaaa tgtctctcat aatanattit tccaagaaac taattgggtg aagaatggaa
36541 accttaatc tatatttatc acagtctgtt ttggtacaca tgatgaattc ttctaatgct
36601 gtactaaatt cgatatcttt ttcgatttct ggatatgttt ttaataaagt atgaacaaag
36661 aaatggaaat cgtaatacca gttatgttca actttgaaat tgttttttat tttcttgtta
36721 atgattccag ccacttggga aaagtcaaag tcgtttaatg ccgatttaat acgttcatta
36781 aaaacaaact ttttatcctt tagatgaatt attattggtt cattggaatc aaaaagtaag
36841 atattatcgg gtttaagatc tgcgtgtaaa aagttgtcgc aacagggtag ttcgtagatt
36901 ttaatgtata acagagccat ctgtaaaaag ataaactttA tgtattgtac caaagattta
36961 aatcctaatt tgatagctaa ctcggtatct actttatctg ccgaatacag tgctagggga
37021 aaaattataa tatttcctct ttcgtattcg tagttagttc tttttcatg ttcgaaaaag
37081 tgaaacatgc ggttaaaata gtttataaca ttaatattac tgttaataac tgccggataa
```

FIG. 23 CONT'D

```
37141 aagtgggata gtaatttcac gaatttgata ctgtcctttc tctcgttaaa cgcgttttaaa
37201 aaaactttag aagaatatct caatgagagt tcctgaccat ccatagtttg tatcaataat
37261 agcaaacatat gaagaacccg tttatacaga gtatgtaaaa atgttaattt atagtttaat
37321 cccatggccc acgcacacac gattaatttt ttttcatctc cctttagatt gttgtataga
37381 aatttgggta ctgtgaactc cgccgtagtt tccatgggac tatataattt tgtggcctcg
37441 aatacaaatt ttactacata gttatctatc ttaaagacta taccatatcc tcctgtagat
37501 atgtgataaa aatcgtcgtt tataggataa aatcgtttat cctttttgtg gaaaaaggat
37561 gaattaatgt aatcattctc ttctatcttt agtagtgttt ccttattaaa attcttaaaa
37621 taatttaaca atctaactga cggagccaaa ttttggtgta aatctaattg ggacattatg
37681 ttgttaaaat acaaacagtc tcctaatata acagtatctg ataatctatg gggagacatc
37741 cattgatatt caggggatga atcattggca acacccattt attgtacaaa aagccccaat
37801 ttacaaacga aagtccaggt ttgatagaga caaacaatta actatttttgt ctctgttttt
37861 aatttctttg gtaatgaaat tattcacaat atcagtatct tctttatcta ccagagattt
37921 tactaacttg ataaccttgg ctgtctcatt caatagggta gtaatatttg tatgtgtgat
37981 attgatatct ttttgaattg tttcttttag aagtgattct ttgatggtgc cagcatacga
38041 attacaataa tgcagaaact cagttaacat gcaggaatta tagtaagcca attccaattg
38101 ttgcctgtat tgtattagag tattaatatg cgcaatggtg tccttgcgtt tctctgatag
38161 aatgcgagca gcgatttggg cgttatcatt tgacgatatt tctggaatga cgaatcctgt
38221 ttctactaac tttttggtag gacaaagtga aacaatcaag aagatagctt ctcctcctat
38281 ttgtggaaga aattgaactc ctctagatga tctactgacg atagtatctc cttgacagat
38341 attggaccga attacagaag tacctggaat gtaaagcccc gaaacccccc catttttaa
38401 gcagattgtt gccgtaaatc ctgcactgtg accaagatag agagctcctt tggtgaatcc
38461 atctctatgt ttcagtttaa ccaagaaaca gtcagctggt ctaaaatttc catctctatc
38521 taatacagca tctaacttga tgtcaggaac tatgaccggt ttaatgttat atgtaacatt
38581 gagtaaatcc ttaagttcat aatcatcact gtcatcagtt atgtacgatc caaacaatgt
38641 ttctactggc atagtggata cgaagatgct atccatcaga atgtttccct gattagtatt
38701 ttctatatag ctattcttct ttaaacgatt ttccaaatca gtaactatgt tcatttttt
38761 aggagtagga cgcctagcca gtatggaaga ggattttcta gatcctctct tcaacatctt
38821 tgatctcgat ggaatgcaaa accccatagt gaaacaacca acgataaaaa taatattgtt
38881 tttcactttt tataatttta ccatctgact catggattca ttaatatctt tataagagct
38941 actaacgtat aattctttat aactgaactg agatatatac accggatcta tggtttccat
39001 aattgagtaa atgaatgctc ggcaataact aatggcaaat gtatagaaca acgaaattat
39061 actagagttg ttaaagttaa tattttctat gagctgttcc aataaattat ttgttgtaac
39121 tgcgttcaag tcataaatca tcttgatact atccagtaaa ccgtgtttaa gttctggaat
39181 attatcatcc cattgtaaag ccctaatctc gactatcgaa tatcctgctc tgatagcagt
39241 ttcaatatcg acggacgtca atactgtaat aaaggtggta gtattgtcat catcgtgata
39301 aactacggga atatggtcgt tagtaggtac ggtgacttta cacaacgcga tatataactt
39361 tccttttgta ccatttttaa cgtagttggg acgtcctgca gggtattgtt ttgaagaaat
39421 gatatcgaga acagatttga tacgatattt gttggattcc tgattattca ctataatata
39481 atctagacag atagatgatt cgataaatag agaaggtata tcgttggtag gataatacat
39541 ccccattcca gtattctcgg atactctatt gatgacacta gttaagaaca tgtcttctat
39601 tctagaaaac gaaaacatcc tacatggact cattaaaact tctaacgctc ctgattgtgt
39661 ctcgaatgcc tcgtacaagg atttcaagga tgccatagat tctttgacca acgatttaga
39721 attgcgttta gcatctgatt tttttattaa atcgaatggt cggctctctg gtttgctacc
39781 ccaatgataa caatagtctt gtaaagataa acccgaagaa aatttatacg catccatcca
39841 aataacccta gcaccatcgg atgatattaa tgtattatta tagattttcc atccacaatt
39901 attgggccag tatactgtta gcaacggtat atcgaatagg ttactcatgt aacctactag
39961 aatgatagtt cgtgtactag tcataatatc tttaatccaa tctaagaaat ttaaaattag
40021 atttttttaca ctgttaaagt taacaaaggt attaccccgga tacgtggata tcatatatgg
40081 cattggtcca ttatcagtaa tagctccata aactgatacg gcgatggttt ttatatgtgt
40141 ttgatctaac gaggaagaaa ttcgcgccca caattcatct ctagatatgt atttaatatc
40201 aaacggtaac acatcaattt cgggacgcgt atatgtttct aaatttttaa tccaaatata
40261 atgatgacct atatgcccta ttatcatact gtcaactata gtacacctag agaacttacg
40321 atacatcttgt ttcctataat cgttaaattt tacaaatcta taacatgcta aacttttga
40381 cgacagccat tcattaattt ctgatatgga atctgtattc tcgataccgt attgttctaa
40441 agccagtgct atatctccct gttcgtggga acgctttcgt ataatatcga tcaacggata
40501 atctgaagtt tttggagaat aatatgactc atgatctatt tcgtccataa acaatctaga
```

FIG. 23 CONT'D

40561 catagggaatt ggagggcgatg atcttaattt tgtgcaatga gtcgtcaatc ctataacttc
40621 taatcttgta atattcatca tcgacataat actatctatg ttatcatcgt atattagtat
40681 accacggcct tcttcatttc gtgccaaaat aatatacagt cttaaataat tacgcaatat
40741 ctcaatagtt tcataattgt tagctgtttt catcaagatt tgtaccctgt ttaacatgat
40801 ggcgttctat acgtctctat tttcttttct ttaaattttt aacgatttac tgtggctaga
40861 tacccaatct ctctcaaata tttttttagc ctcgcttaca agctgtttat ctatactatc
40921 aaaactgacg antnngtgat tttggtaatg ggttccgtcg aaatttgccg aagtgatatg
40981 aacatattcg tcgtcgacta tcaacaattt tgtattattc tgaatagtga aaaccttcac
41041 agatagatca ttttgaacac acaacgcgtc tagacttctg gcggttgcca tagaatatac
41101 gtcgttctta tcccaattac caactagaag tctgatctta actcctctat taatggctgc
41161 ttctataatg gagttgtaaa tgtcgggcca atagtagcta ttactgtcga cacgtgtagt
41221 gggaactatg gccaaatgtt caatatctat actagtctta gccgacttga gtttatcaat
41281 aactacatcg gtatctagat ctctagaata tcccaatagg tgttccggag aatcagtaaa
41341 gaacactcca cctataggat tcttaatatg atacgcagtg ctaactggca aacaacaagc
41401 cgcagagcat aaattcaacc atgaattttt tgcgctatta aaggctttaa aagtatcaaa
41461 tcttctacga agatctgtgg ccagcggggg ataatcagaa tatacaccta acgttttaat
41521 cgtatgtata gatcctccag taaatgacgc gtttcctaca taacatcttt catcatctga
41581 cacccaaaaa caaccgagta gtagtcccac attatttttt ttatctatat taacggttat
41641 aaaatttata tcgggcagtg gactttgtag gtctcccaga tttcttttcc ctcgtcatc
41701 tagcaaaact attattttaa tccctttttc agatgcctct tttagtttat caaaaataag
41761 cgctcccctа gtcgtactca gaggattaca acaaaaagat gctatgtata tatatttctt
41821 agctagagtg ataatttcgt taaaacattc aaatgttgtt aaatgatcgg atctaaaatc
41881 catattttct ggtagtgttt ctaccagcct acattttgct cccgtaggta ccgatgcaaa
41941 tggccacatt tagttaacat aaaaacttat acatcctgtt ctatcaacga ttctagaata
42001 tcatcggcta tatcgctaaa attttcatca aagtcgacat cacaacctaa ctcagtcaat
42061 atattaagaa gttccatgat gtcatcttcg tctatttcta tatccgtatc cattgtagat
42121 tgttgaccga ttatcgagtt taaatcatta ctaatactca atccttcaga atacaatctg
42181 tgtttcattg taaatttata ggcggtgtat ttaagttggt agattttcaa ttatgtatca
42241 atatagcaac agtagttctt gctcctcctt gattctagca tcctcttcat tatttttctc
42301 tacgtacata agcatgtcca atacgttaga caacacaccg acgatggcgg ccgccacaga
42361 cacgaatatg actagaccga tgaccattta aaaaccccтc tctagctttc acttaaactg
42421 tatcgattat tcttttagaa catgtataat ataaaaacat tattctattt cgaatttagg
42481 cttccaaaaa tttttcatcc gtaaaccgat aataatatat atagacttgt taatagtcgg
42541 aataaataga ttaatgctta aactatcatc atctccacga ttagagatac aatatttaca
42601 tttttttttgc tgtttcgaaa ctttatcaat acacgttaat acaaaccccag gaaggagata
42661 ttgaaaactga ggctgttgaa aatgaaacgg tgaatacaat aattcagata atgtaaaatc
42721 atgattccgt attctgatga tattcgaact gctaatggat gtcgatggta tgtatctagg
42781 agtatctatt ttaacaaagc atcgatttgc taatatacaa ttatcctttt gattaattgt
42841 tattttattc atattcttaa aaggtttcat atttatcaat tcttctacat taaaaatttc
42901 catttttaat ttatgtagcc cccgcaatac tcctcattac gtttcatttt ttgtctataa
42961 tatccatttt gttcatctcg gtacatagat tatccaattg agaagcgcat ttagtagttt
43021 tgtacatttt aagtttattg acgaatcgtc gaaaactagt tatagttaac attttattat
43081 ttgataccct gatattaata cccctgccgt tactattatt tataactgat gtaatccacg
43141 taacattaga attaattatc gatagtaatg catcgacgct tccaaaattg tctattataa
43201 actcaccgat aatttttttа ttgcatgttt tcatattcat taggattatc aaatctttaa
43261 tcttactacg attgtatgcg ttgatattgc aagacgtcat tctaaaagac ggaggatctc
43321 catcaaatgc cagacaatca cgtacaaagt acatggaaat aggttttgtt ctattgcgca
43381 tcatagattt atatagaaca cccgtagaaa tactaatttg ttttactcta taaaatacta
43441 atgcatctat ttcatcgttt tgtataacgt ctttccaagt gtcaaattcc aaatttttтt
43501 cattgatagt accaaattct tctatctctt taactacttg catagatagg taattacagt
43561 gatgcctaca tgccgttttt tgaaactgaa tagatgcgtc tagaagcgat gctacgctag
43621 tcacaatcac cacttttcata tttagaatat atgtatgtaa aaatatagta gaatttcatt
43681 ttgtttttтt ctatgctata aatgaattct cattttgcat ctgctcatac tccgttttat
43741 atcaatacca aagaaggaag atatctggtt ctaaaagccg ttaaagtatg cgatgttaga
43801 actgtagaat gcgaaggaag taaagcttcc tgcgtactca aagtagataa acctctatcg
43861 cccgcgtgtg agagaagacc ttcgtccccg tccagatgcg agagaatgaa taaccctgga
43921 aaacaagttc cgtttatgag gacggacatg ctacaaaata tgttcgcggc taatcgcgac

FIG. 23 CONT'D

43981 aacgtggcgt cgagactttt gaactaaaat acaattatat ccttttcgat attaataaat
44041 ccgtgtcgtc caggtttttt atctctttca gtatgtgaat agataggtat tttatctcta
44101 ttcatcatcg aatttaagag atccgataaa cattgtttgt attctccaga tgtcagcatc
44161 tgatacaaca atatatgtgc acataaacct ctggcactta tttcatgtac cttcccctta
44221 tcactaagga gaatagtatt tgagaaatat gtatacatga tattatcatg aattagatat
44281 acagaatttg taacactctc gaaatcacac gatgtgtcgg cgttaagatc taatatatca
44341 ctcgataaca catttttcatc tagatacact agacattttt taaagctaaa atagtcttta
44401 gtagtgacag taactatgcg attattttca tcgatgatac atttcatcgg catattatta
44461 cgcttaccat caaagactat accatgtgta tatctaacgt attctagcat ggttgccata
44521 cgcgcattaa acttttcagg atctttggat agatcttcca atctatctat ttgagaaaac
44581 atttttatca tgttcaatag ttgaaacgtc ggatccacta tatagatatt atctataaag
44641 attttaggaa ctacgttcat ggtatcctgg cgaatattaa aactatcaat gatatgatta
44701 tcgttttcat cttttatcac catatagttt ctaagatatg ggatttttact taatataata
44761 ttatttcccg tgataaattt tattagaaag gccaaatcta taagaaaagt tctagaatta
44821 gtctgaagaa tatctatatc gccgtaccgt atatttggat taattagata tagagaatat
44881 gatccgtaac atatacaact tttattatgg cgtctaagat attcttccat caacttatta
44941 acatttttga ctagggaaga tacattatga cgtcccatta ctttttgcctt gtctattact
45001 gcgacgttca tagaatttag catatctctt gccaattctt ccattgatgt tacattataa
45061 gaaattttag atgaaattac atttggagct ttaatagtaa gaactcctaa tatgtccgtg
45121 tatgtggtca ctaatacaga ttgtagttct ataatcgtaa ataatttacc tatattatat
45181 gtttgagtct gttagaaaaa gtagctaagt atacgatctt ttatttctga tgcagatgta
45241 ttaacatcgg aaaaaaatct ttttttattc tttttttacta aagatacaaa tatgtctttg
45301 ttaaaaacag ttatttttg aatatttcta gcttgtaatt ttaacatatg atattcgttc
45361 acactaggta ctctgcctaa ataggtttct ataatcttta atgtaatatt aggaagagta
45421 ttctgatcag gattcctatt catttttgagg atttaaaact ctgattattg tctaatatgg
45481 tctctacgca aacttttttca cagagcgata gagtttttga taactcgttt ttcttaagaa
45541 atataaaact actgtctcca gagctcgctc tatcttttat tttatttaat tcgatacaaa
45601 ctcctgatac tggttcagaa agtaattcat taatttttcag tccttttatag aagatattta
45661 atatagataa tacaaaattt tcagttcttg atatcgatct gattgatcct agaactagat
45721 atattaataa cgtgctcatt aggcagttta tggcagcttg ataattagat atagtatatt
45781 ccagttcata tttattagat accgcattgc ccagattttg atattctatg aattcctctg
45841 aaaataaatc caaaataact aaacattcta ttttttgtgg attagtgtac tctcttccct
45901 ctatcatgtt cactactggt gtccacgatg ataaatatct agagggaata taatatagtc
45961 cataggatgc caatctagca atgtcgaata actgtaattt gattcttcgt tcttcattat
46021 gaattgattc ttgaggtata aacctaacac aaattatatt attagacttt tcgtatgtaa
46081 tgtctttcat gttataagtt tttaatcctg gaatagaatc tattttaatg aggcttttaa
46141 acgcagagtt ctccaacgag tcaaagcata atactctgtt gtttttctta tatacgatgt
46201 tacgattttc ttctttgaat ggaataggtt tttgaattag tttataatta caacataata
46261 gataaggaag tgtgcaaata gtacgcggaa aaaacataat agctcccctg ttttcatcca
46321 tggttttaag taaatgatca ctggcttctt tagtcaatgg atattcgaac attaaccgtt
46381 tcatcatcat tggacagaat ccatatttct taatgtaaag agtgatcaaa tcattgtgtt
46441 tattgtacca tcttgttgta aatgtgtatt cggttatcgg atctgctcct ttttctatta
46501 aagtatcgat gtcgatctcg tctaagaatt caactatatc gacatatttc atttgtatac
46561 acataaccat tactaacgta gaatgtatag gaagagatgt aacgggaaca gggtttgttg
46621 attcgcaaac tattctaata cataattctt ctgttaatac gtcttgcacg taatctatta
46681 tagatgccaa gatatctata taattatttt gtaagatgat gttaactatg tgatctatat
46741 aagtagtgta ataattcatg tatttcgata tatgttccaa ctctgtcttt gtgatgtcta
46801 gtttcgtaat atcttatagca tcctcaaaaa atatattcgc atatattccc aagtcttcag
46861 ttctatcttc taaaaaatct tcaacgtatg gaatataata atctatttta cctcttctga
46921 tatcattaat gatatagttt ttgacactat cttctgtcaa ttgattctta ttcactatat
46981 ctaagaaacg gatagcgtcc ctaggacgaa ctactgccat taatatctct attatagctt
47041 ctggacataa ttcatctatt atacccagaat taatgggaac tattccgtat ctatctaaca
47101 tagttttaag aaagtcagaa tctaagacct gatgttcata tattggttca tacatgaaat
47161 gatcttatt gatgatagtg actatttcat tttctgaaaa ttggtaactc attctatata
47221 tgctttcctt gttgatgaag gatagaatat actcaataga atttgtacca acaaactgtt
47281 ctcttatgaa tcgtatatca tcatctgaaa taatcatgta aggcatacat ttaacaatta
47341 gagacttgtc tcctgttatc aatatactat tcttgtgata atttatgtgt gaggcaaatt

FIG. 23 CONT'D

47401 tgtccacgtt ctttaatttt gttatagtag atatcaaatc caatggagct acagttcttg
47461 gcttaaacag atatagtttt tctggaacga attctacaac attattataa aggactttgg
47521 gtagataagt gggatgaaat cctattttaa ttaatgcgat agccttgtcc tcgtgcagat
47581 atccaaacgc ttttgtgata gtatggcatt cattgttcag aaacgctcta cgaatatctg
47641 tgacagatat catctttaga gaatatacta gtcgcgttaa tagtactaca atttgtattt
47701 tttaatctat ctcaataaaa aaattaatat gtatgattca atgtataact aaactactaa
47761 ctgttattga taactagaat cagaatctaa tgatgacgta accaagaagt ttatctactg
47821 ccaatttagc tgcattattt ttagcatctc gtttagattt tccatctgcc ttatcgaata
47881 ctctttcgtc gatgtctaca caggcataaa atgtaggaga gttactaggc cccactgatt
47941 caatacgaaa agaccaatct ctcctagtaa tttggcagta ctcattaata acggtgacag
48001 ggttagcacc tttccaatca ataatttttt tagccggaat aacatcatca aaagacttat
48061 gatcctctct cattgatttt tcgcgggata catcatctat tatgacgtca gccatagcat
48121 cagcatccgg cttatccgcc tccgttgtca taaaccaacg aggaggaata tcgtcggagc
48181 tgtacaccat agcactacgt tgaagatcgt acagagcttt attaacttct cgcttctcca
48241 tattaagttg tctagttagt tgtgcagcag tagctcctte gattccaatg gttttaatag
48301 cctcacacac aatctctgcg ttagaacgct cgtcgatata gattttagac atttttagag
48361 agaactaacg caatcagtaa taaaactaat ttatttttatc atttttttta ttcatcatcc
48421 tctggtggtt cgtcgtttct atcgaatgta gctctgatta acccgtcatc tataggtgat
48481 gctggttctg gagattctgg aggagatgga ttattatctg gaagaatctc tgttatttcc
48541 ttgttttcat gtatcgattg cgttgtaaca ttaagattgc gaaatgctct aaatttggga
48601 ggcttaaagt gttgtttgca atctctacac gcgtgtctaa ctagtggagg ttcgtcagcg
48661 gctctagttt gaatcatcat cggcgtagta ttcctacttt tacagttagg acacggtgta
48721 ttgtatttct cgtcgagaac gttaaaataa tcgttgtaac tcacatcctt tatttatct
48781 atattgtatt ctactccttt cttaatgcat tttataccga ataagagata gcgaaggaat
48841 tctttttcgg tgccgctagt accettaatc atatcacata gtgttttata ttccaaattt
48901 gtggcaatag acggtttatt tctatacgat agtttgttte tggaatcctt tgagtattct
48961 ataccaatat tattctttga ttcgaatita gtttcttcga tattagattt tgtattacct
49021 atattcttga tgtagtactt tgatgatttt tccatggccc attctattaa gtcttccaag
49081 ttggcatcat ccacatattg tgatagtaat tctcggatat cagtagcggt taccgccatt
49141 gatgtttgtt cattggatga gtaactacta atgtatacat tttccattta taacacttat
49201 gtattaactt tgttcattta tatttttca ttattatgtt gatattaaca aaagtgaata
49261 tatatatgtt aataattgta ttgtggttat acggctacaa ttttataatt agtgaaagtc
49321 agtgtccgat gatcaatgac gatagcttta ctctgaaaag aaagtatcaa atcgatagtg
49381 cggagtcaac aataaaaatg gataagaaga ggacaaagtt tcagaataga gccaaaatgg
49441 taaaagaaat aaatcagaca ataagagcag cacaaactca ttacggagca ttgaaactag
49501 gatacataaa atttaagaga atgattagga ctactactct agaagatata gcaccatcta
49561 ttccaaataa tcagaaaact tataaactat tctcggacat ttcagccatc ggcaaagcat
49621 cacggaatcc aagtaagatg gtatatgctc tgctgcttta catgtttccc aatttgtttg
49681 gagatgatca tagattcatt cgttatagaa tgcatccaat gagtaaaatc aaacacaaga
49741 tcttctctcc tttcaaactt aatcttatta gaatattagt ggaagaaaga ttctataata
49801 atgaatgcag atctaataaa tggagaataa ttggaacaca agttgataaa atgttgatag
49861 ctgaatctga taaatataca atagatgcaa ggtataacct aaaacccatg tatagaatca
49921 agggaaaatc tgaagaagat acctctttta tcaaacagat ggtagaacaa tgtgtgacat
49981 cccaggaatt ggtggaaaaa gtgttgaaga tactgtttag agatttgttc aagagtggag
50041 aatacaaagc gtacagatac gatgatgatg tagaaaatgg atttattgga ttggatacac
50101 taaaattaaa cattgttcat gatatagttg aaccatgtat gcctgttcgt aggccagtgg
50161 ctaagatact gtgtaaagaa atggtaaata aatactttga gaatccgcta catattattg
50221 gtaaaaatct tcaagagtgc attgactttg ttagtgaata ggcatttcat ctttctccaa
50281 tactaattca aattgttaaa ttaataatgg atagtataaa tagttattag tgataaaata
50341 gtaaaaataa ttattagaat aagagtgtag tatcatagat aactctcttc tataaaaatg
50401 gattttattc gtagaaagta tcttatatac acagtagaaa ataatatgga ttttttaaag
50461 gatgatacat taagtaaagt aaacaatttt accctcaatc atgtactagc tctcaagtat
50521 ctagttagca attttcctca acatgttatt actaaggatg tattagctaa taccaatttt
50581 tttgttttca tacatatggt acgatgttgt aaagtgtacg aagcggtttt acgacacgca
50641 tttgatgcac ccacgttgta cgttaaagca ttgactaaga attatttatc gtttagtaac
50701 acaatacaat cgtacaagga aaccgtgcat aaactaacac aagatgaaaa attttagag
50761 gttgccaaat acatggacga attaggagaa cttataggcg taaattatga cttagttctt

FIG. 23 CONT'D

```
50821 aatccattat ttcacggagg ggaacccatc aaagatatgg aaatcatttt tttaaaactg
50881 tttaagaaaa cagacttcaa agttgttaaa aaattaagtg ttataagatt acttatttgg
50941 gcttacctaa gcaagaaaga tacaggcata gagtttgcgg ataatgatag acaagatata
51001 tatactctat ttcaacaaac tggtagaatc gtccatagca atctaacaga aacgtttaga
51061 gattatatct ttcccggaga taagactagc tattgggtgt ggttaaacga aagtatagct
51121 aatgatgcgg atattgttct taatagacac gccattacca tgtatgataa aattcttagt
51181 tatatatact ctgagataaa acaaggacgc gttaataaaa acatgcttaa gttagtttat
51241 atctttgagc ctgaaaaaga tatcagagaa ctttctgcta gaaatcatata tgatattcct
51301 ggagatatcc tatctattat tgatgcaaaa aacgacgatt ggaaaaaata ttttattagt
51361 ttttataaag ctaatttttat taacggtaat acatttatta gtgatagaac gtttaacgag
51421 gacttattca gagttgttgt tcaaatagat cccgaatatt tcgataatga acgaattatg
51481 tctttattct ctacgagtgc tgcggacatt aaacgatttg atgagttaga tattaataac
51541 agttatatat ctaatataat ttatgaggtg aacgatatca cattagatac aatggatgat
51601 atgaagaagt gtcaaatctt taacgaggat acgtcgtatt atgttaagga atacaataca
51661 tacctgtttt tgcacgagtc ggatcccatg gtcatagaga acggaatact aaagaaactg
51721 tcatctataa aatccaagag tagacggctg aacttgtttta gcaaaaacat tttaaaatat
51781 tatttagacg gacaattggc tcgtctaggt cttgtgttag atgattataa aggagacttg
51841 ttagttaaaa tgataaacca tcttaagtct gtggaggatg tatccgcatt cgttcgattt
51901 tctacagata aaaaccctag tattcttcca tcgctaatca aaactatttt agctagttat
51961 aatatttcca tcatcgtctt atttcaaagg tttttaagag ataatctata tcatgtagaa
52021 gaattcttgg ataaaagcat ccatctaacc aagacggata agaaatatat acttcaattg
52081 ataagacacg gtagatcata gaacagacca aatatattat taataatttg tatatacata
52141 gatataatta tcacatatta aaaattcaca cattttgat aaatgggaac tgctgcaaca
52201 attcagactc ccaccaaatt aatgaataaa gaaaatgcag aaatgatttt ggaaaaaatt
52261 gttgatcata tagttatgta tattagtgac gaatcaagtg attcagaaaa taatcctgaa
52321 tatattgatt ttcgtaacag atacgaagac tatagatctc tcattataaa aagtgatcac
52381 gagtttgtaa agctatgtaa aaatcatgca gagaaaagtt ctccagaaac gcaacaaatg
52441 attatcaaac acatatacga acaatatctt attccagtat ctgaagtact attaaaacct
52501 ataatgtcca tgggtgacat aattacatat aacggatgta aagacaatga atggatgcta
52561 gaacaactct ctaccctaaa ctttaacaat ctccgcacat ggaactcatg tagcatcggc
52621 aatgtaacgc gtctgttta tacatttttt agttatctga tgaaagataa actaaatata
52681 taagtataat cccattctaa tactttaacc tgatgtatta gcatcttatt agaatattaa
52741 cctaactaaa agacataaca taaaaactca ttacatagtt gataaaaagc ggtaggatat
52801 aaatattatg gctgccaccg ttccgcgttt tgacgacgtg tacaaaaatg cacaaagaag
52861 aattctagat caagaaacat tttttagtag aggtctaagt agaccgttaa tgaaaaacac
52921 atatctattt gataattacg cgtatggatg gataccagaa actgcaattt ggagtagtag
52981 atacgcaaac ttagatgcaa gtgactatta tcccatttcg ttgggattac ttaaaaagtt
53041 cgagtttctc atgtctctat ataaaggtcc tattccagta tacgaagaaa aagtaaatac
53101 tgaattcatt gctaatggat cgttctctgg tagatacgta tcatatcttc gaaagttttc
53161 tgctcttcca acaaacgagt ttattagttt tttgttactg acttccattc caatctataa
53221 tatcttgttc tggtttaaaa atactcagtt tgatattact aaacacacat tattcagata
53281 cgtctataca gataatgcca aacacctggc gttggctagg tatatgcatc aaacaggaga
53341 ctataagcct ttgtttagtc gtctcaaaga gaattatata tttaccggtc ccgttccaat
53401 aggtatcaaa gatataaatc accctaatct tagtagagca agaagtccat ccgattatga
53461 gacattagct aatattagta ctatattgta ctttaccaag tatgatccgg tattaatgtt
53521 ttrattgttt tacgtacctg ggtattcaat tactacaaaa attactccag ccgtagaata
53581 tctaatggat aaactgaatc taacaaagag cgacgtacaa ctgttgtaaa ttattttatg
53641 cttcgtaaaa tgtaggtttt gaaccaaaca ttctttcaaa gaatgagatg cataaaactt
53701 tattatccaa tagattgact atttcggacg tcaatcgttt aaagtaaact tcgtaaaata
53761 ttctttgatc actgccgagt ttaaaacttc tatcgataat tgtttcatat gttttaatat
53821 ttacaagttt tttggtccat ggtacattag ccggacaaat atatgcaaaa taatatcgtt
53881 ctccaagttc tatagtttct ggattatttt tattatattc agtaaccaaa tacatattag
53941 ggttatctgc ggatttataa tttgagtgat gcattcgact caacataaat aatttctagag
54001 gagacgatct actatcaaat tcggatcgta aatctgtttc taaagaacgg agaatatcta
54061 tacatacctg attagaattc atccgtcctt cagacaacat ctcagacagt ctggtcttgt
54121 atgtcttaat catattctta tgaaacttgg aaacatctct tctagtttca ctagtacctt
54181 tattaattct ctcaggtaca gattttgaat tcgacgatgc cgagtatttc atcgttgtat
```

FIG. 23 CONT'D

54241 atttcttctt cgattgcata atcagattct tatataccgc ctcaaactct attttaaaat
54301 tattaaacaa tactctatta ttaatcagtc gttctaactc ctttgctatt tctatggact
54361 tatctacatc ttgactgtct atctctgtaa acacggagtc ggtatctcca tacacgctac
54421 gaaaacgaaa tctgtaatct ataggcaacg atgttttcac aatcggatta atatctctat
54481 cgtccatata aaatggatta cttaatggat tggcaaaccg taacatacog ttagataact
54541 ctgctccatt tagtaccgat tctagataca agatcattct acgtcctatg gatgtgcaac
54601 tcttagccga agcgtatgag tatagagcac tatttctaaa tcccatcaga ccatatactg
54661 agttggctac tatcttgtac gtatattgca tggaatcata gatggccttt tcagttgaac
54721 tggtagcctg ttttaacatc tttttatatc tggctctctc tgccaaaaat gttcttaata
54781 gtctaggaat ggttccttct atcgatctat cgaaaattgc tatttcagag atgaggttcg
54841 gtagtctagg ttcacaatga accgtaatat atctaggagg tggatatttc tgaagcaaga
54901 gctgattatt tatttcttct tccaatctat tggtactaac aacgacaccg actaatgttt
54961 ccggagatag atttccaaag atacacacat taggatacag actgttataa tcaaagatta
55021 atacattatt actaaacatt ttttgttttg gagcaaatac cttaccgcct tcataaggaa
55081 acttttgttt tgtttctgat ctaactaaga tagttttagt ttccaacaat agctttaaca
55141 gtggaccctt gatgactgta ctcgctctat attcgaatac catggattga ggaagcacat
55201 atgttgacgc acccgcgtct gttttttgtt ctactccata atactaccac aaatactgac
55261 acaaacaagc atcatgaata cagtatctag ccatatctaa agctatgttt agattataat
55321 ccttatacat ctgagctaaa tcaacgtcat cctttccgaa agataattta twtgtatcat
55381 taggtaaagt aggacataat agtacgactt taaatccatt ttcccaaata tctttacgaa
55441 ttactttaca tataatatcc tcatcaacag tcacataatt acctgtggtt aaaaccttig
55501 caaatgcagc ggctttgcct ttcgcgtccg tagtatcgtc accgatgaac gtcatttctc
55561 taactcctct atttaatact ttacccatgc aactgaacgc gttcttggat atagaatcca
55621 atttgtacga atccaatttt tcagattttt gaatgaatga atatagatcg aaaaatatag
55681 ttccattatt gttattaacg tgaaacgtag tattggccat gccgcctact cccttatgac
55741 tagactgatt tctctcataa atacagagat gtacagcttc cttttgtcc ggagatctaa
55801 agataatctt ctctcctgtt aataactcta gacgattagt aatatatctc agatcaaagt
55861 tatgtcrgtt aaaggtaacg acatagtcga acgttagttc caacaattgt ttagctattc
55921 gtaacaaaac tatttcagaa cataaaacta gttctcgttc gtaatccatt tccattagtg
55981 actgtatcct caaacatcct ctatcgacgg cttcttgtat ttcctgttcc gttaacatct
56041 cttcattaat gagcgtaaac aataatcgtt taccacttaa atcgatataa cagtaacttg
56101 tatgcgagat tgggttaata aatacagaag gaaacttctt atcgaagtga cactctatat
56161 ctagaaataa gtacgatctt gggatatcga atctaggtat ttttttagcg aaacagttac
56221 gtggatcgtc acaatgataa catccattgt taatctttgt caaatattgc tcgtccaacg
56281 agtaacatcc gtctggagat atcccgttag aaatataaaa ccaactaata ttgagaaatt
56341 catccatggt ggcatttigt atgctgcgtt tctttggctc ttctatcaac cacatatctg
56401 cgacggagca ttttctatct ttaatatcta gattataact tattgtctcg tcaatgtcta
56461 tagttctcat ctttcccaac ggcctcgcat taaatggagg aggagacaat gactgatata
56521 tttcgtccgt cactacgtaa taaaagtaat gaggaaatcg tataaatacg gtctcaccat
56581 ttcgacatct ggatttcaga tataaaaatc tgttttcacc gtgacttica aaccaattaa
56641 tgcaccgaac atccatttat agaatttaga aatatatttt catttaaatg aatcccaaac
56701 attggggaag agccgtatgg accattattt ttatagtact ttcgcaagcg ggtttagacg
56761 gcaacataga agcgtgtaaa cgaaaactat atactatagt tagcactctt ccatgtcctg
56821 catgtagacg gcacgcgact atcgctatag aggacaataa tgtcatgtct agcgatgatc
56881 tgaattatat ttattatttt ttcatcagat tatttaacaa tttggcatct gatcccaaat
56941 acgcgatcga tgtgacaaag gttaaccctt tataaactta acccattata aaacttatga
57001 ttagtcacga ctgaaataac cgcgtgatta ttttttggta taattctaca cggcatggtt
57061 tctgtgacta tgaattcaac ccccgttaca ttagtgaaat ctttaacaaa cagcaagggt
57121 tcgtcaaaga cataaaactc attgtttaca atcgaaatag accccctatc acacttaaaa
57181 taaaaaatat ccttatcctt taccaccaaa taaaattctg attggtcaat gtgaatgtat
57241 tcacttaaca gttccacaaa tttatttatt aactccgagg cacatacatc gtcggtattt
57301 tttatggcaa actttactct tccagcatcc gtttctaaaa aaatattaac gagttccatt
57361 tatatcatcc aatattattg aaatgacgtt gatggacaaa tgatacaaat aagaaggtac
57421 ggtacctttg tccaccatct cctccaattc atgctctatt ttgtcattaa ctttaatgta
57481 tgaaaacagt acgccacatg gttccatgac agtgtgtaac actttggata caaaatgttt
57541 gacattagta taattgttca agactgtcaa tctataatag atagtagcta taatatattc
57601 tatgatggta ttgaagaaga tgacaacctt ggcatattga tcatttaaca cagacatggt

FIG. 23 CONT'D

57661 atcaacagat agcttgaatg aaagagaatc agtaattgga ataagcgtct tctcgatgga
57721 gtgtccgtat accaacatgt ctgatatttt gatgtattcc attaaattat ttagtttttt
57781 ctttttattc tcgttaaaca gcatttctgt caacggaccc caacatcgtt gaccgattaa
57841 gttttgattg atttttccgt gtaaggcgta tctagtcaga tcgtatagcc tatccaataa
57901 tccatcgtct gtgtgtagat cacatcgtac acttttttaat tctctataga agagcgacag
57961 acatctggag caattacaga cagcaatttc tttattctct acagatgtaa gatacttgaa
58021 gacattccta tgatgatgca gaattttgga taacaoggta ttgatggtat ctgttaccat
58081 aattcctttg atggctgata gtgtcagagc acaagattto caatctttga caatttttag
58141 caccattatc tttgttttga tatctatatc agacagcatg gtgcgtctga caacacaagg
58201 attaagacgg aaagatgaaa tgattctctc aacatcttca atggatacct tgctatttct
58261 tctggcatta tctatatgtg cgagaatatc ctctagagaa tcagtatcct ttttgatgat
58321 agtggatctc aatgacatgg gacgtctaaa ccttcttatt ctatcaccag attgcatggt
58381 gatttgtctt ctttctttta tcataatgta atctctaaat tcatcggcaa attgtctata
58441 tctaaaatca taatatgaga tgtttacctc tacaaatatc tgttcgtcca atgttagagt
58501 atttacatca gttttgtatt ccaaattaaa catggcaacg gatttaattt tatattcctc
58561 tattaagtcc tcgtcgataa taacagaatg tagataatca tttaatccat cgtacatggt
58621 tggaagatgc tcgttgacaa aatctttaat tgtcttgatg aaggtgggac tatatctaac
58681 atcttgatta ataaaattta taacattgtc cataggatac tttgtaacta gttttataca
58741 catctcttca tcggtaagtt tagacagaat atcgtgaaca ggtggtatat tatattcatc
58801 agatatacga agaacaatgt ccaaatctat attgtttaat atattatata gatgtagtgt
58861 agctcctaca ggaatatctt taactaagtc aatgatttca tcaacogtta gatctatttt
58921 aaagttaatc atataggcat tgatttttaa aaggtatgta gccttgacta cattctcatt
58981 aattaaccat tccaagtcac tgtgtgtaag aagattatat tctatcataa gcttgactac
59041 atttggtccc gataccatta aagaattctt atgatataag gaaacagatt ttaggtactc
59101 atctactcta caagaatttt ggagagcctt aacgatatca gtgacgttta ttatttcagg
59161 aggaaaaaac ctaacattga gaatatcgga attaatagct tccagataca gtgattttgg
59221 caatagtccg tgtaatccat aatccagtaa cacgagctgg tgcttgctag acacctttte
59281 aatgtttaat ttttttgaaa taagctttga taaagcctte ctcgcaaatt ccggatacat
59341 gaacatgtcg gcgacatgat taagtattgt tttttcatta tttttatatt ttctcaacaa
59401 gttctcaata ccccaataga tgatagaata tcacccaatg cgtccatgtt gtctatttcc
59461 aacaggtcgc tatatccacc aatagaagtt ttcccaaaaa agattctagg aacagttcta
59521 ccaccagtaa tttgttcaaa atagtcacgc aattcatttt cgggtttaaa ttctttaata
59581 tcgacaattt catacgctcc tcttttgaaa ctaaacttat ttagaatatc cagtgcattt
59641 ctacaaaaag gacatgtata cttgacaaaa attgtcactt tgttattggc caacctttgt
59701 tgtacaaatt cctcggccat tttaatattt aagtgatata aaactatctc gacttattta
59761 actctttagt cgagatatat ggacgcagat agctatatga tagccaacta cagaaggcaa
59821 acgctataaa aaacataatt acgacgagca tatttataaa tatttttatt cagcattact
59881 tgatatagta atattaggca cagtcaaaca ttcaaccact ctcgatacat taactctctc
59941 attttcttta acaaattctg caatatcttc gtaaaaagat tcttgaaact ttttagaata
60001 tctatcgact ctagatgaaa tagcgttcgt caacatacta tgttttgtat acataaaggc
60061 gcccatttta acagtttcta gtgacaaaat gctagcgatc ctaggatcct ttagaatcac
60121 atagattgac gattcgtctc tcttagtaac tctagtaaaa taatcataca atctagtacg
60181 cgaaataata ttatccttga cttgaggaga tctaaaacaat ctagttttga gaacatcgat
60241 aagttcatcg ggaatgacat acatactatc tttaatagaa ctctttccat ccagttgaat
60301 ggattcgtcc ttaaccaact gattaatgag atcttctatt ttatcatttt ccagatgata
60361 tgtatgtcca ttaaagttaa attgtgtagc gcttctttct agtctagcag ccaatacttt
60421 aacatcacta atatcgatat acaaaggaga tgatttatct atggtattaa gaattcgttt
60481 ttcgacatct gtcaaaacca attcctttct gcctgtatca tccagttttc catcctttgt
60541 aaagaaatta ttttctacta gactattaat aagactgata aggattcctc cataattgca
60601 caatccaaac tttttcacaa aactagactt tacaagatct acaggaatgc gtacttcagg
60661 tttcttagct tgtgattttt tcttttgtgg acatttttctt gtgaccaact catctaccat
60721 ttcattgatt ttagcagtga aataagcttt caatgcacgg gcactgatac tattgaaaac
60781 gagttgatct tcaaattccg ccatttaagt tcaccaaaca acttttaaat acaaatatat
60841 caatagtagt agaataagaa ctataaaaaa aataaataatt aaccaatacc aaccccaaca
60901 accggtatta ttagttgatg tgactgtttt ctcatcactt agaacagatt taacaatttc
60961 tataaagtct gtcaaaatcat cttccggaga ccccataaat acaccaaata tagcggcgta
61021 caacttatcc atttatacat tgaatattgg cttttcttta tcgctatctt catcatattc

FIG. 23 CONT'D

```
61081 atcatcaata tcaacaagtc ccagattacg agccagatct tcttctacat tttcagtcat
61141 tgatacacgt tcactatctc cagagagtcc gataacgtta gccaccactt ctctatcaat
61201 gattagtttc ttgagtgcga atgtaatttt tgtttccgtt ccggatctat agaaaactac
61261 aggtgtgata attgccttgg ccaattgtct ttctctttta ctgagtgatt ctagttcacc
61321 ttctatagat ctgagaatgg atgattctac agtcgaaaca tattctacca tggctccgtt
61381 taatttgttg atgaagatgg attcatcctt aaatgttttc tctgtaatag tttccaccga
61441 aagactatgc aaagaatttg gaatgcgttc cttgtgctta atgtttccat agacggcttc
61501 tagaagttga tacaacatag gactagccgc ggtaacttct attttagaa agtatccatc
61561 gttctatct tgtttagatt tatttttata aagtttagtc tctccttcca acataataaa
61621 agtggaagtc atttgactag ataaactatc agtaagtttt atagagatag acgaacaatt
61681 agcgtattga gaagcattta gtgtaacgta ttcgatacat tttgcattag atttactaat
61741 cgatttgca tactctataa caccccgaca agtctgtaga gaatcgctag atgcagtagg
61801 tcttggtgaa gtttcaacto tcttcttgat taccttactc atgattaaac ctaaataatt
61861 gtactttgta atataatgat atatattttc actttatctc atttgagaat aaaaatgttt
61921 ttgtttaacc actgcatgat gtacagattt cggaatcaca aaccaccggt ggttttattt
61981 tatccttgtc caatgtgaat tgaatgggag cggatgcggg tttcgtacgt agatagtaca
62041 ttcccgtttt tagaccgaga ctccatccgt aaaaatgcat actcgttagt ttggaataac
62101 tcggatctgc tatatggata ttcatagatt gactttgatc gatgaaggct ccoctgtctg
62161 cagccatttt tatgatcgtc ttttgtggaa tttcccaaat agttttataa actcgcttaa
62221 tatctttctgg aaggtttgta ttctgaatgg atccaccatc tgccataatc ctattcttga
62281 tctcatcatt ccataatttt ctctcggtta aaacttctaag gagatgcgga ttaactactt
62341 gaaattctcc agacaatact ctccgagtgt aaatattact ggtatacggt tcccccgact
62401 cattatttcc caaaatttga gcagttgatg cagtcggcat aggtgccacc aataaactat
62461 ttctaagacc gtatgttctg atttatctt ttagaggttc ccaattccaa agatccgacg
62521 gtacaacatt ccaaagatca tattgtagaa taccgttact ggcgtacgat cctacatatg
62581 tatcgtatgg tccttcctc tcagctagtt cacaactcgc ctctaatgca ccgtaataaa
62641 tggtttcgaa gatcttctta tttagatctt gtgcttccag gctatcaaat ggataattta
62701 agagaataaa cgcgtccgct aatccttgaa cacaatacc gataggtcta tgtctcttat
62761 tagagatttc agcttctgga ataggataat aattaatatc tataatttta ttgagatttc
62821 tgacaattac tttgaccaca tccttcagtt tgagaaaatc aaatcgccca tctattacaa
62881 acatgttcaa ggcaacagat gccagattac aaacggctac ctcattagca tccgcatatt
62941 gtattatctc agtgcaaaga ttactacact tgatagttcc taaattttgt tgattactct
63001 ttttgttaca cgcatcctta taaagaatga atggagtacc agtttcaatc tgagattcta
63061 taatcgcttt ccagacgact cgagccttta ttatagattt gtatctcctt tctctttcgt
63121 atagtgtata caatcgttcg aactcgtctc cccaaacatt gtccaatcca ggacattcat
63181 ccggacacat caacgaccac tctccgtcat ccttcactcg tttcataaag agatcaggaa
63241 tccaaagagc tataaataga tctctggttc tatgttcctc gtttcctgta ttctttttaa
63301 gatcgaggaa cgccataata tcagaatgcc acggttccaa gtatatggcc ataactccag
63361 gccgtttgtt tcctccctga tctatgtatc tagcggtgtt attataaact ctcaacattg
63421 gaataatacc gtttgatata ccattggtac cggagatata gcttccactg gcacgaatat
63481 tactaattga tagacctatt ccccctgcca ttttagagat taatgcgcat cgttttaacg
63541 tgtcatagat acctctatg ctatcatcga tcatgttaag tagaaaacag ctagacattt
63601 ggtgacgact agttccccca ttaaataagg taggagaagc gtgcgtaaac catttttcag
63661 aaagtagatt gtacgtctca atagctgagt ctatatccca ttgatgaatt cctactgcga
63721 cacgcattaa catgtgctga ggtctttcaa cgatcttgtt gtttatttte aacaagtagg
63781 atttttccaa agttttaaaa ccaaaatagt tgtatgaaaa gtctcgttcg taaataataa
63841 ccgagttgag tttatcctta tatttgttaa ctatatccat ggtgatactt gaaataatcg
63901 gagaatgttt cccatttta ggattaacat agttgaataa atcctccatc acttcactaa
63961 atagtttttt tgtttccttg tgtagatttg atacggctat tctggcggct agaatggcat
64021 aatccggatg ttgtgtagta caagtggctg ctatttcggc tgccagagtg tccaattcta
64081 ccgttgttac tccattatat attccttgaa taaccttcat agctatttta ataggatcta
64141 tatgatccgt gtttaagcca taacataatt ttctaatacg agacgtgatt ttatcaaaca
64201 tgacattttc cttgtatcca tttcgtttaa tgacaaacat ttttgttggt gtaataaaaa
64261 aattatttaa cttttcatta atagggattt gacgtacgta gcgtacaaaa tgattgttcc
64321 tggtatatag ataaagagtc ctatatattt gaaaatcgtt acggctcgat taaactttaa
64381 tgattgcata gtgaatatat cattaggatt taatccttg actatcaggg cggcaccaga
64441 aattaccatc aaaagcatta atacagttat gcctatcgca gttagaacgg ttatagcatc
```

FIG. 23 CONT'D

64501 caccatttat atctaaaaat tagatcaaag aatatgtgac aaagtcctag ttgtatattg
64561 agaattgaca aaacaatgtt tcttacatat ttttttttta ttagtaaccg acttaatagt
64621 aggaactgga aaactagact tgattattct ataagtatag atacccttcc aaataatatt
64681 ctctttgata aaagttccag aaaatgtaga atttttaaaa aagttatctt ttgctattac
64741 caagattgtg tttagacgct tattattaat atgagtgatg aaatccacac cgcctctaga
64801 tatcgccttt atttccacat tagatggtaa atccaatagt gaaactatct ttttaggaat
64861 gtatggactc gcgtttagag gagtgaacgt cttgggcgtc ggaaaggatg attcgtcaaa
64921 cgaataaaca atttcacaaa tggatgttaa tgtattagta ggaaattttt tgacgctagt
64981 ggaattgaaa attctaatgg atgatgttct acctatttca tccgataaca tgttaatttc
65041 cgacaccaac ggttttaata tttcgatgat atacggtagt ctctctttcg gacttatata
65101 gcttattcca caatacgagt cattatatac tccaaaaaac aaaataacta gtataaaatc
65161 tgtatcgaat gggaaaaacg aaattatcga cataggtata gaatccggaa cattgaacgt
65221 attaatactt aattcttttt ctgtggtaag taccgatagg ttattgacat tgtatggttt
65281 taaatattct ataacttgag acttgataga tattagtgat gaattgaaaa ttatttttat
65341 caccacgtgt gtttcaggat catcgtcgac gcccgtcaac caaccgaacg gagtaaaata
65401 aatatcatta atatatgctc tagatattag tatttttatc aatcctttga ttatcatctt
65461 ctcgtaggcg aatgattcca tgatcaagag tgatttaaga acatcctccg gagtattaat
65521 gggcttagta aacagtccat cgttgcaata ataaaagtta tccaagttaa aggatattat
65581 gcattcgttt aaagatatca cctcatctga cggagacaat tttttggtag gttttagaga
65641 ctttgaaagt acttgtttaa caaagttatt catcgtcgtt tactattcta tttaattttg
65701 tagttaattt atcacatatc acattaattg actttttggt ccatttttcc atacgtttat
65761 attcttttaa tcctgcgtta tccgtttccg ttatatccag tgatagatcg tgcaggttaa
65821 atagaatgct cttaaataat gtcatttttt tatccgctaa aaatttaaag aatgtataaa
65881 cttttttcaa agatttaaaa cttttaggtg gtgtcctagt acacaatatc ataaacaaac
65941 taataaacat cccgcattca gattccaaca gctgattaac ttccacatta atacagccta
66001 ttttcgctcc aaatgtacat tcgaaaaatc tgaataaaac atcaatgtcg caatttgtat
66061 tatccaatac agaatgtttg tgattcgtgt taaaaccatc ggagaaggaa tagaaataaa
66121 aattattata gtggtggaat tcagttggaa tattgcctcc ggagtcataa aaggatacta
66181 aacattgttt tttatcataa attacacatt tccaatgaga caaataacaa aatccaaaca
66241 ttacaaatct agaggtagaa cttttaattt tgtctttaag tatatacgat aagatatgtt
66301 tattcataaa cgcgtcaaat ttttcatgaa tcgctaagga gtttaagaat ctcatgtcaa
66361 attgtcctat ataatccact tcggatccat aagcaaactg agagactaag ttcttaatac
66421 ttcgattgct catccaggct cctctctcag gctctatttt catcttgacg acctttggat
66481 tttcaccagt atgtattcct ttacgtgata aatcatcgat tttcaaatcc atttgtgaga
66541 agtctatcgc cttagatact tttttccgta gtcgaggttt aaagaaatac gctaacggta
66601 tactagtagg taactcaaaa acatcatata tagaatggta acgcgtcttt aactcgtcgg
66661 ttaactcttt cttttgatcg agttcgtcgc tactattggg tctgctcagg tgccccgact
66721 ctactagttc caacatcata ccgataggaa tacaagacac tttgccggcg gttgtagatt
66781 tatcatattt ttccactaca tatccgttac aatttgttaa aaatttagat acatctatat
66841 tgctacataa tccagctagt gaatatatat gacataataa attggtaaat cctagttctg
66901 gtattttact aattactaaa tctgtatatc tttccattta tcatggaaaa gaatttacca
66961 gatatcttct tttttccaaa ctgcgttaat gtattctctt acaaatattc acaagatgaa
67021 ttcagtaata tgagtaaaac ggaacgtgat agttttctat tggccgtgtt tccagttata
67081 aaacatagat ggcataacgc acacgttgta aaacataaag gaatatacaa agttagtaca
67141 gaagcacgtg gaaaaaaagt atctcctcca tcactaggaa aacccgcaca cataaacctа
67201 accgcgaagc aatatatata cagtgaacac acaataagct ttgaatgtta tagttttcta
67261 aaatgtataa caaatacaga aatcaattcg ttcgatgagt atatattaag aggactatta
67321 gaagctggta atagtttaca gatattttcc aattccgtag gtaaacgaac agatactata
67381 ggtgtactag ggaataagta tccatttagc aaaattccat tggcctcatt aactcctaaa
67441 gcacaacgag agatattttc agcgtggatt tctcatagac ctgtagtttt aactggagga
67501 actggagtgg gtaagacgtc acaggtaccc aagttattgc tttggtttaa ttatttattt
67561 ggtggattct ctactctaga taaaatcact aactttcacg aaagaccagt cattctatct
67621 cttcctagga tagctttagt tagattgcat agcaatacca ttttaaaatc attgggattt
67681 aaggtactag atggatctcc tatttcttta cggtacggat ctataccgga agaattaata
67741 aacaaacaac caaaaaaata tggaattgta ttttctaccc ataagttatc tctaacaaaa
67801 ctatttagtt atggcactct tattatagac gaagttcatg agcatgatca aataggagat
67861 attattatag cagtagcgag aaagcatcat acgaaaatag attctatgtt tttaatgact

FIG. 23 CONT'D


67921 gccacgttag aggatgaccg agaacggcta aaagtatttt tacctaatcc cgcatttata
67981 catattcctg gagatacact gtttaaaatt agcgaggtat ttattcataa taagataaat
68041 ccatcttcca gaatggcata catagaagaa gaaaagagaa atttagttac tgctatacag
68101 atgtatactc ctcctgatgg atcatccggt atagtctttg tggcatccgt tgcacagtgt
68161 cacgaatata aatcatattt agaaaaaaga ttaccgtatg atatgtatat tattcatggt
68221 aaggtcttag atatagacga aatattagaa aaagtgtatt catcacctaa tgtatcgata
68281 attatttcta ctccttattt ggaatccagc gttactatac gcaatgttac acacatttat
68341 gatatgggta aagtttttgt ccccgctcct tttggaggat cgcaagaatt tatttctaaa
68401 tctatgagag atcaacgaaa aggaagagta ggaagagtta atcctggtac atacgtctat
68461 ttctatgatc tgtcttatat gaagtctata cagcgaatag attcagaatt tctacataat
68521 tatatattgt acgctaataa gtttaatcta acactccccg aagatttgtt tataatccct
68581 acaaatttgg atattctatg gcgtacaaag gaatatatag actcgttcga tattagtaca
68641 gaaacatgga ataaattatt atccaattat tatatgaaga tgatagagta tgctaaactt
68701 tatgtactaa gtcctatttt cgctgaggag ttggataact ttgagaggac gggagaatta
68761 actagtattg tacgagaagc catttttatct ctaaatttac gaattaagat tttaaatttt
68821 aaacataaag atgatgatac gtatatacac ttttgtaaaa tattattcgg tgtctataac
68881 ggaacaaacg ctactatata ttatcataga cctctaacgg gatatatgaa tatgatttca
68941 gatactatat ttgttcctgt agataataac taaaaatcaa actctaatga ccacatcttt
69001 ttttagagat gaaaaatttt ctacatctcc ttttgtagac acgactaaac attttgcaaa
69061 aaaaagttta ttagtgttta gataatcgta tacttcatca gtgtagatag taaatgtgaa
69121 caaataaaag gtattcttac tcaatagatt ggtaaattcc atagaatata ttaatccttt
69181 cttcttgaga tcccacatca tttcaaccag agacgttta tccaatgatt tacctcgtac
69241 tataccacat acaaaactag attttgcagt gacgtcgtac ctggtattcc taccaaacaa
69301 aattttactt ttagttcttt tagaaaattc taaggtagaa tctctatttg ccaatatgtc
69361 atctatggaa ttaccactag caaaaaatga tagaaatata tattgataca tcgcagctgg
69421 ttttgatcta ctatacttta aaaacgaatc agattccata attgcctgta tatcatcagc
69481 tgaaaaacta tgttttacac gtattccttc ggcatttctt tttaatgata tatcttgttt
69541 agacaatgat aaagttatca tgtccatgag agacgcgtct ccgtatcgta taaatatttc
69601 attagatgtt agacgcttca ttaggggtat acttctataa ggtttcttaa tcagtccatc
69661 attggttgcg tcaagaacta ctatcggatg ttgttgggta tctctagtgt tacacatggc
69721 cttactaaag tttgggtaaa taactatgat atctctatta attatagatg catatatttc
69781 attcgtcaag gatattagta tcgacttgct atcgtcatta atacgtgtaa tgtaatcata
69841 taaatcatgc gatagccaag gaaaattcaa atagatgttc atcatataat cgtcgctata
69901 attcatatta atacgttgac attgactaat ttgtaatata gcctcgccac gaagaaagct
69961 ctcgtattca gtttcatcga taaaggatac cgttaaatat aactggttgc cgatagtctc
70021 atagtctatt aagtggtaag tttcgtacaa atacagaatc cctaaaatat tatctaatgt
70081 tggattaatc tttaccataa ctgtataaaa tggagacgga gtcataacta ttttaccgtt
70141 tgtacttact ggaatagacg aaggaataat ctccggacat gctggtaaag acccaaatgt
70201 ctgtttgaag aaatccaatg ttccaggtcc taatctctta acaaaaatta cgatattcga
70261 tcccgatatc ctttgcattc tatttaccag catatcacga actatattaa gattatctat
70321 catgtctatt ctcccaccgt tatataaatc gcctccgcta agaaacgtta gtatatccat
70381 acaatggaat acttcatttc taaaatagta ttcgttttct aattctttaa tgtgaaatcg
70441 tatactagaa agggaaaaat tatctttgag ttttccgtta gaaaagaacc acgaaactaa
70501 tgttctgatt gcgtccgatt ccgttgctga attaatggat ttacaccaaa aactcatata
70561 acttctagat gtagaagcat tcgctaaaaa attagtagaa tcaaaaggata taagtagatg
70621 ttccaacaag tgagcaattc ccaagatttc atctatatca ttctcgaatc cgaaattaga
70681 aattcccaag tagatatcct ttttcatccg atcgttgatg aaaatacgaa ctttattcgg
70741 taagacaatc atttactaag gagtaaaata ggaagtaatg ttcgtatgtc gttatcatcg
70801 tataaattaa aggtgtgttt tttaccatta agtgacatta taatttttacc aatattggaa
70861 ttataatata ggtgtatttg cgcactcgcg acggttgatg catcggtaaa tatagctgta
70921 tctaatgttc tagtcggtat ttcatcattt cgctgtctaa taatagcgtt ttctctatct
70981 gtttccatta cagctgcctg aagtttattg gtcggataat atgtaaaata ataagaaata
71041 catacgaata acaaaaataa aataagatat aataaagatg ccatttagag atctaatttt
71101 gttcaacttg tccaaattcc tacttacaga agatgaggaa tcgttggaga tagtgtcttc
71161 cttatgtaga ggatttgaaa tatcttatga tgacttgata acttacttcc cagataggaa
71221 ataccataaa tatatttcta aagtatttga acatgtagat ttatcggagg aattaagtat
71281 ggaattccat gatacaactt tgcgagattt agtctatctt agattgtaca agtattccaa

FIG. 23 CONT'D

71341 gtgtatacgg ccgtgttata aattaggaga taatctaaaa ggcatagttg ttataaagga
71401 caggaatatt tatattaggg aagcaaatga tgacttgata gaatatctcc tcaaggaata
71461 cactcctcag atttatacat attctaatga gcgcgtcccc ataactggtt caaaattaat
71521 tctttgtgga ttttctcaag ttacatttat ggcgtataca acgtcgcata taacaacaaa
71581 taaaaaggta gatgttctcg tttccaaaaa atgtatagat gaactagtcg atccaataaa
71641 ttatcaaata cttcaaaatt tatttgataa aggaagcgga acaataaaca aaatactcag
71701 gaagatattt tattcggtaa caggtggcca aactccatag gtagcttttt ctatttcgga
71761 ttttagaatt tccaaattca ccagcgattt atctgttttg gtgaaatcca aggatttatt
71821 aatgtccaca aatgccattt gttttgtctg tggattgtat ttgaaaatgg aaacgatgta
71881 gttagataga tgcgctgcga agtttcctat tagggttccg cgcttcacgt cacccagcat
71941 acttgaatca ccatccttta aaaaaaatga taagatatca acatggagta tatcatactc
72001 ggattttaat tcttctactg catcactgac attttcacaa atactacaat acggtttacc
72061 gaaaataatc agtacgttct tcatttatgg gtatcaaaaa cttaaaatcg ttactgctgg
72121 aaaataaatc actgacgata ttagatgata atttatacaa agtatacaat ggaatatttg
72181 tggatacaat gagtatttat atagccgtcg ccaattgtgt cagaaactta gaagagttaa
72241 ctacggtatt cataaaatac gtaaacggat gggtaaaaaa gggagggcat gtaacccttt
72301 ttatcgatag aggaagtata aaaattaaac aagacgttag agacaagaga cgtaaatatt
72361 ctaaattaac caaggacaga aaaatgctag aattagaaaa gtgtacatcc gaaatacaaa
72421 atgttaccgg atttatggaa gaagaaataa aggcagaaat gcaattaaaa atcgataaac
72481 tcacatttca aatatattta tctgattctg ataacataaa aatatcattg aatgagatac
72541 taacacattt caacaataat gagaatgtta cattatttta ttgtgatgaa cgagacgcag
72601 aattcgttat gtgtctcgag gctaaaacac atttctctac cacaggagaa tggccgttga
72661 taataagtac cgatcaggat actatgctat ttgcatctgc tgataatcat cctaagatga
72721 taaaaaactt aactcaactg tttaaatatg ttccatctgc agaggataac tatttagcaa
72781 aattaacggc gttagtgaat ggatgtgatt tctttcctgg actctatggg gcatctataa
72841 cacccaacaa cttaaacaaa atacaattgt ttagtgattt tacaatcgat aatatagtca
72901 ctagtttggc aattaaaaat tattatagaa agactaactc taccgtagac gtgcgtaata
72961 ttgttacgtt tataaacgat tacgctaatt tagacgatgt ctactcgtat attcctcctt
73021 gtcaatgcac tgttcaagaa tttatatttt ccgcattaga tgaaaaatgg aatgaattta
73081 aatcatctta tttagaaagc gtgccgttac cctgccaatt aatgtatgcg ttagaaccac
73141 gcaaggagat tgatgtttca gaagttagaa ctttatcatc ttatatagat ttcgaaaata
73201 ctaaatcaga tatcgatgtt ataaaatcta tatcctcgat cttcggatat tctaacgaaa
73261 actgtaacac gatagtattc ggcatctata aggataattt actactgagt ataaatagtt
73321 cattttactt taacgatagt ctgttaataa ccaatactaa aagtgataat ataataaata
73381 taggttacta gattaaaaat ggtgttccaa atcgtgtgct ctacgtgcgg caaagatatt
73441 tctcacgaac gatataaatt gattatacga aaaaaatcat taaaggatgt actcgtcagt
73501 gtaaagaacg aatgttgtag gttaaaatta tctacacaaa tagaacctca acgtaactta
73561 acagtgcaac ctctattgga tataaactaa tatggatccg gttaatttta tcaagacata
73621 tgcgcctaga ggttctatta tttttattaa ttataccatg tcattaacaa gtcatttgaa
73681 tccatcgata gaaaaacatg tgggtattta ttatggtacg ttattatcgg aacacttggt
73741 agttgaatca acatatagaa aaggagttcg aatagtccca ttggatagtt ttttgaagg
73801 atatcttagt gcaaaagtat acatgttaga gaatattcaa gttatgaaaa tagcagctga
73861 tacgtcatta actttattgg gtattccgta tggatttggt catgatagaa tgtattgttt
73921 taaattggta gctgactgtt ataaaaatgc cggtattgat acatcgtcta aacgaatatt
73981 aggtaaagat attttctgta gccaaaactt cacagacgat aatagatgga taaagatata
74041 tgattctaat aatttaacat tttggcaaat tgattacctt aaagggtgag ttaatatgca
74101 taactactcc tccgttgttt tttccctcgt tctttttctt aacgttgttt gccatcactc
74161 tcataatgta aagatattct aaaatggtaa acttttgcat atcggacgca gaaattggta
74221 taaatgttgt aattgtatta tttcccgtca atggactagt cacagctcca tcagttttat
74281 atcctttaga gtatttctca ctcgtgtcta acattctaga gcattccatg atctgtttat
74341 cgttgatatt ggccggaaag atagattttt tatttttttat tatattacta ttggcaattg
74401 tagatataac ttctggtaaa tatttttcta cctttttcaat ctcttctatt ttcaagccgg
74461 ctatatattc tgctatattg ttgctagtat caataccttt tctggctaag aagtcatatg
74521 tggtattcac tatatcagtt ttaactggta gttccattag cctttccact tctgcagaat
74581 aatcagaaat tggttcttta ccagaaaatc cagctactat aataggctca ccgatgatca
74641 ttggcaaaat cctatatttgt accagattaa tgagagcata tttcatttcc aataattctg
74701 ctagttcttg agacattgat ttatttgatg aatctagttg gttctctaga tactctacca

FIG. 23 CONT'D

```
74761 tttctgccgc atacaataac ttgttagata aaatcagggt tatcaaagtg tttagcgtgg
74821 ctagaatagt gggcttgcat gtattaaaga atgcggtagt atgagtaaac cgttttaacg
74881 aattatatag tctccagaaa tctgtggcgt tacatacatg agccgaatga catcgaagat
74941 tgtccaatat ttttaatagc tgctctttgt ccattatttc tatatttgac tcgcaacaat
75001 tgtagatacc attaatcacc gattcctttt tcgatgccgg acaatagcac aattgtttag
75061 ctttggactc tatgtattca gaattaatag atatatctct taatacagat tgcactatac
75121 attttgaaac tatgtcaaaa attgtagaac gacgctgttc tgcagccatt taactttaaa
75181 taatttacaa aaatttaaaa tgagcatccg tataaaaatc gataaactgc gccaaattgt
75241 ggcatatttt tcagagttca gtgaagaagt atctataaat gtagactcga cggatgagtt
75301 aatgtatatt tttgccgcct tgggcggatc tgtaaacatt tgggccatta tacctctcag
75361 tgcatcagtg ttctaccgcg gagccgaaaa tattgtgttt aatcttcctg tgtccaaggt
75421 aaaatcgtgt ttgtgtagtt ttcacaatga tgccatcata gatatagaac ctgattctgga
75481 aaataatcta gtaaaacttt ctagttatca tgtagtaagt gtcgattgta ataaggaact
75541 gatgcctatt aggacagata ctactatttg tctaagtata gatcaaaaga aatcttacgt
75601 gtttaatttt cacaagtatg aagaaaaatg ttgtggtaga accgtcattc atttagaatg
75661 gttgttgggc tttatcaagt gtattagtca gcatcagcat ttggctatta tgtttaaaga
75721 tgacaatatt attatgaaga ctcctggtaa tactgatgca ttttccaggg aatattctat
75781 gactgaatgt tctcaagaac tacaaaagtt ttctttcaaa atagctatct cgtctctcaa
75841 caaactacga ggattcaaaa agagagtcaa tgtttttgaa actagaatcg taatggataa
75901 tgacgataac attttaggaa tgttgttttc ggatagagtt caatccttta agatcaacat
75961 ctttatggcg tttttagatt aatactttca atgagataaa tatgggtggc ggagtaagtg
76021 ttgagctccc taaacgggat ccgcctccgg gagtacccac tgatgagatg ttattaaacg
76081 tggataaaat gcatgacgtg atagctcccg ctaagctttt agaatatgtg catataggac
76141 cactagcaaa agataaagag gataaagtaa agaaaagata tccagagttt agattagtca
76201 acacaggacc cggtggtctt tcggcattgt taagacaatc gtataatgga accgcaccca
76261 attgctgtcg cacttttaat cgtactcatt attggaagaa ggatggaaag atatcagata
76321 agtatgaaga gggtgcagta ttagaatcgt gttggccaga cgttcacgac accggaaaat
76381 gcgatgttga tttattcgac tggtgtcagg gggatacgtt cgatagaaac atatgccatc
76441 agtggatcgg ttcagccttt aataggagta atagaactgt agagggtcaa caatcgttaa
76501 taaatctgta taataagatg caaacattat gtagtaaaga tgctagtgta ccaatatgtg
76561 aatcattttt gcatcattta cgcgcacaca atacagaaga tagcaaagag atgatcgatt
76621 atattctaag acaacagtct gcggacttta aacagaaata tatgagatgt agttatccca
76681 ctagagataa gttagaagag tcattaaaat atgcggaacc tcgagaatgt tgggatccag
76741 agtgttcgaa tgccaatgtt aatttcttgc taacacgtaa ttataataat ttaggacttt
76801 gcaatattgt acgatgtaat actagcgtga acaacttaca gatggataaa acttcctcat
76861 taagattgtc atgtggatta agcaatagtg atagatttte tactgttccc gtcaatagag
76921 caaaagtagt tcaacataat attaaacact cgttcgacct aaaattgcat ttgatcagtt
76981 tattatctct cttggtaata tggatactaa ttgtagctat ttaaatgggt gccgcggcaa
77041 gcatacagac gacggtgaat acactcagcg aacgtatctc gtctaaatta gaacaagaag
77101 cgaatgctag tgctcaaaca aaatgtgata tagaaatcgg aaatttttat atccgacaaa
77161 accatggatg taacctcact gttaaaaata tgtgctctgc ggacgcggat gctcagttgg
77221 atgctgtgtt atcagccgct acagaaacat atagtggatt aacaccggaa caaaaagcat
77281 acgtgccagc tatgtttact gctgcgttaa acattcagac gagtgtaaac actgttgtta
77341 gagattttga aaattatgtg aaacagactt gtaattctag cgcggtcgtc gataacaaat
77401 taaagataca aaacgtaatc atagatgaat gttacggagc cccaggatct ccaacaaatt
77461 tggaatttat taatacagga tctagcaaag gaaattgtgc cattaaggcg ttgatgcaat
77521 tgacgactaa ggccactact caaatacgac ctaaacaagt tgctggtaca ggagttcagt
77581 tttatatgat tgtttatcggt gttataatat tggcagcgtt gtttatgtac tatgccaagc
77641 gtatgttgtt cacatccacc aatgataaaa tcaaacttat tttagccaat aaggaaaacg
77701 tccattggac tacttacatg gacacattct ttagaacttc tccgatggtt attgctacca
77761 cggatatgca aaactgaaaa tatattgata atattttaat agattaacat ggaagttatc
77821 actgatcgtc tagacgatat agtgaaacaa aatatagcgg atgaaaaatt tgtagatttt
77881 gttatacacg gtctagagca tcaatgtcct gctatacttc gaccattaat tagggttgtt
77941 attgatatac tattatttgt tatagtaatt tatatttttа cggtacgtct agtaagtaga
78001 aattatcaaa tgttgttggc gttggtggcg ctagtcatca cattaactat tttttattac
78061 tttatactat aatagtacta gactgacttc taacaaacat ctcacctgcc ataaataaat
78121 gcttgatatt aaagtcttct atttctaaca ctattccatc tgtggaaaat aatactctga
```

FIG. 23 CONT'D

78181 cattatcgct aattgacaca tcggtgagtg atatgcctat aaagtaataa tctttctttgg
78241 gcacatatac cagtgtacca ggttctaaca acctatttac tggtgctcct atagcatact
78301 ttttctttac cttgagaata tccatcgttt gcttggtcaa tagcgatatg tgatttttta
78361 tcaaccactc gaaaaagtaa ttggagtgtt catatcctct acgggctatt gtctcatggc
78421 cgtgtatgaa atttaagtaa cacgactgtg gtagatttgt tctatagagc cggttgccgc
78481 aaatagatag aactaccaat atgtctgtac aaatgttaaa cattaattga ttaacagaaa
78541 aaacaatgtt cgttctggga atagaaacca gatcaaaaca aaattcgtta gaatatatgc
78601 cacgtttata cattgaatat aaaataacta cagtttgaaa aataacagta tcatttaaac
78661 atttaacttg cggggttaat ctcacaactt tactgttttt gaactgttca aaatatagca
78721 tagatccgtg agaaatacgt ttagccgcct ttaatagagg aaatcccacc gcctttctgg
78781 atctcaccaa cgacgatagt tctgaccagc aactcatttc ttcatcatcc acctgtttta
78841 acatataata ggcaggagat agatatccgt cattgcaata ttccttctcg taggcacaca
78901 atctaatatt gataaaatct ccattctctt ctctgcattt attatcttgt ttcggtggct
78961 gattaggctg tagtcttggt ttaggctttg gtatatcgtt gttgaatcta ttttggtcat
79021 taaatctttc atttcttcct ggtatatttt tatcaccttg tttggttgga tttttgtcta
79081 tattatcgtt tgtaacatcg gtacgggtat tcatttatca caaaaaaaac ttctctaaat
79141 gagtctactg ctagaaaacc tcatcgaaga agataccata ttttttgcag gaagtatatc
79201 tgagtatgat gatttacaaa tggttattgc cggcgcaaaa tccaaatttc caagatctat
79261 gctttctatt tttaatatag tacctagaac gatgtcaaaa tatgagttgg agttgattca
79321 taacgaaaat atcacaggag caatgtttac cacaatgtat aatataagaa acaatttggg
79381 tctaggagat gataaactaa ctattgaagc cattgaaaac tatttcttgg atcctaacaa
79441 tgaagttatg cctcttatta ttaataatac ggatatgact gccgtcattc ctaaaaaaag
79501 tggtaggaga aagaataaga acatggttat cttccgtcaa ggatcatcac ctatcttgtg
79561 tattttcgaa actcgtaaaa agattaatat ttataaagaa aatatggaat ccgcgtcgac
79621 tgagtataca cctatcggag acaacaaggc tttgatatct aaatatgcgg gaattaatat
79681 cctaaatgtg tattctcctt ccacatccat aagattgaat gccatttacg gattcaccaa
79741 taaaaataaa ctagagaaac ttagtactaa taaggaacta gaatcgtata gttctagccc
79801 tcttcaagaa cccattaggt taaatgattt tctgggacta ttggaatgtg ttaaaaagaa
79861 tattcctcta acagatattc cgacaaagga ttgattacta taaatggaga atgttcctaa
79921 tgtatacttt aatcctgtgt ttatagagcc cacgtttaaa cattctttat taagtgttta
79981 taaaacacaga ttaatagttt tatttgaagt attcgttgta ttcattctaa tatatgtatt
80041 ttttagatct gaattaaata tgttcttcat gcctaaaacga aaaatacccg atcctattga
80101 tagattacga cgtgctaatc tagcgtgtga agacgataaa ttaatgatct atggattacc
80161 atggatgaca actcaaacat ctgcgttatc aataaatagt aaaccgatag tgtataaaga
80221 ttgtgcaaag cttttgcgat caataaatgg atcacaacca gtatctctta acgatgttct
80281 tcgcagatga tgattcattt tttaagtatt tggctagtca agatgatgaa tcttcattat
80341 ctgatatatt gcaaatcact caatatctag actttctgtt attattattg atccaatcaa
80401 aaaataaatt agaagccgtg ggtcattgtt atgaatctct ttcagaggaa tacagacaat
80461 tgacaaaatt cacagacttt caagatttta aaaaactgtt taacaaggtc cctattgtta
80521 cagatggaag ggtcaaactt aataaaggat atttgttcga ctttgtgatt agtttgatgc
80581 gattcaaaaa agaatcctct ctagctacca ccgcaatagg tcctgttaga tacatagatc
80641 ctcgtcgcaa tatcgcattt tctaacgtga tggatatatt aaagtcgaat aaagtgaaca
80701 ataattaatt ctttattgtc atcatgaacg gcggacatat tcagttgata atcggcccca
80761 tgttttcagg taaaagtaca gaattaatta gacgagttag acgttatcaa atagctcaat
80821 ataaatgcgt gactataaaa tattctaacg ataatagata cggaacggga ctatggacgc
80881 atgataagaa taattttgaa gcattggaag caactaaact atgtgatgtc ttggaatcaa
80941 ttacagattt ctccgtgata ggtatcgatg aaggacagtt ctttccagac attgttgaat
81001 tctgtgagcg tatggcaaac gaaggaaaaa tagttatagt agccgcactc gatgggacat
81061 ttcaacgtaa accgtttaat aatattttga atcttattcc attatctgaa atggtggtaa
81121 aactaactgc tgtgtgtatg aaatgcttta aggaggcttc cttttctaaa cgattgggtg
81181 aggaaaccga gatagaaata ataggaggta atgatatgta tcaatcggtg tgtagaaagt
81241 gttacatcga ctcataatat tatatttttt atctaaaaaa ctaaaaataa acattgatta
81301 aattttaata taatacttaa aaatggatgt tgtgtcgtta gataaaccgt ttatgtattt
81361 tgaggaaatt gataatgagt tagattacga accagaaagt gcaaatgagg tcgcaaaaaa
81421 actgccgtat caaggacagt taaaactatt actaggagaa ttatttttttc ttagtaagtt
81481 acagcgacac ggtatattag atggtgccac cgtagtgtat ataggatctg ctcccggtac
81541 acatatacgt tatttgagag atcatttcta taatttagga gtgatcatca aatggatgct

FIG. 23 CONT'D

81601 aattgacggc cgccatcatg atcctatttt aaatggattg cgtgatgtga ctctagtgac
81661 tcggttcgtt gatgaggaat atctacgatc catcaaaaaa caactgcatc cttctaagat
81721 tattttaatt tctgatgtga gatccaaacg aggaggaaat gaacctagta cggcggattt
81781 actaagtaat tacgctctac aaaatgtcat gattagtatt ttaaaccccg tggcgtctag
81841 tcttaaatgg agatgcccgt ttccagatca atggatcaag gacttttata tcccacacgg
81901 taataaaatg ttacaacctt ttgctccttc atattcagct gaaatgagat tattaagtat
81961 ttatacoggt gagaacatga gactgactcg agttaccaaa tcagacgctg taaattatga
82021 aaaaaagatg tactacctta ataagatcgt ccgtaacaaa gtagttgtta actttgatta
82081 tcctaatcag gaatatgact attttcacat gtactttatg ctgaggaccg tgtactgcaa
82141 taaaacattt cctactacta aagcaaaggt actatttcta caacaatcta tatttcgttt
82201 cttaaatatt ccaacaacat caactgaaaa agttagtcat gaaccaatac aacgtaaaat
82261 atctagcaaa aattctatgt ctaaaaacag aaatagcaag agatccgtac gcagtaataa
82321 atagaaacgt actactgaga tatactaccg atatagagta taatgattta gttactttaa
82381 taaccgttag acataaaatt gattctatga aaactgtgtt tcaggtattt aacgaatcat
82441 ccataaatta tactccggtt gatgatgatt atggagaacc aatcattata acatcgtatc
82501 ttcaaaaagg tcataacaag tttcctgtaa attttctata catagatgtg gtaatatctg
82561 acttatttcc tagctttgtt agactagata ctacagaaac taatatagtt aatagtgtac
82621 tacaaacagg cgatggtaaa aagactcttc gtcttcccaa aatgttagag acggaaatag
82681 ttgtcaagat tctctatcgc cctaatatac cattaaaaat tgttagattt ttccgcaata
82741 acatggtaac tggagtagag atagccgata gatctgttat ttcagtcgct gattaatcaa
82801 ttagtagaga tgagataaga acattataat aatcaataat atatcttata tctcgtttag
82861 aaaaatgcta atattaaaat agctaacgct agtaatccaa tcggaagcca tttgatatct
82921 ataatagggt atctaatttc ctgattcaga tagcggacag ctatattctc ggtagctact
82981 cgtttggaat cacaaacatt atttacatct aatttactat ctgtaatgga aacgtttccc
83041 aatgaaatgg tacaatccga tacattgcat tttgttatat tttttttaa agaggctggt
83101 aacaacgcat cgcttcgttt acatggctcg taccaacaat aatagggtaa tcttgtatct
83161 attcctatcc gtactatgct tttatcagga taaatacatt tacatcgtat atcgtctttg
83221 ttagcatcac agaatgcata aatttgttcg tccgtcatga taaaaattta aagtgtaaat
83281 ataactatta tttttatagt tgtaataaaa agggaaattt gattgtatac cttcggttct
83341 ttaaaagaaa ctgacttgat aaaaatggct gtaatcttta aggttacgta tagtctatat
83401 gatcaaaaag agattaatgc tacagatatt atcattagtc atgttaaaaa tgacgacgat
83461 atcggtaccg ttaaagatgg tagactaggt gctatggatg gggcattatg taagacttgt
83521 gggaaaacgg aattggaatg tttcggtcac tggggtaaag taagtattta taaaactcat
83581 atagttaagc ctgaatttat ttcagaaatt attcgtttac tgaatcatat atgtattcac
83641 tgcggattat tgcgttcacg agaacogtat tccgacgata ttaacctaaa agagttatcg
83701 ggacacgctc ttaggagatt aaaggataaa atattatcca agaaaaagtc atgttggaac
83761 agtgaatgta tgcaaccgta tcaaaaaatt acttttcaa agaaaaaggt ttgtttcgtc
83821 aacaagttgg atgatattaa cgttcctaat tctctcatct atcaaaagtt aatttctatt
83881 catgaaaagt tttggccatt attagaaatt catcaatatc cagctaactt attttatata
83941 gactactttc ccatcoctcc gttgattatt agaccggcta ttagtttttg gatagatagt
84001 atacccaaag aaaccaatga attaacttac ttattaggta tgatcgttaa gaattgtaac
84061 ttgaatgctg atgaacaggt tatccagaag gcggtaatag aatacgatga tattaaaatt
84121 atttctaata acacttccag tatcaattta tcatatatta catccggcaa aaataatatg
84181 attagaagtt atatcgtcgc ccgacgaaaa gatcagacgg ctagatctgt aattggtccc
84241 agtacatcta tcaccgttaa tgaggtagga atgccccgat atattagaaa tacacttaca
84301 gaaaagatat ttgttaatgc ctttacagtg gataaagtta aacaactatt agcatcaaac
84361 caagttaaat tttacttaa taaacgatta aaccaattaa caagaatacg ccaaggaaag
84421 tttatcaaaa ataaaatata tttattgcct ggtgattggg tagaagtagc tgttcaagaa
84481 tatacaagta ttatttttgg aagacagccg tctctacata gatacaacgt catcgcttca
84541 tctatcagag ctaccgaagg agatactatc aaaatatctc ccggaattgc caactctcaa
84601 aatgctgatt tcgacggaga tgaagaatgg atgatattag aacaaaatcc taaagctgta
84661 attgaacaaa gtattcttat gtatccgacg acgttactca aacacgatat tcatggagcc
84721 cccgtttatg gatctattca agatgaaatc gtagcagcgt attcattgtt taggatacaa
84781 gatcttttgtt tagatgaagt attgaacatc ttggggaaat atggaagaga gttcgatcct
84841 aaaggtaaat gtaaattcag cggtaaagat atctatactt acttgatagg tgaaaagatt
84901 aattatccgg gtctcttaaa ggatggtgaa attattgcaa acgacgtaga tagtaatttt
84961 gttgtggcta tgaggcatct gtcattggct ggactcttat ccgatcataa gtcgaacgtg

FIG. 23 CONT'D

85021 gaaggtatca actttattat caagtcatct tatgttttta agagatatct atctatttac
85081 ggttttgggg tgacattcaa agatctgaga ccaaattcga cgttcactaa taaattggag
85141 gccatcaacg tagaaaaaat agaacttatc aaagaagcat acgccaaata tctcaacgat
85201 gtaagagacg ggaaaatagt tccattatct aaagctttag aggcggacta tgtggaatcc
85261 atgttatcca acttgacaaa tcttaatatc cgagagatag aagaacatat gagacaaacg
85321 ctgatagatg atccagataa taacctcctg aaaatggcca aagcgggtta taaagtaaat
85381 cctacagaac taatgtatat tctaggtacg tatggacaac aaaggattga tggtgaacca
85441 gcagagactc gagtattggg tagagtctta ccttactatc ttccagactc taaggatcca
85501 gaaggaagag gttacattct taatttttta acaaaaggat taacaggttc tcaatattac
85561 ttttcgatgc tggttgcaag atctcaatct actgatatcg tctgtgaaac atcacgtacc
85621 ggaacactgg ctagaaaaat cattaaaaag atggaggata tggtggtcga cggatacgga
85681 caagtagtta taggtaatac gctcatcaag tacgccgcca attataccaa aattctaggc
85741 tcagtatgta aacctgtaga tcttatctat ccagatgagt ccatgacttg gtatttggaa
85801 attagtgctc tgtggaataa aataaaacag ggattcgttt actctcagaa acagaaactt
85861 gcaaagaaga cattggcgcc gtttaatttc ctagtattcg tcaaacccac cactgaggat
85921 aatgctatta aggttaagga tctgtacgat atgattcata acgtcattga tgatgtgaga
85981 gagaaatact tctttacggt atctaatata gattttatgg agtatatatt cttgacgcat
86041 cttaatcctt ctagaattag aattacaaaa gaaacggcta tcactatctt tgaaaagttc
86101 tatgaaaaac tcaattatac tctaggtggt ggaactccta ttggaattat ttctgcacag
86161 gtattgtctg agaagtttac acaacaagcc ctgtccagtt ttcacactac tgaaaaaagt
86221 ggtgccgtca aacaaaaact tggtttcaac gagtttaata acttgactaa tttgagtaag
86281 aataagaccg aaattatcac tctggtatcc gatgatatct ctaaacttca atctgttaag
86341 attaatttcg aatttgtatg tttgggagaa ttaaatccag acatcactct tcgaaaagaa
86401 acagataggt atgtagtaga tataatagtc aatagattat acatcaagag agcagaaatt
86461 accgaattag tcgtcgaata tatgattgaa cgattcatct cctttagcgt cattgtaaag
86521 gaatggggta tggaaacatt cattgaggac gaggataata ttagatttac tgtctatcta
86581 aatttcgttg aaccagagga attgaatctt agtaagttta tgatggttct tccgggggca
86641 gccaacaagg gaaagattag taaattcaag attcctatct ctgattatac gggttatgac
86701 gacttcaatc aaacaaaaaa gctcaataag atgactgtag aactcatgaa tctaaaagaa
86761 ttaggttctt tcgatttgga aaacgtcaac gtgtatcctg gagtatggaa tacatacgat
86821 atcttcggta tcgaggccgc tcgtgaatac ttgtgcgaag ccatgttaaa cacctatgga
86881 gaagggttcg attatctgta tcagccttgt gatcttctcg ctagtttact atgtgctagt
86941 tacgaaccag aatcagtgaa taaattcaag ttcggcgcag ctagtactct taagagagct
87001 acgttcggag acaataaagc attgttaaac gcggctcttc ataaaaagtc agaacctatt
87061 aacgataata gtagctgcca cttttttagc aaggtcccta atataggaac tggatattac
87121 aaatacttta tcgacttggg tctttctcatg agaatggaaa ggaaactatc tgataagata
87181 tcttctcaaa agatcaagga aatggaagaa acagaagact tttaattctt atcaataaca
87241 tatttttcta tgatctgtct tttaaacgat ggattttcca caaatgcgcc tctcaagtcc
87301 ctcatagaat gatacacgta taaaaaatat agcataggca atgactcctt atttttagac
87361 attagatatg ccaaaatcat agcccgcgtt ctatttactc ccgcagcaca atgaaccaac
87421 acgggctcgt ttcgttgatc acatttagat aaaaaggcgg ttacgtcgtc aaaatatttta
87481 ctaatatcgg tagttgtatc atctaccaac ggtatatgaa taatattaat attagagtta
87541 ggtaatgtat atttatccat cgtcaaattt aaaacatatt tgaacttaac ttcagatgat
87601 ggtgcatcca tagcattttt ataatttccc aaatacacat tattggttac cttgtcatt
87661 atagtgggag atttggctct gtgcatatct ccagttgaac gtagtagtaa gtatttatac
87721 aaacttttct tatccattta taacgtacaa atggataaaa ctactttatc ggtaaacgcg
87781 tgtaatttag aatacgttag agaaaaggct atagtaggcg tacaagcagc caaaacatca
87841 acacttatat tctttgttat tatattggca attagtgcgc tattactctg gtttcagacg
87901 tctgataatc cagtctttaa tgaattaacg agatatatgc gaattaaaaa tacggttaac
87961 gattggaaat cattaacgga tagcaaaaca aaattagaaa gtgatagagg tagacttcta
88021 gccgctggta aggatgatat attcgaattc aaatgtgtgg atttcggcgc ctattttata
88081 gctatgcgat tggataagaa aacatatctg ccgcaagcta ttaggcgagg tactggagac
88141 gcgtggatgg ttaaaaaggc ggcaaaggtc gatccatctg ctcaacaatt ttgtcagtat
88201 ttgataaaac acaagtctaa taatgttatt acttgtggta atgagatgtt aaatgaatta
88261 ggttatagcg gttatttttat gtcaccgcat tggtgttccg attttagtaa tatggaatag
88321 tgttagataa atgcggtaac gaatgttcct gtaaggaacc ataacagttt agatttaacg
88381 ttaaagatga gcataaacat aataaacaaa attacaatca aacctataac attaatatca

FIG. 23 CONT'D

88441 aacaatccaa aaaatgaaat cagtggagta gtaaacgcgt acataactcc tggataacgt
88501 ttagtagctg ccgttcctat tctagaccaa aaattcggtt tcatgttttc gaaacggtgt
88561 tctgcaacaa gtcggggatc gtgttctaca tatttggcgg cattatccag tatctgccta
88621 ttgatcttca tttcgttttc aattctggct atttcaaaat aaaatcccga tgatagacct
88681 ccagacttta taatttcatc tacgatgttc agcgccgtag taactctaat aatataggct
88741 gataagctaa catcataccc tcctgtatat gtgaatatgg catgattttt gtccattaca
88801 agctcggttt taactttatt gcctgtaata atttctctca tctgtaggat atctattttt
88861 ttgtcatgca ttgccttcaa gacgggacga agaaacgtaa tatcctcaat aacgttatcg
88921 ttttctacaa taactacata ttctaccttt ttatttttcta actcggtaaa aaaattagaa
88981 tcccataggg ctaaatgtct agcgatattt cttttcgttt cctctgtaca catagtgtta
89041 caaaaccctg aaaagaagtg agtatacttg tcatcatttc taatgtttcc tccagtccac
89101 tgtataaacg cataatcctt gtaatgatct ggatcatcct tgactaccac aacatttctt
89161 ttttctggca taacttcgtt gtcctttaca tcatcgaact tctgatcatt aatatgctca
89221 tgaacattag gaaatgtttc tgatggaagt ctatcaataa ctggcacaac aataacagga
89281 gttttcgccg ccgccattta gttattgaaa ttaatcatat acaactcttt aatacgagtt
89341 atattttcgt ctatccattg tttcacattt acatatttcg acaaaaagat ataaaatgcg
89401 tattccaatg cttctctgtt taatgaatta ctaaaatata caaacacgtc actgtctggc
89461 aataaatgat atcttagaat attgtaacaa tttatttttgt attgcacatg ttcgtgatct
89521 atgagttctt cttcgaatgg cataggatct ccgaatctga aaacgtataa ataggagtta
89581 gaataataat atttgagagt attggtaata tataaactct ttagcggtat aattagtttt
89641 tttctctcaa tttctatttt tagatgtgat ggaaaaatga ctaattttgt agcattagta
89701 tcatgaactc taatcaaaat cttaatatct tcgtcacacg ttagctcttt gaagttttta
89761 agagatgcat cagttggttc gaccgatgga gtaggtgcaa caatttttttg ttcgatgtat
89821 gtatgtactg gagccattgt tttaactata atggtgcttg tatcgaaaaa ctttaatgca
89881 gatagcggaa gctcttcgcc gcgactttct acatcgtaat tgggttctaa cgccgatctc
89941 tgaatggata ctagttttct aagttctaat gtgattcttt gaaaatgtaa atccaattcc
90001 tccggcatta tagatgtgta tacatcggta aataaaacta tagtatccaa cgatcccttc
90061 tcgcaaattc tagtcttaac caaaaaatcg tatataacca cggagatggc gtatttaaga
90121 gtggattctt ctaccgtttt gttcttggat gtcatactagg aaactataaa gtccgcacta
90181 ctgttaagaa tgattactaa cgcaactata tagttcaaat taagcatttt ggaaacataa
90241 aataactctg tagacgatac ttgacttccg aataagtttg cagacaaacg aagaaagaac
90301 agacctctct taatttcaga agaaaacttt ttttcgtatt cctgacgtct agagtttata
90361 tcaataagaa agttaagaat tagtcggtta atgttgtatt tcattaccca agtttgagat
90421 ttcataatat tatcaaaaga catgataata ttaaagataa agcgctgact atgaacgaaa
90481 tagctatatg gttcgctcaa aaatatagtc ttgttaaacg tggaaacgat aactgtattt
90541 ttaatcacgt cagcggcatc taaattaaat ataggtatat ttattccaca cactctacaa
90601 tatgccacac catcttcata ataaataaat tcgttagcaa aattattaat tttagtgaaa
90661 tagttagcgt caactttcat agcttccttc aatctaattt gatgctcaca cggtgcgaat
90721 tccactctaa catcccttct ccatgcctca ggttcatcga tctctataat atctagtttt
90781 ttgcgtttca caaacacagg ctcgtctctc gcgatgagat ctgtatagta actatgtaaa
90841 tgataactag atagaaagat gtagctatat agatgacgat cctttaagag aggtataata
90901 actttacccc aatcagatag actgttgtta tggtcttcgg aaaaagaatt tttataaatt
90961 tttccagtat tttccaaata tacgtactta acatctaaaa aatccttaat gataatagga
91021 atggataatc cgtctatttt ataaagaaat acatatcgca cattatactt ttttttggaa
91081 atgggaatac cgatgtgtct acataaatat gcaaagtcta aatatttttt agagaatctt
91141 aattggtcca aattcttttc caagtacggt aatagatttt tcatattgaa cggtatcttc
91201 ttaatctctg gttctagttc cgcattaaat gatgaaacta agtcactatt tttataacta
91261 acgattacat cacctctaac atcatcattt accagaatac tgatcttctt ttgtcgtaaa
91321 tacatgtcta atgtgttaaa aaaaagatca tacaagttat acgtcatttc atctgtggta
91381 ttcttgtcat tgaaggataa actcgtacta atctcttctt taacagcctg ttcaaatttа
91441 tatcctatat acgaaaaaat agcaaccagt gtttgatcat ccgcgtcaat attctgttct
91501 atcgtagtgt ataacaatcg tatatcttct tctgtgatag tcgatacgtt ataaaggttg
91561 ataacgaaaa tatttttatt tcgtgaaata aagtcatcgt aggattttgg acttatattc
91621 gcgtctagta gatatgcttt tatttttgga atgatctcaa ttagaatagt ctctttagag
91681 tccatttaaa gttacaaaca actaggaaat tggtttatga tgtataattt ttttagtttt
91741 tatagattct ttattctata cttaaaaaat gaaaataaat acaaaggttc ttgagggttg
91801 tgttaaattg aaagcgagaa ataatcataa attatttcat tatcgcgata tccgttaagt

FIG. 23 CONT'D

```
91861 ttgtatcgta atggcgtggt caattacaaa taaagcggat actagtagct tcacaaagat
91921 ggctgaaatc agagctcatc taaaaaatag cgctgaaaat aaagataaaa acgaggatat
91981 tttcccggaa gatgtaataa ttccatctac taagcccaaa accaaacgag ccactactcc
92041 tcgtaaacca gcggctacta aaagatcaac caaaaaggag gaagtggaag aagaagtagt
92101 tatagaggaa tatcatcaaa caactgaaaa aaattctcca tctcctggag tcagcgacat
92161 tgtagaaagc gtggccgctg tagagctcga tgatagcgac ggggatgatg aacctatggt
92221 acaagttgaa gctggtaaag taaatcatag tgctagaagc gatctctctg acctaaaggt
92281 ggctaccgac aatatcgtta aagatcttaa gaaaattatt actagaatct ctgcagtatc
92341 gacggttcta gaggatgttc aagcagctgg tatctctaga caatttactt ctatgactaa
92401 agctattaca acactatctg atctagtcac cgagggaaaa tctaaagttg ttcgtaaaaa
92461 agttaaaact tgtaagaagt aaatgcgtgc actttttttat aaagatggta aactctttac
92521 cgataataat tttttaaatc ctgtatcaga cgataatcca gcgtatgagg ttttgcaaca
92581 tgttaaaatt cctactcatt taacagatgt agtagtatat gaacaaacgt gggaggaggc
92641 gttaactaga ttaatttttg tgggaagtga ttcaaaagga cgtagacaat acttttacgg
92701 aaaaatgcat gtacagaatc gcaacgctaa aagagatcgt atttttgtta gagtatataa
92761 cgttatgaaa cgaattaatt gttttataaa caaaaatata aagaaatcgt ccacagattc
92821 caattatcag ttggcggttt ttatgttaat ggaaaactatg ttttttatta gatttggtaa
92881 aatgaaatat cttaaggaga atgaaacagt agggttatta acactaaaaa ataaacacat
92941 agaaataagt cccgatgaaa tagttatcaa gtttgtagga aaggacaaag tttcacatga
93001 atttgttgtt cataagtcta atagactata taagccgcta ttgaaactga cggatgattc
93061 tagtcccgaa gaatttctgt tcaacaaact aagtgaacga aaggtatatg aatgtatcaa
93121 acagtttggt attagaatca aggatctccg aacgtatgga gtcaattata cgttttttata
93181 taatttttgg acaaatgtaa agtccatatc tcctcttcca tcaccaaaaa agttaatagc
93241 gttaactatc aaacaaactg ctgaagtggt aggtcatact ccatcaattt caaaaagagc
93301 ttatatggca acgactattt tagaaatggt aaaggataaa aatttttttag atgtagtatc
93361 taaaactacg ttcgatgaat tcctatctat agtcgtagat cacgttaaat catctacgga
93421 tggatgatat agatctttac acaaataatt acaaaaccga taaatggaaa tggataagcg
93481 tatgaaatct ctcgcaatga ccgctttctt tggggagcta agcacattag atattatggc
93541 attgataatg tctatatttta aacgccatcc aaacaatacc atttttcag tggataagga
93601 tggtcagttt atgattgatt tcgaatacga taattataag gcttctcaat atttggatct
93661 gaccctcact ccgatatctg gagatgaatg caagactcac gcatcgagta tagccgaaca
93721 attggcgtgt gtggatatta ttaaagagga tattagcgaa tatatcaaaa ctactccccg
93781 tcttaaacga tttataaaaa aataccgcaa tagatcagat actcgcatca gtcgagatac
93841 agaaaagctt aaaatagctc tagctaaagg catagattac gaatatataa aagacgcttg
93901 ttaataagta aatgaaaaaa aactagtcgt ttataataaa acacgatatg gatgccaacg
93961 tagtatcatc ttctactatt gcgacgtata tagacgcttt agcgaagaat gcttcggaat
94021 tagaacagag gtctaccgca tacgaaataa ataatgaatt ggaactagta tttattaagc
94081 cgccattgat tactttgaca aatgtagtga atatctctac gattcaggaa tcgtttattc
94141 gatttaccgt tactaataag gaaggtgtta aaattagaac taagattcca ttatctaagg
94201 tacatggtct agatgtaaaa aatgtacagt tagtagatgc tatagataac atagtttggg
94261 aaaagaaatc attagtgacg gaaaatcgtc ttcacaaaga atgcttgttg agactatcga
94321 cagaggaacg tcatatattt ttggattaca agaaatatgg atcctctatc cgactagaat
94381 tagtcaatct tattcaagca aaaacaaaaa actttacgat agactttaag ctaaaatatt
94441 ttctaggatc cggtgcccag tctaaaagtt ctttattaca cgctattaat catccaaagt
94501 caaggcctaa tacatctctg gaaatagaat ttacacctag agacaatgaa acagttccat
94561 atgatgaact aataaaggaa ttgacgactc tctcgcgtca tatatttatg gcttctccag
94621 agaatgtaat tctttctccg cctattaacg cgcctataaa aacctttatg ttgcctaaac
94681 aagatatagt aggtttggat ctggaaaatc tatatgccgt aactaagact gacggcattc
94741 ctataactat cagagttaca tcaaacgggt tgtattgtta ttttacacat cttggttata
94801 ttattagata tcctgttaag agaataatag attccgaagt agtagtcttt ggtgaggcag
94861 ttaaggataa gaactggacc gtatatctca ttaagctaat agagcctgtg aatgcaatca
94921 atgatagact agaagaaagt aagtatgttg aatctaaact agtggatatt tgtgatcgga
94981 tagtattcaa gtcaaagaaa tacgaaggtc cgtttactac aactagtgaa gtcgtcgata
95041 tgttatctac atatttacca aagcaaccag aaggtgttat tctgttctat tcaaagggac
95101 ctaaatctaa cattgatttt aaaattaaaa aggaaaatac tatagaccaa actgcaaatg
95161 tagtatttag gtacatgtcc agtgaaccaa ttatcttgg agagtcgtct atctttgtag
95221 agtataagaa atttagcaac gataaaggct ttcctaaaga atatggttct ggtaagattg
```

FIG. 23 CONT'D

95281 tgttatataa cggcgttaat tatctaaata atatctattg tttggaatat attaatacac
95341 ataatgaagt gggtattaag tccgtggttg taccctattaa gtttatagca gaatttcttag
95401 ttaatggaga aatacttaaa cctagaattg ataaaaccat gaaatatatt aactcagaag
95461 attattatgg aaatcaacat aatatcatag tcgaacattt aagagatcaa agcatcaaaa
95521 taggagatat ctttaacgag gataaactat cggatgtggg acatcaatac gccaataatg
95581 ataaatttag attaaatcca gaagttagtt attttacgaa taaacgaact agaggaccgt
95641 tgggaatttt atcaaactac gtcaagactc ttcttattto tatgtattgt tccaaaacat
95701 ttttagacga ttccaacaaa cgaaaggtat tggcgattga ttttggaaac ggtgctgacc
95761 tggaaaaata cttttatgga gagattgcgt tattggtagc gacggatccg gatgctgatg
95821 ctatagctag aggaaatgaa agatacaaca aattaaactc tggaattaaa accaagtact
95881 acaaatttga ctacattcag gaaactattc gatccgatac atttgtctct agtgtcagag
95941 aagtattcta ttttggaaag tttaatatca tcgactggca gtttgctatc cattattctt
96001 ttcatccgag acattatgct accgtcatga ataacttatc cgaactaact gctttctggag
96061 gcaaggtatt aatcactacc atggacggag acaaattatc aaaattaaca gataaaaaga
96121 cttttataat tcataagaat ttacctagta gcgaaaacta tatgtctgta gaaaaaatag
96181 ctgatgatag aatagtggta tataatccat caacaatgtc tactccaatg actgaatata
96241 ttatcaaaaa gaacgatata gtcagagtgt ttaacgaata cggatttgtt cttgtagata
96301 acgttgattt cgctacaatt atagaacgaa gtaaaaagtt tattaatggc gcatctacaa
96361 tggaagatag accatctaca agaaacttct tcgaactaaa tagaggagcc attaaatgtg
96421 aaggtttaga tgtcgaagac ttacttagtt actatgttgt ttatgtcttt tctaagcggt
96481 aaataataat atggtatggg ttctgatctc ccagttctaa atgcattaaa taattccaat
96541 agagcgattt ttgttcctat aggaccttcc aactgtggat actctgtatt gttaatagat
96601 atattaatac ttttgtcggg taacagaggt tctacgtctt ttaaaaataa aagtttgata
96661 acatctggcc tgttcataaa taaaaacttg gcgattctat atatactctt attatcaaat
96721 ctagccattg tcttatagat gtgagctact gtaggtgtac catttgattt tctttctaat
96781 actatatatt tctctcgaag aagttcttgc acatcatctg ggaataaaat actactgttg
96841 agtaaatcag ttatttttt tatatcgata ttgatggaca tttttatagt taaggataat
96901 aagtatccca aagtagataa cgacgataac gaagtatttta tacttttagg aaatcacaat
96961 gactttatca gattaaaatt aacaaaatta aaggagcatg tatttttttc tgaatatatt
97021 gtgactccag atacatatgg atctttatgc gtcgaattaa atgggtctag ttttcagcac
97081 ggcggtagat atatagaggt ggaggaattt atagatgctg gaagacaagt tagatggtgt
97141 tctacatcca atcatatatc taaagatata cccgaagata tgcacactga taaatttgtc
97201 atttatgata tatacacttt tgacgctttc aagaataaac gattggtatt cgtacaggta
97261 cctccgtcgt taggagatga tagtcatttg actaatccgt tattgtctcc gtattatcgt
97321 aattcagtag ccagacaaat ggtcaatgat atgattttta atcaagattc atttttaaaa
97381 tatttattag aacatctgat tagaagccac tatagagttt ctaaacatat aacaatagtt
97441 agatacaagg ataccgaaga attaaatcta acgagaatat gttataatag agataagttt
97501 aaggcgtttg tattcgcttg gtttaacggc gttcggaaaa atgaaaaggt actagatacg
97561 tataaaaagg tatctaattt gatataatga attcagtgac tgtatcacac gcgccatata
97621 ctattactta tcacgatgat tgggaaccag taatgagtca attggtagag ttttataacg
97681 aagtagccag ttggctgcta cgagacgaga cgtcgcctat tcctgataag ttctttatac
97741 agttgaaaca accgcttaga aataaacgag tatgtgtgtg cggtatagat ccgtatccga
97801 aagatggaac tggtgtaccg ttcgaatcac caaattttac aaaaaaatca attaaggaga
97861 tagcttcatc tatatctaga ttaaccggag taattgatta taaaggttat aaccttaata
97921 taatagacgg ggttataccc tggaattatt acttaagttg taaattagga gaaacaaaaa
97981 gtcacgcgat ctactgggat aagatttcca agttactgct gcagcatata actaaacacg
98041 ttagtgttct ttattgtttg ggtaaaacag atttcttcgaa tatacgggcc aagttagaat
98101 ccccggtaac taccatagtc ggatatcatc cagcggctag agaccgccaa ttcgagaaag
98161 atagatcatt tgaaattatc aacgttttac tggaattaga caacaaggca cctataaatt
98221 gggctcaagg gtttatttat taatgcttta gtgaaatttt aacttgtgtt ctaaatggat
98281 gcggctatta gaggtaatga tgttatcttt gttcttaaga ctataggtgt cccgtcagcg
98341 tgcagacaaa atgaagatcc aagatttgta gaagcattta aatgcgacga gttagaaaga
98401 tatattgaga ataatccaga atgtacacta ttcgaaagtc ttagggatga ggaagcatac
98461 tctatagtca gaattttcat ggatgtagat ttagacgcgt gtctagacga aatagattat
98521 ttaacggcta ttcaagattt tattatcgag gtgtcaaact gtgtagctag attcgcgttt
98581 acagaatgcg gcgccattca tgaaaatgta ataaaatcca tgagatctaa ttttttcattg
98641 actaagtcta caaatagaga taaaacaagt tttcatatta tcttttttaga cacgtatacc

FIG. 23 CONT'D

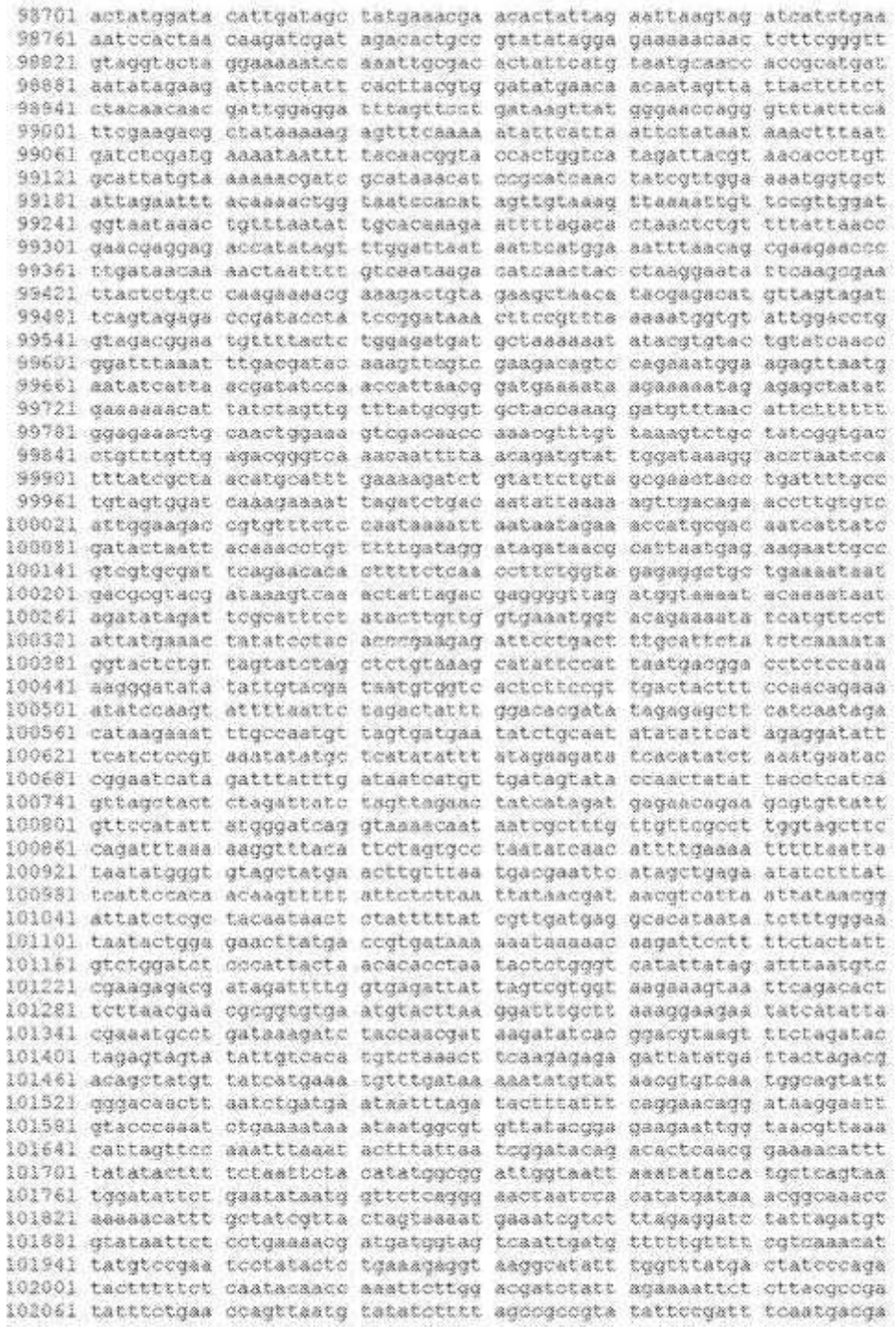

98701 actatggata cattgatagc tatgaaacga acactattag aattaagtag atcatctgaa
98761 aatccactaa caagatcgat agacactgcc gtatatagga gaaaaacaac tcttcgggtt
98821 gtaggtacta ggaaaaatcc aaattgcgac actattcatg taatgcaacc acogcatgat
98881 aatatagaag attacctatt cacttacgtg gatatgaaca acaatagtta ttacttttct
98941 ctacaacaac gattggagga tttagttcct gataagttat gggaaccagg gtttatttca
99001 ttcgaagacg ctataaaaag agtttcaaaa atattcatta attctataat aaacttttaat
99061 gatctcgatg aaaataattt tacaacggta ccactggtca tagattacgt aacaccttgt
99121 gcattatgta aaaaacgatc gcataaacat ccgcatcaac tatcgttgga aaatggtgct
99181 attagaattt acaaaactgg taatccacat agttgtaaag ttaaaattgt tccgttggat
99241 ggtaataaac tgtttaatat tgcacaaaga attttagaca ctaactctgt tttattaacc
99301 gaacgaggag accatatagt ttggattaat aattcatgga aatttaacag cgaagaaccc
99361 ttgataacaa aactaatttt gtcaataaga catcaactac ctaaggaata ttcaagcgaa
99421 ttactctgtc caagaaaacg aaagactgta gaagctaaca tacgagacat gttagtagat
99481 tcagtagaga ccgatacota tccggataaa cttccgttta aaaatggtgt attggaccta
99541 gtagacggaa tgttttactc tggagatgat gctaaaaaat atacgtgtac tgtatcaacc
99601 ggatttaaat ttgacgatac aaagttcgtc gaagacagtc cagaaatgga agagttaatg
99661 aatatcatta acgatatcca accattaacg gatgaaaata agaaaaatag agagctatat
99721 gaaaaaacat tatctagttg tttatgcggt gctaccaaag gatgtttaac attcttttta
99781 ggagaaactg caactggaaa gtcgacaacc aaacgtttgt taaagtctgc tatcggtgac
99841 ctgtttgttg agacgggtca aacaatttta acagatgtat tggataaagg acctaatcca
99901 tttatcgcta acatgcattt gaaaagatct gtattctgta gcgaactacc tgattttgcc
99961 tgtagtggat caaagaaaat tagatctgac aatattaaaa agttgacaga accttgtgtc
100021 attggaagac cgtgtttctc caataaaatt aataatagaa accatgcgac aatcattatc
100081 gatactaatt acaaacctgt ttttgatagg atagataacg cattaatgag aagaattgcc
100141 gtcgtgcgat tcagaacaca cttttctcaa ccttctggta gagaggctgc tgaaaataat
100201 gacgcgtacg ataaagtcaa actattagac gaggggttag atggtaaaat acaaaataat
100261 agatatagat tcgcatttct atacttgttg gtgaaatggt acagaaaata tcatgttcct
100321 attatgaaac tatatcctac acnngagagg attcctgact ttgcattcta tctcaaaata
100381 ggtactctgt tagtatctag ctctgtaaag catattccat taatgacgga cctctccaaa
100441 aagggatata tattgtacga taatgtggtc actcttccgt tgactacttt ccaacagaaa
100501 atatccaagt attttaattc tagactattt ggacacgata tagagagctt catcaatagg
100561 cataagaaat ttgccaatgt tagtgatgaa tatctgcaat atatattcat agaggatatt
100621 tcatctccgt aaatatatgc tcatatattt atagaagata tcacatatct aaatgaatac
100681 cggaatcata gatttatttg ataatcatgt tgatagtata ccaactatat tacctcatca
100741 gttagctact ctagattatc tagttagaac tatcatagat gagaacagaa gcgtgttatt
100801 gttccatatt atgggatcag gtaaaacaat aatcgctttg ttgttcgcct tggtagcttc
100861 cagatttaaa aaggtttaca ttctagtgcc taatatcaac attttgaaaa tttttaatta
100921 taatatgggt gtagctatga acttgtttaa tgacgaattc atagctgaga atatctttat
100981 tcattccaca acaagttttt attctcttaa ttataacgat aacgtcatta attataacgg
101041 attatctcgc tacaataact ctatttttat cgttgatgag gcacataata tctttgggaa
101101 taatactgga gaacttatga ccgtgataaa aaataaaaac aagattcctt ttctactatt
101161 gtctggatct cccattacta acacacctaa tactctgggt catattatag atttaatgtc
101221 cgaagagacg atagattttg gtgagattat tagtcgtggt aagaaagtaa ttcagacact
101281 tcttaacgaa cgcggtgtga atgtacttaa ggatttgctt aaaggaagaa tatcatatta
101341 cgaaatgcct gataaagatc taccaacgat aagatatcac ggacgtaagt ttctagatac
101401 tagagtagta tattgtcaca tgtctaaact tcaagagaga gattatatga ttactagacg
101461 acagctatgt tatcatgaaa tgtttgataa aaatatgtat aacgtgtcaa tggcagtatt
101521 gggacaactt aatctgatga ataatttaga tactttattt caggaacagg ataaggaatt
101581 gtacccaaat ctgaaaataa ataatggcgt gttatacgga gaagaattgg taacgttaaa
101641 cattagttcc aaatttaaat actttattaa tcggatacag acactcaacg gaaaacattt
101701 tatatacttt tctaattcta catatggcgg attggtaatt aaatatatca tgctcagtaa
101761 tggatattct gaatataatg gttctcaggg aactaatcca catatgataa acggcaaacc
101821 aaaaacattt gctatcgtta ctagtaaaat gaaatcgtct ttagaggatc tattagatgt
101881 gtataattct cctgaaaacg atgatggtag tcaattgatg tttttgtttt cgtcaaacat
101941 tatgtccgaa tcctatactc tgaaagaggt aaggcatatt tggtttatga ctatcccaga
102001 tacttttttt caatacaacc aaattcttgg acgatctatt agaaaattct ctttacgccga
102061 tatttctgaa ccagttaatg tatatctttt agccgccgta tattccgatt tcaatgacga

FIG. 23 CONT'D

```
102121 agtaacgtca ttaaacgatt acacacagga tgaattgatt aatgttttac catttgacat
102181 caaaaagctg ttatatctaa aatttaagac taaagaaacg aatagaatat actctattct
102241 tcaagagatg tctgaaacgt attctcttcc accacatcca tcaattgtaa aagttttatt
102301 gggagaattg gtcagacaat ttttttataa taattctcgt attaagtata acgactccaa
102361 gttacttaaa atggttacat cagttataaa aaataaagaa gacgctagga attacataga
102421 tgatattgta aacggtcact tctttgtatc gaataaagta tttgataaat ctcttttata
102481 caaatacgaa aacgatatta ttacagtacc gtttagactt tcctacgaac catttgtttg
102541 gggagttaac tttcgtaaag aatataacgt ggtatcttct ccataaaact gatgaaatat
102601 ataaagaaat aaatgtcgag ctttgttacc aatggatacc ttccagttac attggaacca
102661 cacgagctga cgttagacat aaaaactaat attaggaatg ccgtatataa gacgtatctc
102721 catagagaaa ttagtggtaa aatggccaag aaaatagaaa ttcgtgaaga cgtggaatta
102781 cctctcggcg aaatagttaa taattctgta gttataaacg ttccgtgtgt aataacctac
102841 gcgtattatc acgttgggga tatagtcaga ggaacattaa acatcgaaga tgaatcaaat
102901 gtaactattc aatgtggaga tttaatctgt aaactaagta gagattcggg tactgtatca
102961 tttagcgatt caaagtactg cttttttcga aatggtaatg cgtatgacaa tggcagcgaa
103021 gtcactgccg ttctaatgga ggctcaacaa ggtatcgaat ctagttttgt ttttctcgcg
103081 aatatcgtcg actcataaaa aagagaatag cggtaagtat aaacacgaat actatggcaa
103141 taattgcgaa tgttttattc tcttcgatat atttttgata atatgaaaaa catgtctctc
103201 tcaaatcgga caaccatctc ataaaatagt tctcgcgcgc tggagaggta gttgctgctc
103261 gtataatctc cccagaataa tatacttgcg tgtcgtcgtt caatttatac ggatttctat
103321 agttctctgt tatataatgc ggttttccat catgattaga cgacgacaat agtgttctga
103381 atttagatag ttgatcagaa tgaatgttta ttggcgttgg aaaaattatc catacagcgt
103441 ctgcagagtg gttgatagtt gttcctagat atgtaaaata atccaactta ctaggcagca
103501 aattgtctag ataaaatact gaatcaaacg gtgcagacgt attggcggat ctaatggaat
103561 ccaattgatt aactatcttt tgaaaatata catttttatg atccaatact tgtaagaata
103621 tagaaataat gataagtcca tcatcgtgtt tttttgcctc ttcataagaa ctatattttt
103681 tcttattcca atgaacaaga ttaatctctc cagagtattt gtacacatct atcaagtgat
103741 tggatccata atcgtcttcc tttcgccaat atatatgtag tgatgataac acatattcat
103801 tggggagaaa ccctccactt atatatcctc ctttaaaatt aatccttact agttttccag
103861 tgttctggat agtggttggt ttcgactcat tataatgtat gtctaacggc ttcaatcgcg
103921 cgttagaaat tgctttttta gtttctatat taataggaga tagttgttgc ggcatagtaa
103981 aaatgaaatg ataactgttt aaaaatagct cttagtatgg gaattacaat ggatgaggaa
104041 gtgatatttg aaactcctag agaattaata tctattaaac gaataaaaga tattccaaga
104101 tcaaaagaca cgcacgtgtt tgctgcgtgt ataacaagtg acggatatcc gttaatagga
104161 gctagaagaa cttcattcgc gttccaggcg atattatctc aacaaaattc agattctatc
104221 tttagagtat ccactaaact attacggttt atgtactaca atgaactaag agaaatcttt
104281 agacggttga gaaaaggttc tatcaacaat atcgatcctc actttgaaga gttaatatta
104341 ttgggtggta aactagataa aaaggaatct attaaagatt gtttaagaag agaattaaaa
104401 gaggaaagtg atgaacgtat aacagtaaaa gaattcggaa atgtaattct aaaacttaca
104461 acgcgcgata aattatttaa taaagtatat ataggttatt gcatggcgtg ttttattaat
104521 caatcgttgg aggatttatc gcatactagt atttacaatg tagaaattag aaagattaaa
104581 tcattaaatg attgtattaa cgacgataaa tacgaatatc tgtcttatat ttataatatg
104641 ctagttaata gtaaatgaac ttttacagat ctagtataat tagtcagatt attaagtata
104701 atagacgact agctaagtct attatttgcg aggatgactc tcaaattatt acactcacgg
104761 cattcgttaa ccaatgccta tggtgtcata aacgagtatc cgtgtccgct attttattaa
104821 ctactgataa caaaatatta gtatgtaaca gacgagatag ttttctctat tctgaaataa
104881 ttagaactag aaacatgttt agaaagaaac gattatttct gaattattcc aattatttga
104941 acaaacagga aagaagtata ctatcgtcat ttttttctct agatccagct actgctgata
105001 atgatagaat agacgctatt tatccgggtg gcatacccaa aaggggtgag aatgttccag
105061 agtgtttatc cagggaaatt aaagaagaag ttaatataga caattctttt gtattcatag
105121 acactcggtt ttttattcat ggcatcatag aagataccat tattaataaa ttttttgagg
105181 taatcttctt tgtcggaaga atatctctaa cgagtgatca aatcattgat acatttaaaa
105241 gtaatcatga aatcaaggat ctaatatttt tagatccgaa ttcaggtaat ggactccaat
105301 acgaaattgc aaaatatgct ctagatactg caaaactcaa atgttatggc catagaggat
105361 gttattacga atcattaaaa aaattaactg aggatgattg attagaaaat ataaattaat
105421 ttaccatcgt gtatttttat aacgggattg tccggcatat catgtagata gttaccgtct
105481 acatcgtata ctcgaccatc tacgccttta aatcctctat ttattgacat taatctatta
```

FIG. 23 CONT'D

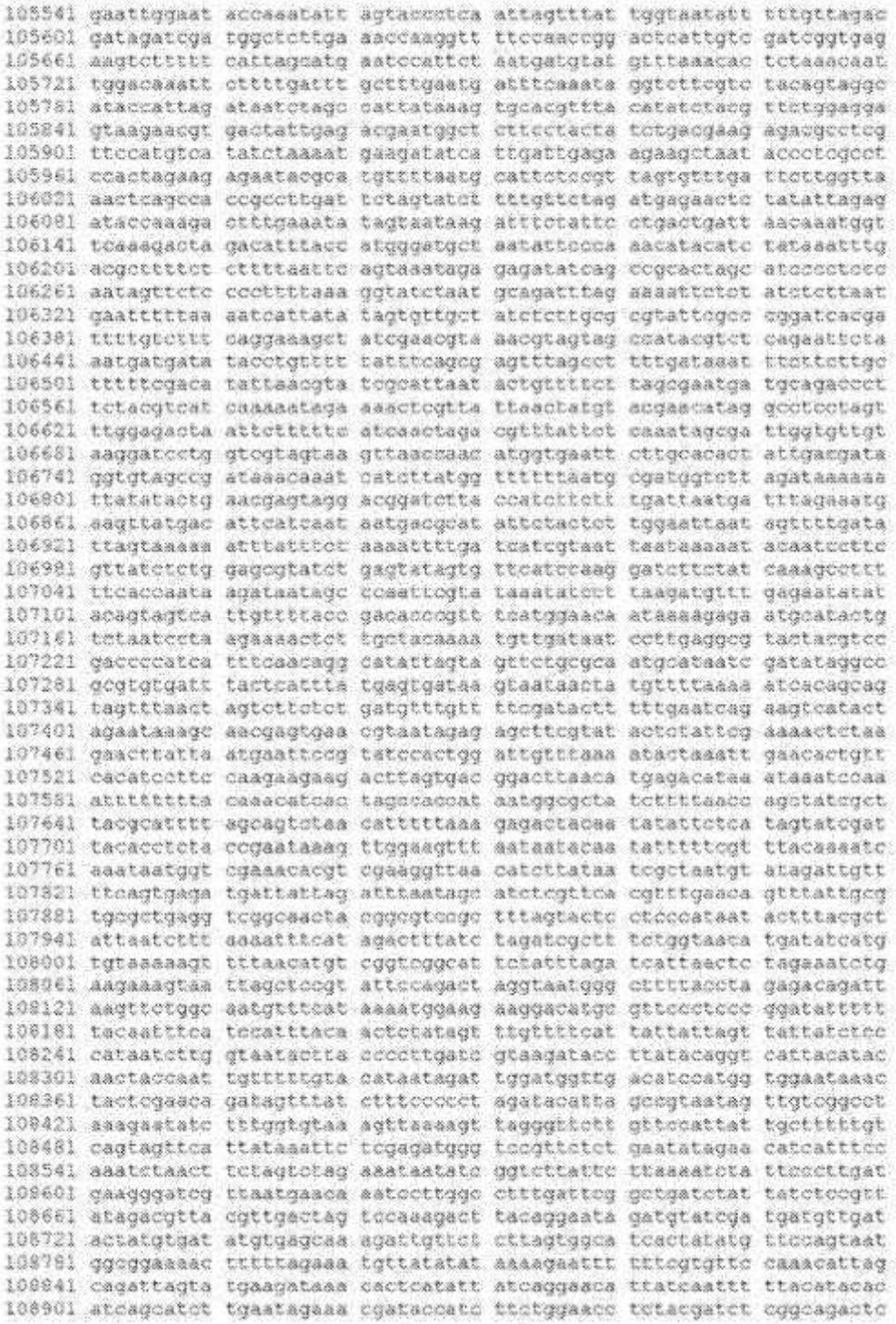

105541 gaattggaat accaaatatt agtaccatca attagtttat tggtaatatt tttgttagac
105601 gatagatcga tggctcttga aaccaaggtt ttccaaccgg actcattgtc gatcggtgag
105661 aagtcttttt cattagcatg aatccattct aatgatgtat gtttaaacac tctaaacaat
105721 tggacaaatt cttttgattt gctttgaatg atttcaaata ggtcttcgtc tacagtaggc
105781 ataccattag ataatctagc cattataaag tgcacgttta catatctacg tttcggagga
105841 gtaagaacgt gactattgag acgaatggct cttcctacta tctgacgaag agacgcctcg
105901 ttccatgtca tatctaaaat gaagatatca ttgattgaga agaagctaat accctcgcct
105961 ccactagaag agaatacgca tgttttaatg cattctccgt tagtgtttga ttcttggtta
106021 aactcagcca ccgccttgat tctagtatct tttgttctag atgagaactc tatattagag
106081 ataccaaaga ctttgaaata tagtaataag atttctattc ctgactgatt aacaaatggt
106141 tcaaagacta gacatttacc atgggatgct aatattccca aacatacatc tataaatttg
106201 acgcttttct cttttaattc agtaaataga gagatatcag ccgcactagc atcccctccc
106261 aatagttctc ccctttaaaa ggtatctaat gcagatttag aaaattctct atctcttaat
106321 gaatttttaa aatcattata tagtgttgct atctcttgcg cgtattcgcc cggatcacga
106381 ttttgtcttt caggaaagct atcgaacgta aacgtagtag ccatacgtct cagaattcta
106441 aatgatgata tacctgtttt tatttcagcg agtttagcct tttgataaat ttcttcttgc
106501 tttttcgaca tattaacgta tcgcattaat actgttttct tagcgaatga tgcagaccct
106561 tctacgtcat caaaaatagg aaactcgtta ttaactatgt acgaacatag gcctcctagt
106621 ttggagacta attcttttte atcaactagg cgtttattct caaatagcga ttggtgttgt
106681 aaggatcctg gtcgtagtaa gttaacgaac atggtgaatt cttgcacact attgacgata
106741 ggtgtagccg ataaacaaat catcttatgg ttttttaatg cgatggtctt agataaaaaa
106801 ttatatactg aacgagtagg acggatctta ccatcttcti tgattaatga tttagaaatg
106861 aagttatgac attcatcaat aatgacgcat attctactct tggaattaat agttttgata
106921 ttagtaaaaa atttatttct aaaattttga tcatcgtaat taataaaaat acaatcctte
106981 gttatctctg gagcgtatct gagtatagtg ttcatccaag gatcttctat caaagccttt
107041 ttcaccaata agataatagc ccaattcgta taaatatcct taagatgttt gagaatatat
107101 acagtagtca ttgttttacc gacacccgtt tcatggaaca ataaaagaga atgcatactg
107161 tctaatccta agaaaactct tgctacaaaa tgttgataat ccttgaggcg tactacgtcc
107221 gaccccatca tttcaacagg catattagta gttctgcgca atgcataatc gatataggcc
107281 gcgtgtgatt tactcattta tgagtgataa gtaataacta tgttttaaaa atcacagcag
107341 tagtttaact agtcttctct gatgtttgtt ttcgatactt tttgaatcag aagtcatact
107401 agaataaagc aacgagtgaa cgtaatagag agcttcgtat actctattcg aaaactctaa
107461 gaacttatta atgaattccg tatccactgg attgtttaaa atactaaatt gaacactgtt
107521 cacatccttc caagaagaag acttagtgac ggacttaaca tgagacataa ataaatccaa
107581 attttttta caaacatcac tagccacaat aatggcgcta tcttttaacc agctatcgct
107641 tacgcatttt agcagtctaa cattttaaa gagactacaa tatattctca tagtatcgat
107701 tacacctcta ccgaataaag ttggaagttt aataatacaa tatttttcgt ttacaaaatc
107761 aaataatggt cgaaacacgt cgaaggttaa catcttataa tcgctaatgt atagattgtt
107821 ttcagtgaga tgattattag atttaatagc atctcgttca cgtttgaaca gtttattgcg
107881 tgcgctgagg tcggcaacta cggcgtcagc tttagtactc ctcccataat actttacgct
107941 attaatcttt aaaatttcat agactttatc tagatcgctt tctggtaaca tgatatcatg
108001 tgtaaaaagt tttaacatgt cggtcggcat tctatttaga tcattaactc tagaaatctg
108061 aagaaagtaa ttagctccgt attccagact aggtaatggg cttttaccta gagacagatt
108121 aagttctggc aatgtttcat aaaatggaag aaggacatgc gttccctccc ggatattttt
108181 tacaatttca tccatttaca actctatagt ttgttttcat tattattagt tattatctcc
108241 cataatcttg gtaatactta ccccttgatc gtaagatacc ttatacaggt cattacatac
108301 aactaccaat tgtttttgta cataatagat tggatggttg acatccatgg tggaataaac
108361 tactcgaaca gatagtttat ctttcccccc agatacatta gccgtaatag ttgtcggcct
108421 aaagaatatc tttggtgtaa agttaaaagt tagggttctt gttccattat tgcttttttgt
108481 cagtagttca ttataaattc tcgagatggg tccgttctct gaatatagaa catcatttcc
108541 aaatctaact tctagtctag aaataatatc ggtcttattc ttaaaatcta ttcccttgat
108601 gaagggatcg ttaatgaaca aatcctggc ctttgattcg gctgatctat tatctccgtt
108661 atagacgtta cgttgactag tccaaagact tacaggaata gatgtatcga tgatgttgat
108721 actatgtgat atgtgagcaa agattgttct cttagtggca tcactatatg ttccagtaat
108781 ggcggaaaac tttttagaaa tgttatatat aaaagaattt tttcgtgttc caaacattag
108841 cagattagta tgaagataaa cactcatatt atcaggaaca ttatcaattt ttacatacac
108901 atcagcatct tgaatagaaa cgataccatc ttctggaacc tctacgatct cggcagactc

FIG. 23 CONT'D


108561 cggataacca gtcggtggac catcgctaac aataactaga tcatccaaca atctactcac
109021 atatgcatct atataatctt tttcatcttg tgagtaccct ggatacgaaa taaatttatt
109081 atccgtattt ccataataag gtttagtata aacagagagc gatgttgccg catgaacttc
109141 agttacagtc gccgttggtt ggtttatttg acctattact ctcctaggtt tctctataaa
109201 tgatggttta atttgtacat tcttaaccat atatccaata aagctcaatt caggaacata
109261 aacaaattct ttgttgaacg tttcaaagtc gaacgaagag tcacgaataa cgatatcgga
109321 tactggattg aaggttaccg ttacggtaat ttttgaatcg gatagtttaa gactgctgaa
109381 tgtatcttcc acatcaaacg gagttttaat ataaacgtat actgtagatg gttctttaat
109441 agtgtcatta ggagttaggc caatagaaat atcattaagt tcactagaat atccagagtg
109501 tttcaaagca attgtattat tgatacaatt attatataat tcttcgccct caatttccca
109561 aataacaccg ttacacgaag agatagatac gtgattaata catttatatc caacatatgg
109621 tacgtaaccg aatcttccca taccttaaac ttctggaagt tccaaactca gaaccaaatg
109681 attaagcgca gtaatatact gatccctaat ttcgaagcta gcgatagcct gattgtctgg
109741 accatcgttt gtcataactc cggatagaga aatatattgc ggcatatata aagttggaat
109801 ttgactatcg actgcgaaga cattagaccg tttaatagag tcatccccac cgatcaaaga
109861 attaatgata gtattattca ttttctattt aaaatggaaa aagcttacaa taaactccgt
109921 agagaaatat ctataatttg tgagttttcc ttaaagtaac agcttccgta aacgccgtct
109981 ttatctctta gtaagtttat tgtatttata acctttttct tatcttcata gaatactaaa
110041 ggcaacaaag aaatttttgg ttcttctcta agagctacgt gagacttaac catagacgcc
110101 aacgaatccc tacatatttt agaacaguaa tacccaactt caccaccctt gaatgtctca
110161 atactaatag gtttaaaaac caaatcttga ttacaaaacc aacacttatc aattacacta
110221 tttgtcttaa tagacacatc tgccatagat ttataatact ttggtagtat acaagcgagt
110281 gcttcttctt tagcgggctt aaagactgct ttaggtgctg aaataaccac atctggaagg
110341 cttactcgct tagccattta attacggaac tatttttta tacttctaat gagcaagtag
110401 aaaacctctc atctacaaaa acatactcgt gtccataatc ctctaccata gttacacgtt
110461 ttttagatct catatgtgct aaaaagtttt cccatactaa ttggttacta ttatttttcg
110521 tataattttt aacagtttga ggttttagat ttttagttac agaagtgata tcgaatattt
110581 tatccaaaaa gaatgaataa ttaattgtct tagaaggagt gttttcttgg caaaagaata
110641 ccaagtgctt aaatatttct actacttcat taatcttttc tgtactcaga ttcagtttct
110701 catcttttac ttgattgatt atttcaaaga ctaacttata atcctttta tttattctct
110761 cgttagcctt aagaaaacta gatacaaaat ttgcatctac atcatccgtg gatatttgat
110821 ttttttccat gatatccaag agttccgaga taatttctcc agaacattga tgagacaata
110881 atctccgcaa tacatttctc aaatgaataa gtttattaga cacatggaag tttgacttt
110941 tttgtacctt tgtacatttt tgaaatatcg actcgcaaaa aatacaatat tcatatcctt
111001 gttcagatac tatacogttg tgtctacaac cgctacataa tcgtagattc atgttaacac
111061 tctacgtatc tcgtcgtcca atattttata taaaaacatt ttatttctag acgttgccag
111121 aaaatcctgt aatatttta gttttttggg ctgtgaataa agtatcgccc taatattgtt
111181 accgtcttcc gccaatatag tagttaaatt atccgcacat gcaaaagaac accgcttagg
111241 cggattcagt acaatgttat atttttcgta ccaactcatt taaatatcat aatctaaaat
111301 agttctgtaa tatgtctagc gctaatatat tgatcataat cctgtgcata aattaagata
111361 caacaatgtc tcgaaatcat cgacatggct tcttccatag ttagaagatc gtcgtcaaag
111421 ttagcaacgt gattcatcaa catttgcrgt ttttgaggcag caaatactga accgtcgcca
111481 ttcaaccatt cataaaaacc atcgtctgaa tccattgata atttcttgta ctggtttttg
111541 agagctcgca tcaatctagc atttctagct cccggattga aaacagaaag aggatcgtac
111601 atccagggtc cattttctgt aaatagaatc gtataatgtc ccttcaagaa gatatcagac
111661 gatccacaat caaagaattg gtctccgagt ttgtaacaaa ctgcggactt taacctatac
111721 atgataccgt ttagcatgat ttctggtgat acgtcaatcg gagtatcatc tattagagat
111781 ctaaagccgg tgtaacattc tccaccaaac atattcttat tctgacgtcg ttctacataa
111841 aacatcattg ctccattaac gataacaggg gaatgaacag cactacccat cacattagtt
111901 cccaatggat caatgtgtgt aactccagaa catcttccat atcctatgtt aggaggagcg
111961 aacaccactc ttccactatt gccatcgaat gccatagaat aaatatcctt ggaattgata
112021 gaaatcggac tgtcggatgt tgtgatcatc ttcataggat taacaactat gtatggtgcc
112081 gcctgaagtt tcatatcgta actgatgccg tttataggtc tagccacaga aaccaacgta
112141 ggtctaaatc caactataga caaaatagaa gccaatatct gttcctcatc tgtcataact
112201 tgagagcatc cagtatgaat aatcttcatt agatgggat ctaccgcatc atcatcgtta
112261 caataaaaaa ttcccattct aatgttcata attgcttttc taatcatggt atgcatgttt
112321 gctctctgaa tctctgtgga aattagatct gatacacctg taatcactat cggattatcc

FIG. 23 CONT'D

```
112381 tccgtaagac gattaaccaa caacatataa ttataagact ttactttttct aaatttcataa
112441 agttgctgga ttaggctata ggtgtctcca tgtacatacg cgtttctcgag cgcaggaagt
112501 ttaatacoga atagtgccat cagaatagga tgaatatagt aattagtttc tggttttcta
112561 taaataaaag acaaatcttg tgaactagac atatcggtaa aatgcatgga ttggaatcgt
112621 gtagtcgaca gaagaatatg atgattagat ggagagtata ttttatctaa ctctttgagt
112681 tggtcaccga ttctaggact agctcgagaa tgaataagta ctaaaggatg agtacatttc
112741 acagaaacac tagcattgtt caatgtgctc tttacatggg taaggagttg aaatagctcg
112801 tttctatttg ttctgacaat atttagttta ttcataatgt taagcatatc ctgaatagta
112861 aagttagatg tgtcatactt gttagtagtt agatatttag caattgcatt cccatcattt
112921 ctcaatctcg tacttccaatc atgtgtagat gctacttcgt cgatggaaac catacaatcc
112981 tttttgatag gctgttgaga ttgattattt cctgcacgtt taggtttggt acgttgattt
113041 ctagcccctg cggatataac gtcatcgtct acaatttggg acaatgaatt gcatacacta
113101 caagacaaag atttatcaga agtgtgaata tgatcttcat ctaccaaaga aagagtttga
113161 ttagtataac tagattttag tcctgcgtta gatgttaaaa aaacatcgct attgaccacg
113221 gcttccatta tttatatttcg tagttttac tcgaaagcgt gattttaata tccaatctta
113281 ttacttttgg aatcgttcaa aacctttgac tagttgtaga atttgatcta ttgcctacg
113341 cgtatactcc cttgcatcat atacgttcgt caccagatcg tttgtttcgg cctgaagttg
113401 gtgcatatct ctttcaacat tcgacatgag atccttaagg gccatatcgt ctagattttg
113461 ttgagatgct gctcctggat ttggattttg ttgtgctgtt gtacatactg taccaccagt
113521 aggtgtagga gtacatacag tggccacaat aggaggttga ggaggtgtaa ccgttggagt
113581 agtacaagaa atatttccat ccgattgttg tgtacatgta gttgttggta acgtctgaga
113641 aggttgggta gatggcggtg tcgtcgtctt ttgatcttta ttaaatttag agataatatc
113701 ctgaacagca ttgctcggcg tcaacgctgg aaggagtgaa ctcgccggcg catcagtatc
113761 ttcagacagc caatcaaaaa gattagacat atcagatgat gtattagttt gttgtcgtgg
113821 ttttggtgta ggaacagtac tactaggtag aagaatagga gccggtgtag ctgttggaac
113881 cggctgtgga gttatatgaa tagttggttg tagcggttgg ataggctgtc tgctggcgac
113941 cgtcatatta tctctagcta gttgttctcg caactgtctt tgataatacg actcttgaga
114001 ctttagtcct atttcaatcg cttcatcctt tttcgtatcc ggatcctttt cttcagaata
114061 atagattgac gactttggtg tagaggattc tgccagcccc tgtgagaact tgttaaagaa
114121 gtccatttaa ggctttaaaa ttgaattgcg attataagat taaatggcag acacagacga
114181 tattatcgac tatgaatccg atgatctcac cgaatacgag gatgatgaag aagaggaaga
114241 agatggagag tcactagaaa ctagtgatat agatcccaaa tcttcttata agattgtaga
114301 atcagcatcc actcatatag aagatgcgca ttccaatctt aaacatatag ggaatcatat
114361 atctgctctt aaacgacgct atactagacg tataagtcta tttgaaatag cgggtataat
114421 agcagaaagc tataacttgc ttcaacgagg aagattacct ctagtttcag aattttctga
114481 cgaaacgatg aagcaaaata tgctacatgt aattatacaa gagatagagg agggttcttg
114541 tcctatagtc atcgaaaaga acggagaatt gttgtcggta aacgattttg acaaagatgg
114601 tctaaaattc catctagact atattatcaa aatttggaaa cttcaaaaac gatattagaa
114661 tttatacgaa tatcgttctc taaatgtcac aatcaagtct cgcatgttca gcaatttatt
114721 gtcgtacttt atatcgtgtt cattaacgat atcttgcaaa atagtaatga ttctatcttc
114781 cttcgataga tattcttcag agattattgt cttatatttt ttcttgttat ccgatatgaa
114841 tttgataaga ctttgaacat tattgatacc cgtctgttta attttttcta cagatatttt
114901 agttttggca gattctatcg tatctgtcaa tagacatcca acatcgacat tcgacgtcaa
114961 ttgtctataa atcaacgtat aaattttaga aataacatta gcgaattgtt gtgcattgat
115021 gtcgttattc tgaaacagta tgattttagg tagcattttc ttaacaaaga gaacgtattt
115081 attgttactc agttgaacag atgatatatc cagattacta acgcatctga ttccgtatac
115141 caaactttca gaagaaatgg tgtacaattg tttgtattca ttcaatgtct ctttttcaga
115201 aattagttta gagtcgaata ctgcaataat tttcaagaga tagttttcat cagataagat
115261 tttatttagt gtagatatga taaaactatt gttttgttgg agaacttgat acgccgcgtt
115321 ctctgtagtc gacgctctca aatgggaaac aatctccatt atttttttgg aatcggatac
115381 tatatcttcg gtatcttgac gcagtctagt atacatagag ttaagagaga ttagagtttg
115441 tacattaagc aacatgtctc taaatgtggc tacaaacttt tcctttttca cataatctag
115501 tttattatat accgatttca caacggcacc agatttaagg aaccagaatg aaaaactctg
115561 ataactacaa tatttcatca tagttacgat tttatcatct tctatagttg gtgtaatagc
115621 gcataccttt ttctccaaga ctggaaccaa cgtcataaaa atgtttaaat caaaatccat
115681 atcaacatct gatgcgctaa gaccagtctc gcgttcaaga ttatctttac taatggtgac
115741 gaactcatca tatagaactc taagtttgtc cattatttat ttacagattt agttgtttaa
```

FIG. 23 CONT'D

```
115801 tttatttgtg ctcttccaga gttgggatag tatttttcta acgtcggtat tatattatta
115861 ggatctacgt tcatatgtat cataatatta atcatccacg ttttgataaa tctatcttta
115921 gcttctgaaa taacgtattt aaacaaagga gaaaaatatt tagctacggc atcagacgca
115981 ataacatttt ttgtaaatgt aacgtattta gacgacagat cttcgttaaa aagttttcca
116041 tctatgtaga atccatcggt tgttaacacc attcccgcgt cagattgaat aggagtttga
116101 atagtttgtt ttggaaatag atccttcaat aacttatagt tgggtgggaa aaaatcgatt
116161 ttatcactag actctttctt ttttactatc attacctcat gaactatttc ttgaatgagt
116221 atatgtattt tctttcctat atcggacgcg ttcattggaa aatataccat gtcgttaact
116281 ataagaatat ttttatcctc gtttacaaac tgaataatat cagatgtagt tcgtaaacga
116341 actatatcat caccagcaca acatctaact atatgatatc cactagtttc ctttagccgt
116401 ttattatctt gttccatatt agcagtcatt ccatcattta agaaggcgtc aaagataata
116461 gggagaaatg acattttgga ttctgttacg actttaccaa aattaaggat atacggactt
116521 actatctttt tctcaacgtc gatttgatga acacacgatg aaaatgtgct tctatgagat
116581 tgatcatgta gaaaacaaca agggatacaa tattttcgca tatcatgaaa tatattaaga
116641 aatcccacct tattatattt ccccaaagga tccatgcatg taaacattat gccgttatca
116701 ttaataaaga cttctttctc atcggatttg taaaagttgt tactgatttt tttcattcca
116761 ggatctagat aattaataat gatgggtttt ctattcttat tctttgtatt ttggcatatc
116821 ctagaccagt aaacagtttc cactttggta aaatcagcag acttttgaac gctattaaac
116881 atggcattaa tggcaataac taaaaatgta aaatattttt ctatgttagg aatatggttt
116941 ttcactttaa tagatatatg gtttttgtcc aaaatgatag atattttttt atccgaggat
117001 agtaaaatat tattagtcgc cgtctctata aaaatgaagc tagtctcgat atccaatttt
117061 attctagaat tgataggagt cgccaaatgt accttatacg ttatatctcc cttgatgcgt
117121 tccatttgtg tatctatatc ggacacaaga tctgtaaata gttttacgtt attaatcatc
117181 acggtatcgc cgtcgctaga taacgctaat gtaccatcca agtcccaaat ggagagattt
117241 aactgttcat cgtttagaat aaaatgatta ccggtcatat taataaagtg ttcatcgtat
117301 ctagataaca acgacttata attaatgtcc aagtcttgaa ctcgctgaat gatcttttct
117361 aacccagtta gttttagatt ggtacgaaat atattgttaa actttgattc tacagtaatg
117421 tccaaatcta gttgtggaaa tacttccatc aacattgttt caaacttgat aatattatta
117481 tctacatctt catacgatcc aaattccgga atagatgtat cacatgctct tgccacccag
117541 ataaccaaaa agtcacacgc tccaggatat acattgtata aaaagctatc gttttttagt
117601 agtgtttttt tctgagtata tacgaaggga ttaaaaatag tattatcaac gtaactatat
117661 tccaaattat tcttatgaga atagataata atatcgtcct taatatctaa caaatttcct
117721 aaatatccct ttaattgagt cattcgaagc gtcaatagaa tatgtctctt aactatttcc
117781 ggctgttgta tatttaaatg acttcgtaaa aaataatata tgggcgactt ctcatctatg
117841 taatcatatg gagtgagata tagggctcgt tctacctcct gccccttacc cacctgtaat
117901 accaattgcg gacttactat atatcgcata tttatatcgt ggggtaaagt gaaaatctac
117961 taccgatgat gtaagtctta caatgttcga accagtacca gatcttaatt tggaggcctc
118021 cgtagaacta ggggaggtaa atatagatca aacaacacct atgataaagg aaaatagcgg
118081 ttttatatcc cgtagtagac gtctattcgc ccatagatct aaggatgatg agagaaaact
118141 agcactacga ttctttttac aaagacttta ttttttagat catagagaga ttcattattt
118201 gttcagatgc gttgacgctg taaaagacgt cactattacc aaaaaaaata acattatcgt
118261 ggcgccttat atagcacttt taactatcgc atcaaaagga tgcaaactta cagaaacaat
118321 gattgaagca ttttttccag aactatataa tgaacatagt aagaaattta aattcaactc
118381 tcaagtatcc atcatccaag aaaaactcgg ataccagttt ggaaactatc acgtttatga
118441 ttttgaaccg tattactcta cagtagctct ggctattcga gatgaacatt catctggcat
118501 ttttaatatc cgtcaagaga gttatctggt aagttcatta tctgaaataa catatagatt
118561 ttatctaatt aatctaaaat ctgatcttgt tcaatggagt gctagtacgg gcgctgtaat
118621 taatcaaatg gtaaatactg tattgattac agtgtatgaa aagttacaac tggtcataga
118681 aaatgattca caatttacat gttcattggc tgtggaatca aaacttccaa taaaattact
118741 taaagataga aatgaattat ttacaaaatt cattaacgag ttaaaaaaga ccagttcatt
118801 caagataagc aaacgcgata aggatacgct actaaaatat tttacttagg actggagtta
118861 gaatttatag acgactcatt tcgtttatca ttgttactat tattactatt actatcatta
118921 ttagtgttgg cattattagt attcttcttg tcatcttgtt cagaaatata cagcaatgct
118981 atacctaata ctaaatacat tatcatgctc gcaatggctc taacaacaac gaaccaaaat
119041 gaatttggtc gtagcttttg ttcacaaaaa tacataaaga aatgtctaca taaatctatg
119101 gcgccattgg ctacttgaaa tagcgccagt cctcctacag attttaatat agctgtataa
119161 catgacattt attcatcatc aaaagagaca gagtcaccat ctgtcatatt tagatttttt
```

FIG. 23 CONT'D

```
119221 ttcatgtgtt caaagtatcc tctactcatt tcattataat agtttatcat acttagaatt
119281 ttaggacgga tcaatgagta agacttgact agatcgtcag tagtaatttg tgcatcgtct
119341 attctgcatc cgcttcgtcg aataatgtat agcatcgctt tgagattctc catagctatc
119401 aagtctttat acaatgacat ggaaatatct gtgaatactt tatacttctc caacatcgat
119461 gccttaacat catcgcctac tttagcattg aaaatacgtt ctattgtgta gatggatgta
119521 gcaagatttt taaacaacaa tgccatctta cacgatgatt gcctcaagtc tccaatcttt
119581 tgtttagaac gattagctac agagttcaac gcttggctga ctagcatatt attatcttta
119641 gaaattgtat tcttcaatga ggcgtttatc atatctgtga tttcgttagt catattacag
119701 tctgactggg ttgtaatgtt atccaacata tcacctatgg atacggtaca cgtaccagca
119761 tttgtaataa tcctatctaa gatgttgtat ggcattgcgc agaaaatatc ttctcctgta
119821 atatctccac tctcgataaa tctactcaga ttattcttaa atgccttatt ctctggagaa
119881 aagatatcag tgtccatcat ttcattaata gtatacgcag aaaagatacc acgagtatca
119941 attctatcca agatacttat cggttccgag tcacagataa tggtttcctc tccttcggga
120001 gatcctgcat agaaatatct aggacaatag tttctatact gtctgtaact ctgataatct
120061 ctaaagtcac taactgatac catgaaattg agaagatcaa acgctgaagt aatcaatttt
120121 tctgcctcgt ttttactaca actagttttc atcaatgtag cgacgatgta ttgtttagtt
120181 actcttggtc taatactgat gatagagata ttattgcttc ccataatgga tcttctagta
120241 gtcaccttaa agcccattga tgcgaatagc agatagataa agtcttggta tgactccttt
120301 ctaatatagt acggactacc tttgtcaccc aactttatac ccacataagc cataacaacc
120361 tctttaatag ccgtttcatg aggtttatca gccatgagcc tgagtagttg gaagaatctc
120421 atgaatcccg tctcagaaag tcctatatgc atgatagatt tatctttcct gggaaactct
120481 cgtatagtca tagatgaaat actcttcaaa gttttctgaaa taagattagt aacagtctta
120541 cctccgacta ctctgggtaa caaacatact ctaataggtg ttttctctgc ggagataata
120601 tcagaaagga tagagcaata agtagtatta ttgtgattat aaagaccgaa tacataacag
120661 gtagaattta taaacatcat gtcctgaagg tttttagact tgtattcctc gtaatccata
120721 ccgtcccaaa acatggattt ggtaactttg atagccgtag atctttgttc cttcgccaac
120781 aggttaaaga aattaataaa gaatttgttg tttctattta tgtccacaaa ttgcacgttt
120841 ggaagcgcca cggttacatt cactgcagca ttttgaggat cgcgagtatg aagtacgatg
120901 ttattgttta ctggtatatc tggaaagaaa tctaccagtc taggaataag agattgatat
120961 cgcatagaaa tagtaaagtt tataatctca tcatcgaaga gcattttgtt accattgtaa
121021 taaatatcca ctctgtcata tgtataaatg aagtactgtt caaacatgat gagatgtttа
121081 tatgttggca tagtagtgag atcgacgttt ggtaatggca atgtattaag attaactcca
121141 taatgtctag cagcatctgc gatgttataa gcgtcgtcaa agcggggtcg atcttgtatt
121201 gttatatatt gtctaacacc tataagatta tcaaaatctt gtctgcttaa tacaccgtta
121261 acaatttttg ccttgaattc ttttattggt gcattaataa catccttata gaggatgtta
121321 aacaaataag tgttatcaaa gttaagatct ggatatttct tttctgctag aacatccatt
121381 gagtcggagc catctggttt aatataacca ccgataaatc tagctctgta ttctgtatcc
121441 gtcaatctaa tattaagaag gtgttgagtg aaaggtggaa gatcgtaaaa gctgtgagta
121501 ttaatgatag gattagtttc cgaactaatg ttaattgggg tattaataat atctatattt
121561 ccagcgttaa gtgtaacatt aaacagtttt aattcacgtg acgtggtatc aattaaataa
121621 ttaatgccca atttggatat agcagcctga agctcatctt gtttagttac ggatcctaat
121681 gagttattaa gcaatatatc gaacggatga acgaaggttg ttttaagttg gtcacatact
121741 ttgtaatcta gacatagatg cggaagaacg gtagaaacta tacgaaataa atattcagag
121801 tcctctaatt gatcaagagt aactattgac ttaataggca tcatttattt agtattaaat
121861 gacgaccgta ccagtgacgg atatacaaaa cgatttaatt acagagtttt cagaagataa
121921 ttatccatct aacaaaaatt atgaaataac tcttcgtcaa atgtctattc taactcacgt
121981 taacaacgtg gtagatagag aacataatgc cgccgtagtg tcatctccag aggaaatatc
122041 ctcacaactt aatgaagatc tatttccaga tgatgattca ccggccacta ttatcgaacg
122101 agtacaacct catactacta ttattgacga tactccacct cctacttttc gtagagagtt
122161 attgatatcg gaacaacgtc aacaacgaga aaaaagattt aatattacag tatcgaaaaa
122221 tgctgaagca ataatggaat ctagatctat gataacttct atgccaacac aaacaccatc
122281 cttgggagta gtttatgata aagataaaag aattcagatg ttggaggatg aagtggttaa
122341 tcttagaaat caacgatcta atacaaaatc atctgataat ttagataatt ttaccaaaat
122401 actatttggt aagactccgt ataaatcaac agaagttaat aagcgtatag ccatcgttaa
122461 ttatgcaaat ttgaacgggt ctcccttatc agtcgaggac ttggatgttt gttcagagga
122521 tgaaatagat agaatctata aaacgattaa acaatatcac gaaagtagaa aacaaaaaat
122581 tatcgtcact aacgtgatta ttattgtcat aaacattatc gagcaagcat tgctaaaact
```

FIG. 23 CONT'D

122641 cggatttgaa gaaatcaaag gactgagtac cgatatcact tcagaaatta tcgatgtgga
122701 gatcggagat gactgcgatg ctgtagcatc aaaactagga atcggtaaca gtccggttct
122761 taatattgta ttgtttatac tcaagatatt cgttaaacga attaaaatta tttaatttaa
122821 tacattccca tatccagaca acaatcgtct ggattaatct gttcctgtcg tctcataccg
122881 gacgacatat taatcttttt attagtaggc atctttttag atggttcctt tttccagca
122941 ttaactgagt cgatacctag aagatcgtga ttgatctctc cgaccattcc acgaacttct
123001 aattggccgt ctctaacggt accataaact attttaccag cattagtaac agcttggaca
123061 atctgaccat ccatcgcatt gtacgatgta gtagtaactg ttgttctacg tctaggagca
123121 ccagaagtat ttttggagcc cttggaggct gatgtagaag aagacgagga ttttgatttt
123181 ggtttacatg taatacattt tgaactcttt gattttgtat cacatgcgcc ggcagtcaca
123241 tctgtttgag aattaagatt attgttgcct cctttgacgg ctgcatctcc accgatttgc
123301 gctagtagat ttttaagctg tggtgtaatc ttattaactg tttcgatata atcatcgtaa
123361 ctgcttctaa cggctaaatt ttttttatcc gccatttaga agctaaaaat atttttattt
123421 atacagaaga tttaactaga ttatacaatg aactaatatg atccttttcc agattattta
123481 caaacttggt atttttggt tctggaggag gcgaatttaa attcggactt ggattcggat
123541 tttgtgagtt cttgatctta ttatacatcg agtataggat ggcgacggta actgctacac
123601 aaatatccgat caacaaaaga ataccaatca tttattgaca ataagttcac tattgatcaa
123661 gtatgcaata tatcatcttt tcactaaata agtagtaata atgattcaac aatgtcgaga
123721 tatatggacg ataataattt agttcatgga aatatcgcta tgattggtat gaatgactcc
123781 gctaactctg tggggcgcgc agtgcttccc ccacatagaa taaattagca ttccgactgt
123841 gataataata ccaagtataa acgccataat actcaatact ttccatgtac gagtgggact
123901 ggtagactta ctaaagtcaa taaaggcgaa gatacacgaa agaatcaaaa gaatgattcc
123961 agcgattagc acgccggaaa aataatttcc aatcataagc atcatgtcca tttaactaat
124021 aaaaatttta aatcgccgaa tgaacaaagt ggaatataaa ccatataaaa acaatagttt
124081 gtactgcaaa aataatatct atttttgttt tcgaagatat ggtaaaatta aatagtagta
124141 cacagcatgt tataactaac agcagcaacg gctcgtaatt acttatcatt tactagacga
124201 aaaggtggtg ggatattttc ttgctcaaat aatacgaata tatcacccat ccattttatg
124261 cgatgtttat atactctaat ctttaataga tctatagacg acgggtttac caacaatata
124321 gattttatcg attcatctaa tttaaaccct tccttaaacg tgaatgatct attatctggc
124381 ataacgatga ccctacctga tgaatcggac aatgtactgg gccatgtaga ataaattatc
124441 aacgaattat cgtctacgaa catttatatc atttgtttta attttaggac gcgaataaat
124501 agatataaaa tagaaaataa cagatattac aaccagtgtt atggccgcgc ccaaccaggt
124561 aggcagtttt attttatctt ttactacagg ttctcctgga tgtacgtcac caacggcgga
124621 cgtagttcta gtacaattag acgtaagttc cgcttgggaa ttttttaacg ctaaagagtt
124681 aacgttaatc gtgcacccaa cgtatttaca tctagttctt tgaacatctt gattataata
124741 taaccatttt ctatctctag attcgtcggt gcactcatgt aaccaacata ccctaggtcc
124801 taaatatttta tctccggaat tagattttgg ataattcgcg caccaacaat ttctatttcc
124861 tttatgatcg ttacaaaaga cgtataatgc cgtatcccca aaagtaaaat aatcaggacg
124921 aataattcta ataaactcag aacaatatct cgcatccata tgtttggagc aaatatcgga
124981 ataagtagac atagccggtt tccgttttgc acgtaaccat tctaaacaat tggggtttcc
125041 aggatcgttt ctacaaaatc cagtcatgaa atcgtcacaa tgttctgtct tgtaattatt
125101 attaaatatt tttggacagt gtttggtatt tgtcttagaa caacattttg ccacgctatc
125161 actatcgccc aggagataat ccttttttat aaaatgacat cgttgcccgg atgctatata
125221 atcagtagcg tgttttaaat ccttaatata ttcaggagtt acctcgttct gataatagat
125281 taatgatcca ggacgaaatt tgaaagaact acatggttct ccatgaatta atacatattg
125341 tttagcaaat tcaggaacta taaaactact acaatgatct atcgacatac catctatcaa
125401 acaaaacttg ggtttaattt ctcccggaga tgtttcataa tagtacgtat aacttttttc
125461 tgcaaactta acagctctat tatattcagg ataattaaaa cctaattcca tatatttgtc
125521 tcgtatatct gctattcctg gtgctatttt gattctatta agagtaacag ctgccccccat
125581 tcttaataat cgtcagtatt taaactgtta aatgttggta tatcaacatc taccttattt
125641 cccgcagtat aaggtttgtt gcaggtatac tgttcaggaa tggttacatt tatacttctt
125701 ctatagtcct gtctttcgat gttcatcaca tatgcaaaga acagaataaa caaaataatg
125761 taagaaataa tattaaatat ctgtgaattc gtaaatacat tgattgccat aataattaca
125821 gcagctacaa tacacacaat agacattccc acagtgttgc cattacctcc acgatacatt
125881 tgagttacta agcaataggt aataactaag ctagtaagag gcaatagaaa agatgagata
125941 aatatcatca atatagagat tagaggaggg ctatatagag ccaagacgaa caaaatcaaa
126001 ccgagtaacg ttctaacatc attatttttg aagattccca aataatcatt cattcctcca

FIG. 23 CONT'D

```
126061 taatcgtttt gcatcataco tccatctita ggcataaacg attgctgctg ttcctctgta
126121 aataaatctt tatcaagcac tccagcaccc gcagagaagt cgtcaagcat attgtaatat
126181 cttaaataac tcatttatat attaaaaaat gtcactatta aagatggagt ataatcttta
126241 tgccgaacta aaaaaaatga cttgtggtca acccctaagt ctttttaacg aagacgggga
126301 tttcgtagaa gttgaaccgg gatcatcctt taagtttctg atacctaagg gattttacgc
126361 ctctccttcc gtaaagacga gtctagtatt tgaaacatta acaacgaccg ataataaaat
126421 cactagtatc aatccaacaa atgcgccaaa gttatatcct cttcaacgca aagtcgtatc
126481 tgaagtagtt tctaatatga ggaaaatgat cgaatcaaaa cgtcttctat acattactct
126541 tcacttggcg tgtggatttg gtaagactat taccacgtgt tatcttatgg ctacacacgg
126601 tagaaaaacc gtcatttgcg tacccaataa aatgttaata catcaatgga agacacaggt
126661 agaggcagtc ggattggaac ataagatatc catagatgga gtaagtagtc tattaaagga
126721 actaaagact caaagtccgg atgtattaat agtagtcagt agacatctga caaacgatgc
126781 cttttgtaaa tatatcaata agcattatga tttgttcatc ttggatgaat cacatacgta
126841 taatctgatg aacaatacag cagttacaag atttttagcg tatttatcct cgatgatgtg
126901 ttatttttta actgctacac ctagaccagc taaccgaatt tattgtaaca gtattattaa
126961 tattgccaag ttatccgatc taaaaaaaac tatctatgcg gtagatagtt tttttgagcc
127021 atattccaca gacaatatta gacatatggt aaaacgacta gatggaccat ctaataaata
127081 tcatatatat accgagaagt tattatctgt agacgagcct agaaatcaac ttattcttaa
127141 taccctggta gaagaattca agtcaggaac tattaatcgc attttagtta ttactaaact
127201 acgtgaacat atggtattat tctacaaacg attattagat cttttcggac cagaggttgt
127261 atttatagga gacgcccaaa atagacgtac tccagatatg gtcaaatcaa tcaaggaact
127321 aaatagattt atattcgtat ccaccttatt ttattccggt actggtttag atattcctag
127381 tttggattcg ttgttcattt gctcggcagt aatcaacaat atgcaaatag agcaattact
127441 agggagggta tgtcgagaaa cagaactatt agataggacg gtatatgtat ttcctaacac
127501 atccatcaaa gaaataaagt acatgatagg aaatttcatg caacgaatta ttagtctgtc
127561 tgtagataaa ctaggattta aacaagaaag ttatcggaaa catcaagaat ccgatcccac
127621 ttctgtatgt acaacatcct ccagagaaga acgtgtatta aatagaatat ttaactcgca
127681 aaatcgttaa gaagtttaag cgacgatccg catgctgcgc aggccagtgt attacccctc
127741 atagtattaa tataatccaa tgatactttt gtgatgtcgg aaatcttaac caatttagac
127801 tgacaggcag aacacgtcat gcaatcatca tcgtcatcga taactgtagt cttgggcttc
127861 tttttgcggc tcttcattcc ggaacgcaca ttggtgctat ccatttaggt agtaaaaaat
127921 aagtcagaat atgccctata acacgatcgt gcaaaacctg gtatatcgtc tctatcttta
127981 tcacaatata gtgtatcgac atctttatta ttattgacct cgtttatctt ggaacatgga
128041 atgggaacat ttttgttatc aacggccacc tttgccttaa ttccagatgt tgtaaaatta
128101 taactaaaca gtctatcatc gacacaaatg aaattcttgt ttagacgttt gtagtttacg
128161 tatgcggctc gttcgcgtct catttttca gatattgcag gtactataat attaaaaata
128221 agaatgaaat aacataggat taaaaataaa gttatcatga cttctagcgc tgatttaact
128281 aacttaaaag aattacttag tctgtacaaa agtttgaaat tttcagattc tgcggctata
128341 gaaaagtata attctttggt agaatgggga acatctactt actggaaaat aggcgtgcaa
128401 aaggtagcta atgtcgagac gtcaatatct gattattatg atgaggtaaa aaataaaccg
128461 tttaatattg atccgggcta ttacattttc ttaccggtat attttgggag cgtctttatt
126521 tattcgaagg gtaaaaatat ggtagaactt ggatctggaa actcttttca aataccagat
128581 gatatgcgaa gtgcgtgtaa caaagtatta gacagcgata acggaataga ctttctgaga
128641 tttgttttgt taaacaatag atggataatg gaagatgcta tatcaaaata tcagtctcca
128701 gttaatatat ttaaactagc tagtgagtac ggattaaaca tacccaaata tttagaaatt
128761 gaaatagagg aagacacatt atttgacgac gagttatact ctattataga acgctctttt
128821 gatgataaat ttccaaaaat atccatatcg tatattaagt tgggagaact taggcggcaa
128881 gttgtagact ttttcaaatt ctcgttcatg tatattgagt ccatcaaggt agatcgtata
128941 ggagataata ttttttattcc tagcgttata acaaaatcag gaaaaaagat attagtaaaa
129001 gatgtagacc atttaatacg atctaaggtt agagaacata catttgtaaa agtaaaaaag
129061 aaaaaacacat tttccatttt atacgactat gatgggaacg gaacagaaac tagaggagaa
129121 gtaataaaac gaattataga cactatagga cgagactatt atgttaacgg aaagtatttc
129181 tctaaggttg gtagtgcagg cttaaagcaa ttgactaata aattagatat taatgagtgc
129241 gcaactgtcg atgagttagt tgatgagatt aataaatccg gaactgtaaa acgaaaaata
129301 aaaaaccaat cagcatttga tttaagcaga gaatgtttgg gatatccaga agcagatttt
129361 ataacgttag ttaataacat gcggttcaaa atagaaaatt gtaaggttgt aaatttcaat
129421 attgaaaata ctaattgttt aaataacccg agtattgaaa ctatatatgg aaactttaac
```

FIG. 23 CONT'D

```
129481 cagttcgtct caatctttaa tatcgtcacc gatgtcaaaa aaagattatt cgagtgaaat
129541 aatatgcgcc tttgatatag gtgcaaaaaa tcctgccaga actgttttag aagtcaagga
129601 taactccgtt agggtattgg atatatcaaa attagactgg agtttctgatt gggaaaggcg
129661 catagctaaa gatttgtcac aatatgaata cactacagtt cttctagaac gtcagcctag
129721 aaggtcgccg tatgttaaat ttatctattt tattaaaggc tttttatatc atacatcggc
129781 tgccaaagtt atttgcgtct cgcctgtcat gtctggtaat tcatatagag atcgaaaaaa
129841 gagatcggtc gaagcatttc ttgattggat ggacacatto ggattgcgag actccgttcc
129901 ggatagacgc aaattagacg atgtagcgga tagtttcaat ttggctatga gatacgtatt
129961 agataaatgg aatactaatt atacacctta taataggtgt aaatctagaa attacataaa
130021 aaaaatgtaa taacgttagt aacgccatta tggataatct atttaccttt ctacatgaaa
130081 tagaagatag atatgccaga actatttta actttcatct aataagttgc gatgaaatag
130141 gagatatata tggtcttatg aaagaacgca tttcctcaga ggatatgttt gataatatag
130201 tatataataa agatatacat cctgccatta agaaactagt gtattgcgac atccaacttа
130261 ctaaacacat tattaatcag aatacgtatc cggtatttaa cgattcttca caagtgaaat
130321 gttgtcatta tttcgacata aactcagata atagcaatat tagctctcgt acagtagaga
130381 tatttgagag ggaaaagtca tctcttgtat catatattaa aactaccaat aagaagagaa
130441 aggtcaatta cggcgaaata aagaaaactg ttcatggagg cactaatgca aattactttt
130501 ccggtaaaaa gtctgacgag tatctgagta ctacagttag atccaacatt aatcaacctt
130561 ggatcaaaac catttctaag agaatgagag tagatatcat taatcactct atagtaacgc
130621 gtggaaaaag ctctatatta caaactatag aaattatttt tactaataga acatgtgtga
130681 aaatattcaa ggattctact atgcacatta ttctatccaa ggacaaggat gaaaaggggt
130741 gtatacacat gattgacaaa ttattctatg tctattataa tttatttctg ttgttcgaag
130801 atatcatcca aaacgagtac tttaaagaag tagctaatgt tgtaaaccac gtacttacgg
130861 ctacggcatt agatgagaaa ttattcctaa ttaagaaaat ggctgaacac gatgtttatg
130921 gagttagcaa tttcaaaata gggatgttta acctgacatt tattaagtcg ttggatcata
130981 ccgttttccc ctctctgtta gatgaggata gcaaaataaa gttttttaag gggaaaaagc
131041 tcaatattgt agcattacga tctctggagg attgtataaa ttacgtgact aaatccgaga
131101 atatgataga aatgatgaag gaaagatcga gtattttaaa tagcatagat atagaaacgg
131161 aatcggtaga tcgtctaaaa gaattgcttc taaaatgaaa aaaaacactg attcagaaat
131221 ggatcaacga ctagggtata agttttggt gcctgatcct aaagccggag ttttttatag
131281 accgttacat ttccaatatg tatcgtattc taatttttata ttgcatcgat tgcatgaaat
131341 cttgaccgtc aagcggccac tctttatcgtt taagaataat acagaacgaa ttatgataga
131401 aattagcaat gttaaagtga ctcctccaga ttactcacct ataatcgcga gtattaaagg
131461 taagagttat gatgcattag ccacgttcac tgtaaatatc tttaaagagg taatgaccaa
131521 agagggtata tccatcacta aaataagtag ttatgaggga aaagattctc atttgataaa
131581 aattccgcta ctaataggat acgggaataa aaatccactt gatacagcca agtatcttgt
131641 tcctaatgtc ataggtggag tctttatcaa taaacaatct gtcgaaaaag taggaattaa
131701 tctagtagaa aagattacaa catggccaaa atttagggtt gttaagccaa actcattcac
131761 tttctcgttt tcctccgtat ccccttctaa tgtattaccg acaagatatc gccattacaa
131821 gatatctctg gatatatcac aattggaagc gttgaatata tcatcgacaa agacatttat
131881 aacggtcaat attgttttgc tgtctcaata tttatctaga gtgagtctag aattcattag
131941 acgtagttta tcatacgata tgcctccaga agttgtctat ctagtaaacg cgataatага
132001 tagtgctaaa cgaattactg aatctattac tgactttaat attgatacat acattaatga
132061 cctggtggaa gctgaacaca ttaaacaaaa atctcagtta acgatcaacg agttcaaata
132121 tgaaatgctg cataacttтt tacctcatat gaactataca cccgatcaac taaagggatt
132181 ttatatgata tctttactaa gaaagtttct ctactgtatc taccacactt ctagatatcc
132241 agatagagat tcgatggttt gtcatcgcat cctaacgtac ggcaaatatt ttgagacgtt
132301 ggcacatgat gaattagaga attacatagg caacatccga aacgatatca tgaacaatca
132361 caagaacaga ggcacttacg cggtaaacat tcatgtacta acaactcccg gacttaatca
132421 cgcgtttttct agcttattga gtggaaagtt caaaaagtca gacggtagtt atcgaacaca
132481 tcctcactat tcatggatgc agaatatttc tattcctagg agtgttggat tttatccgga
132541 tcaagtaaag atttcaaaga tgttttctgt cagaaaatac catccaagtc aatatcttta
132601 cttttgttca tcggacgttc cggaaagagg tcctcaggta ggtttagtat ctcaattgtc
132661 tgtcttgagt tccattacaa atatactaac gtctgagtat ttggatttgg aaaagaaaat
132721 ttgtgagtat atcagatcat attataaaga tgatataagt tactttgaaa caggatttcc
132781 aatcactata gaaaatgctc tagtcgcatc tcttaatcca aatatgatat gtgattttgt
132841 aactgacttt agacgtagaa aacggatggg attcttcggt aacttggagg taggtattac
```

FIG. 23 CONT'D

132901 tttagttagg gatcacatga atgaaattcg cattaatatt ggagcgggaa gattagtcag
132961 accattcttg gttgtggata acggagagct catgatggat gtgtgtccgg agttagaaag
133021 cagattagac gacatgacat tctctgacat tcagaaagag tttccgcatg tcatcgaaat
133081 ggtagatata gaacaattta cttttagtaa cgtatgtgaa tcggttcaaa aatttagaat
133141 gatgtcaaag gatgaaagaa agcaatacga tttatgtgac tttcctgccg aatttagaga
133201 tggatatgtg gcatcttcat tagtgggaat caatcacaat tctggaccca gagctattct
133261 tggatgtgct caagctaaac aagctatctc ttgtctgagt tcggatatac gaaataaaat
133321 agacaatgga attcatttga tgtatccaga gaggccaatc gtgattagta aggctttaga
133381 aacttcaaag attgcggcta attgcttcgg ccaacatgtt actatagcat taatgtcgta
133441 caaaggtatc aatcaagagg atggaattat catcaaaaaa caatttattc agagaggcgg
133501 tctcgatata gttaccgcaa agaaacatca agtagaaatt ccgttggaaa actttaataa
133561 caaagaaaga gataggtcta acgcctattc aaaattagaa agtaatggat tagttagact
133621 gaatgctttc ttggaatccg gagacgctat ggcacgaaat atctcatcaa gaactcttga
133681 agatgatttt gctagagata atcagattag cttcgatgtt tccgagaaat ataccgatat
133741 gtacaaatct cgcgttgaac gagtaccagt agaacttact gacaaagtta aggtacgagt
133801 attaaccatg aaagaaagaa gacccattct aggagataaa tttaccacta gaacgagtca
133861 aaagggaaca gtcgcgtatg tcgcggatga aacggaactt ccatacgacg aaaatggtat
133921 cacaccagat gtcattatta attctacatc catcttctct agaaaaacta tatctatgtt
133981 gatagaggtt attttaacag ccgcatattc tgctaagccg tacaacaata agggagaaaa
134041 ccgacctgtc tgttttccta gtagtaacga aacatccatc gatacatata tgcaattcgc
134101 taaacaatgt tatgagcatt caaatccgaa attgtccgat gaagaattat cggataaaat
134161 cttttgtgaa aagattctct atgatcctga aacggataag ccttatgcat ccaaagtatt
134221 ttttggacca atttattact tgcgtctgag gcatttaact caggacaagg caaccgttag
134281 atgtagaggt aaaaagacga agctcattag acaggcgaat gagggacgaa aacgtggagg
134341 aggtatcaag ttcggagaaa tggagaggga ctgtttaata gcgcatggcg cagccaatac
134401 tattacagaa gttttaaaag actcagaaga ggattatcaa gatgtgtatg tttgtgaaaa
134461 ttgtggagac atagcagcac aaatcaaggg tattaataca tgtcttagat gttcaaaact
134521 taatctctct cctctcttaa caaaaattga taccacgcac gtatctaaag tatttcttac
134581 tcaaatgaac gccagaggcg taaaagtcaa attagatttc gaacgaaggc ctccttcgtt
134641 ttataaacca ttagataaag ttgatctcaa gccgtctttt ctggtgtaat attctagttt
134701 ggtagtagat acatatcaat atcatcaaat tcgagatccg aattataaaa tgggcgtgga
134761 ttgttaacta tagaatcgga cgtctgatat tcgaaaatct gtggagtttt aggttttggt
134821 ggaggtgtaa ctgctacttg ggatactgaa gtctgatatt cagaaagctg ggggatgttc
134881 tggttcgaca tccaccgatg gtgtcacatc actaatcggt tcggtaacgt ctgtggatgg
134941 aggtgctact tctacagaac ctgtagccta agttgtcaac ggagatacat ttttaatgcg
135001 aggaaatgta taatttggta atggtttctc atgtggatct gaagaagagg taagatatct
135061 actagaaaga taccgatcac gttctagttc tcttttgtag aacttaactt tttctttctc
135121 agcatctagt tgatattcca acctcttcac gttactacgt tcagattcca attcacgttc
135181 gcatgggtta cctccgcagt ttttacgagc gatttcacgt tcagccttca tgcgtctctc
135241 cttctctcta tcgagtttat cagagcagtc tttctgaagg cgatcgaact ccataaattt
135301 ctccaacgct ttgattgttt ccatagattt ccgaagttca gcttttagga ctgtgattct
135361 ttttctttcg aattcacagc tggatgtgca accgtttcca ttaccgccat ctctaagttt
135421 cttttctaga tcggcaacat ttcatcccca tgccttttac attcctcgag tctactgtcg
135481 tcgaaatatc gttccagctc cttttcgaca tcaataactt tagcacgttg tctctcaagc
135541 tctcttttgt agttatctga ttcccctggca cgtttaagat cttcatgcaa ttgagtcagc
135601 tcttaacaca atctcttgct tcttcgtcat agtacttaca atcactatgg gatccattgt
135661 taccacgtct acactcggcg agctcgcgtt taagagattc aatttcccgt ttgtattggt
135721 ccatgtttcc attgctacca ccattagatt tacaggctgc tagttgtcgt tcgagatcag
135781 aaatacgggt tttcttggaa ttgatttcgt cgatgtactt ggcatcgaaa cacttattaa
135841 gttctttttc caattctacg attttatttc tttcgcgagt caattccctc ctgtagtaac
135901 tatctgtttt gtcagattca cgctctctac gtagactttc ttgcaagtta ctaatttgtt
135961 ccctagcacg tccgagttta gttttatatg ctgaatagag ttctgattca tcctttgagc
136021 agatctctag cgatcgttta agattcctga ttctagtctt tagcctattt acctcctcag
136081 aagatgttcc gttaccgttg cgtttacact cgttaagctg tctatcaaga tccatgattc
136141 tatctctaag acgttgcatc tctctttcca tatcagcatt gctttcatta ttacgtctgc
136201 agtcactcaa ctgtctttca atatctgaga ttctatctct aagacgtcgc atctctctct
136261 gtttccgcat tggtttcatt attacgtcta cagtcgttca actgtctttc aagatctgat

FIG. 23 CONT'D

```
136321 attctagatt ggagtctgct aatctctgta gcattttcac ggcattcact cagttgtctt
136381 tcaagatctg agattttaga ttggagtctg ctaatctctg taagatttcc tcctccgctc
136441 tcgatgcagt cggtcaactt attctctagt tctctaatac gcgaacgcag tgcatcaact
136501 tcttgcgtgt cttcctggtt gcgtgtacat tcatcgagtc tagattcgag atctctaacg
136561 cgtcgtcgtt cttcctcaag ttctctgcgt actacagaaa gcgtgtccct atcttgttga
136621 tatttagcga tttctgattc tagagtactg attttgctta cgtagttact aatagttgtc
136681 ttggccttat caagatcctc cttgtatttg tcgcattcct tgatatccct acgaagtctg
136741 gacagttccc attcgacatt acgacgttta tcgatttcag ctcggagatc gtcatcgcgt
136801 tgttttagcc acatacgact gagttcaagt tctcgttgac aagatccatc tacttttcca
136861 ttcctaatag tatccagttc cttttctagt tctgaacgca tttctcgttc cctatcaagc
136921 gattctctca attctcggat agtcttctta tcaatttcta ataaatctga accatcatct
136981 gtcccatttt gaatatccct gtgttctttg atctcttttg taagtcggtc gattctttcg
137041 gttttataaa cagaatccct ttccaaagtc ctaatcttac tgagtttatc actaagttct
137101 gcattcaatt cggtgagttt tctcttggct tcttccaact ctgttttaaa ctctccacta
137161 tttccgcatt cttcctcgca tttatctaac cattcaatta gtttattaat aactagttgg
137221 taatcagcga ttcctatagc cgttcttgta attgtgggaa cataattagg atcttctaat
137281 ggattgtatg gcttgatagc atcatcttta tcattattag ggggatggac aaccttaatt
137341 ggttggtcct catctcctcc agtagcgtgt ggttcttcaa taccagtgtt agtaataggc
137401 ttaggcaaat gcttgtcgta cgcgggcact tcctcatcca tcaagtattt ataatcgggt
137461 tctacgtctg aatattcttt tctaagagac gcgacttcgg gagttagtag aagaactctg
137521 tttctgtatc tatcaacgct ggaatcaata ctcaagttaa ggatagcgaa tacctcatcg
137581 tcatcatccg tatcttctga aacaccatca tatgacattt catgaagtct aacgtattga
137641 taaatagaat cagatttagt attaaacaga tccttaacct ttttagtaaa cgcatatgta
137701 tattttagat ctccagattt cataatatga tcacatgcct taaatgtcag tgcttccatg
137761 atataatctg gaacactaat gggtgacgaa aaagatacag caccatatgc tacgttgata
137821 aataaatctg aaccactaag tagataatga ttaatgttaa ggaagaggaa atattcagta
137881 tatagatatg ccttagcatc atatcttgta ctaaacacgc taaacagttt attgatgtga
137941 tcaatttcca acagaataat tagagcagcg ggaataccaa caaacatatt accacatccg
138001 tattttctat gaatatcaca tatcatgtta aaaaatcttg atagaagagc gaatatctcg
138061 tctgacttaa tgagtcgtag ttcagcagca acataagtca taactgtaaa tagaacatac
138121 tttcctgtag tgttgattct agactccaca tcaacaccat tattaaaaat agttttatat
138181 acatctttaa tctgctctcc gttaatcgtc gaacgttcta gtatacggaa acactttgat
138241 ttcttatctg tagttaatga cttagtgata tcacgaagaa tattacgaat tacatttctt
138301 gtttttcttg agagacctga ttcagaactc aactcatcgt tccatagttt ttttacctca
138361 gtggcgaaat ctttggagtg cttggtacat ttttcaataa ggttcgtgac atccatttat
138421 tataaaaaat tttattcaaa acttaactac aatcgggtaa ttataaaatc gtagatctcc
138481 catgtggtgg aatactacca tctatcgcat gtggatggac agtaggtaat ggccatggga
138541 acagtaatgt ttgcatattt atctttcttg ccagtattac tgcatattgt cccaatgttt
138601 cgatgtgatg ttctaaccta tcaactgccg ctgtatcaca acaatagtgt ccgatgaaat
138661 taagattatg atccaatgtg tttaatatat gattatcaag tcttatacga tccgcgtctt
138721 ttttgacagg atcaggttct tctacaggaa gaagtttcgg cctcttatga tattcatgtc
138781 tgggaaacgg tggtctaggg tgaggctccg gtatcggagt gggttttgga ttataatcat
138841 catcgtctat gacatcatct tcgacttcga tatttatttt gctatcttga tgatgtcctg
138901 tatcagttgc attttcagca ctcgactgaa tattagcgca ttcattgtct attattacca
138961 tatttctaaa cccaaaatgt atgtgttgaa catcagtact atcgttgatg agtcttatag
139021 catgaattcg cttatcgtta tcgggtttat ctttctgtcac cttagcaatt cctttttttat
139081 taaactctac ataatcatat ccatttctat tgtttgttct aatataaacg agtatagcat
139141 cattgctaaa ttttttcaata gtatcgaaaa cagaatatcc taaaccatat aatatatatt
139201 cagggacact caaactaaat gtccaggatt ctcctaaata cgtaaacttt aatagtgcga
139261 aatcattcaa aaatctacca cttatagata gatagtacat aaatgcgtat agtagtctac
139321 ctatctcttt attatgaaaa ccggcattac gatcatatat gtcgtgatat acctgtgatc
139381 cgtttacgtt aaaccataaa tacatgggtg atcctataaa catgaattta tttctaattc
139441 tcagagctat agttaattga ccgtgtaata tttgcttaca tgcatacttg atacgctcat
139501 taataaaatt tttatcattg ctcgttatct cagaatcgta tatataagga gtaccatcgt
139561 gattcttacc agatattata caaaatacta tatataaaat atattgacca acgttagtaa
139621 tcatataaat gtttaacgtt ttaaattttg tattcaatga tccattatca tacgctagca
139681 tggtcttatg atattcattc tttaaaatat aatattgtgt tagccattgc attgggggctc
```

FIG. 23 CONT'D

```
139741 ctaatggaga ttttttattc tcatccattt taggataggc tttcataaag tccctaataa
139801 cttcgtgaat aatgtttcta tgtttttctac tgatgcatgt atttgcttcg attttttttat
139861 cccatgtttc atctatcata gatttaaacg cagtaatgct cgcaacatta acatcttgaa
139921 ccgttggtac aattccgttc cataaattta taatgttcgc catttatata actcattttt
139981 tgaatatact ttttaattaac aaaagagtta agttactcat atgggcgccg tccagtctga
140041 acatcaatct ttttagccag agatatcata gccgctctta gagtttcagc gtgatttttcc
140101 aacctaaata gaacttcatc gttgcgttta caacactttt ctatttgttc aaacttttgtt
140161 gttacattag taatcttttt ttccaaatta gttagccgtt gtttgagagt ttcctcattg
140221 tcgtcttcat cggctttaac aattgcttcg cgtttagcct ctggcttttt agcagccttt
140281 gtagaaaaaa attcagttgc tggaattgca agatcgtcat ctccggggaa aagagttccg
140341 tccatttaaa gtacagattt tagaaactga cactctgcgt tatttatatt tggtacaaca
140401 catggattat aaatatcgat gttaataaca tcagaaaatg taaagtctat acattgttgc
140461 atcgtgttaa attttctaat ggatctagta ttattgggtc caacttctgc ctgaaatcca
140521 aatatggaag cggatacaaa accgtttcct ggataaacca cacatctcca cttttgcttt
140581 acatcagaaa ttgtgtcgtt gacatcttga actctcctat ctaatgccgg tgttccacct
140641 atagattttg aatattcgaa tgctgcatga gtagcattaa attccttaat attgccataa
140701 ttttcatata ttgagtaacc ctggataaaa agtaaaacaca ccgcagccgt cgctaccaca
140761 ataaaaaaaa ttgatagaga gttcatttat aatctattag aagctgacaa aatttttta
140821 cacgcatcag acaatgcttt aataaatagt tcaaacatcta cttttgtcat atcgaaccga
140881 tggtatgatt ctaacctaga attacatccg aaaaagttga ctatgttcat agtcattaag
140941 tcattaacaa acaacattcc agactctgga ttataagacg atactgtttc gtcacaatta
141001 cctaccttaa tcatgtgatt atgaatattg gctattagag caccttctaa gaaatctata
141061 atatctttga aacacgattt aaaatcaaac cacgaatata cttctacgaa gaaagttagt
141121 ttacccatag gagaaataac tataaatgga gatctaaata caaaatccgg atctatgata
141181 gttttaacat tattatattc tctattaaat acctccacat ctaaaaatgt taattttgaa
141241 actatgtctt cgtttattac cgtacctgaa ctaaacgcta taagctctat tgtttgagaa
141301 ctctttaaac gatattcttg aaatacatgt aacaaagttt cctttaactc ggtcggttta
141361 tctaccatag ttacagaatt tgtatcctta tctataatat aataatcaaa atcgtataaa
141421 gttatataat tatcgcgttc agattgggat cttttcaaat agactaaaaa ccccatttct
141481 ctagtaagta tcttatgtat atgtttgtaa aatatcttca tggtgggaat atgctctacc
141541 gcagttagcc attcctcatt gacagcggta gatgtattag acaaaactat tccaatgttt
141601 aacaagggcc attttacgag attattaaat ccttgtttga taaatgtagc caatgagggt
141661 tcgagttcaa cgacgattga atttctcttcc cgcggatgct gcatgatgaa cgacgggatg
141721 ttgttcgatt gatttggaat tctttttcga cttttttgttt atattaaata ttttaaaatt
141781 tatagcggat agcaattcat gtaccacgga taatgtagac gcgtattgcg catcgatatc
141841 tttattatta gataaattta tcaataaatg tgagaagttt gcctcgttaa ggtcttccat
141901 ttaaatatta tataaacatt tgtgtttgta tcttattcgt cttttatgga atagtttttt
141961 actagtaaag ctgcaattac acactttgtc cgtaaaacat aaatataaac accagctttt
142021 atcaatcgtt ccaaaaagtc gacggcggac atttttaaca tggcatctat tttaaatata
142081 cttaggtttt tggaaaaaac atcattttat aattgtaacg attcaataac taaagaaaag
142141 attaagatta aacataaggg aatgtcattt gtattttata agccaaagca ttctaccgtt
142201 gttaaatact tgtctggagg aggtatatat catgatgatt tggttgtatt ggggaaggta
142261 acaattaata atctaaagat gatgctattt tacatggatt tatcatatca tggagtgaca
142321 agtagtggag caatttacaa attgggatcg tctatcgata gactttctct aaataggact
142381 attgttacaa aagttaataa ttatgatgat acatttttg acgacgatga ttgatcgcta
142441 ttgcacaatt ttgtttttct actttctaat atagcgttta gattcttttt catgtgcgaa
142501 tattgattta ctaaaatatc gatgtttaac ttttgttcta tgacgtcctt atcagcggta
142561 tcggtacata tacgtaattc accttcacaa aatacggagt cttcgataat aatagccaat
142621 cgattattgg atctagctgt ctgtatcata ttcaacatgt ttaatatatc ctttcgtttc
142681 ccctttacag gcatcgatcg tagcatattt tccgcgtctg agatggaaat gttaaaacta
142741 caaaaatgcg taatgttagc ccgtcctaat attggtacgt gtctataagt ttggcatagt
142801 agaataatag acgtgtttaa atgccttcca aagttaaaga attctattag agtattgcat
142861 tttgatagtt tatcacctac atcatcaaaa ataagtaaaa agtgtgctga ttttttatga
142921 ttttgtgcga cagcaatata tttttctatg ttacttttag ttcgtatcag attatattct
142981 agagattcct gactactaac gaaattaata tgatttggcc aaatgtatcc atcataatct
143041 gggttataaa cgggtgtaaa caagaatata tgtttatatt ttttaactag tgtagaaaac
143101 agagatagta aatagatagt ttttccagat ccagatcctc ccgttaaaac cattctaaac
```

FIG. 23 CONT'D

143161 ggcatttttа ataaaattttc tcttgaaaat tgtttttctt ggaaacaatt cataattata
143221 tttacagtta ctaaattaat ttgataataa atcaaaatat ggaaaactaa ggtcgttagt
143281 agggaggaga acaaagaagg cacatcgtga cataaataac atttattatc atgatgacac
143341 cagaaaacga cgaagagcag acatctgtgt tctccgctac tgtttacgga gacaaaattc
143401 aaggaaagaa taaacgcaaa cgcgtgattg gtctatgtat tagaatatct atggttattt
143461 cactactatc tatgattacc atgtccgcgt ttctcatagt gcgcctaaat caatgcatgt
143521 ctgctaacga ggctgctatt actgacgccg ctgttgccgt tgctgctgca tcatctactc
143581 atagaaaggt tgcgtctagc actacacaat atgatcacaa agaaagctgt aatggtttat
143641 attaccaggg ttcttgttat atattacatt cagactacca gttattctcg gatgctaaag
143701 caaattgcac tgcggaatca tcaacactac ccaataaatc cgatgtcttg attacctggc
143761 tcattgatta tgttgaggat acatggggat ctgatggtaa tccaattaca aaaactacat
143821 ccgattatca agattctgat gtatcacaag aagttagaaa gtatttttgt gttaaaacaa
143881 tgaactaata tttatttttg tacattaata aatgaaatcg cttaatagac aaactgtaag
143941 taggtttaag aagttgtcgg tgccggccgc tataatgatg atactctcaa ccattattag
144001 tggcatagga acatttctgc attacaaaga agaactgatg cctagtgctt gcgccaatgg
144061 atggatacaa tacgataaac attgttattt agatactaac attaaaatgt ctacagataa
144121 tgcggtttat cagtgtcgta aattacgagc cagattgcct agaccggata ctagacatct
144181 gagagtattg tttagtattt tttataaaga ttattgggta agtttaaaaa agaccaatga
144241 taaatggtta gatattaata atgataaaga tatagatatt agtaaattaa caaattttaa
144301 acaactaaac agtacgacgg atgctgaagc gtgttatata tacaagtctg gaaaactggt
144361 taaaacagta tgtaaaagta ctcaatctgt actatgtgtt aaaaaattct acaagtgaca
144421 acaaaaaatg aattaataat aagtcgttaa cgtacgccgc catggacgcc gcgtttgtta
144481 ttactccaat gggtgtgttg actataacag atacattgta tgatgatctc gatatctcaa
144541 tcatggactt tataggacca tacattatag gtaacataaa aactgtccaa atagatgtac
144601 gggatataaa atattccgac atgcaaaaat gctactttag ctataagggt aaaatagttc
144661 ctcaggattc taatgatttg gctagattca acatttatag catttgtgcc gcatacagat
144721 caaaaaatac catcatcata gcatgcgact atgatatcat gttagatata gaagataaac
144781 atcagccatt ttatctattc ccatctattg atgtttttaa cgctacaatc atagaagcgt
144841 ataacctgta tacagctgga gattatcatc taatcatcaa tccttcagat aatctgaaaa
144901 tgaaattgtt gtttaattct tcattctgca tatcagacgg caatggatgg atcataattg
144961 atgggaaatg caatagtaat tttttatcat aaaagttgta aagtaaataa taaaacaata
145021 aatattgaac tagtagtacg tatattgagc aatcagaaat gatgctggta cctcttatca
145081 cggtgaccgt agttgcggga acaatattag tatgttatat attatatatt tgtaqgaaaa
145141 agatacgtac tgtctataat gacaataaaa ttatcatgac aaaattaaaa aagataaaga
145201 gttctaattc cagcaaatct agtaaatcaa ctgatagcga atcagactgg gaggatcact
145261 gtagtgctat ggaacaaaac aatgacgtag ataatatttc taggaatgag atattggacg
145321 atgatagctt cgctggtagt ttaatatggg ataacgaatc caatgtcatg gcgcctagca
145381 cagaacacat ttacgatagt gttgctggaa gcacgctgct aataaataat gatcgtaatg
145441 aacagactat ttatcagaac actacagtag taattaatga gacggagact gttgaagtac
145501 ttaatgaaga taccaaacag aatcctaact attcatccaa tcctttcgta aattataata
145561 aaaccagtat ttgtagcaag tcaaatocgt tcattacaga actcaacaat aaatttagtg
145621 agaataatcc gtttagacga gcacatagcg atgattatct taataagcaa gaacaagatc
145681 atgaacacga tgatatagaa tcatcggtcg tatcattggt gtgattagtt tcctttttat
145741 aaaattgaag taatatttag tattattgct gcogtcacgt tgtacaaatg gagatattcc
145801 ctgtattcgg catttctaaa attagcaatt ttattgctaa taatgactgt agatattata
145861 tagatacaga acatcaaaaa attatatctg atgagatcaa tagacagatg gatgaaacgg
145921 tacttcttac caacatctta agcgtagaag ttgtaaatga caatgagatg taccatctta
145981 ttccccatag actatcgact attatactct gtattagttc tgtcggagga tgtgttatct
146041 ctatagataa tgacatcaat gacaaaaata ttctaacatt tcccattgat catgctgtaa
146101 tcatatcccc actgagtaaa tgtgtcgtag ttagcaaggg tcctacaacc atattggttg
146161 ttaaagcgga tatacccagc aaacgattgg taacatcgtt tacaaacgac atactgtatg
146221 taaacaatct gtcactgatt aattatttgc cgttgtctgt attcattatt agacgagtca
146281 ccgactattt ggatagacac atatgcgatc agatatttgc gaataataag tggtattcca
146341 ttataaccat cgacgataag caatatccta ttccatcaaa ctgtataggt atgtcctctg
146401 ccaagtacat aaattctagc atcgagcaag atactttaat acatgtttgt aacctcgagc
146461 atccattcga cttagtatac aaaaaaatgc agtcgtacaa ttctgtacct atcaaggaac
146521 aaatattgta cggtagaatt gataatataa atatgagcat tagtatttct gtggattaat

FIG. 23 CONT'D

146581 agatttctag tatggggatc attaatcatc tctaatctct aaataacctca taaaaacgaaa
146641 aaaaagctat tatcaaatac tgtacggaat ggattcattc tcttctcttt ttatgaaact
146701 ctgttgtata tctactgata aaactggaag caaaaaatct gataaaaaga ataagaataa
146761 gatcaaggat tatatggaac acgattatta taaaaataaca atagttcctg gttcctcttc
146821 cacgtctact agctcgtggt attatacaca tgcctagtaa tagtctcttt gcgttgacgg
146881 aaagcagact agaaataaca ggctaaaatg ttcagacacc ataatagttc ccaacccaga
146941 taataacaga gtaccatcaa cacattcctt taaactcaat ccraaaccca aaacogttaa
147001 aatgtatccg gccaattgat agtagataat gaggtgtaca gcgcatgata atttacacag
147061 taaccaaaat gaaaatactt tagtaattat aagaaatata gatggtaacg tcatcatcaa
147121 caatccaata atatgccgga gagtaaacat tgacggataa aacaaaaatg ctccgcataa
147181 ctctatcatg gcaataacac aaccaaatac ttgtaagatt cctaaattag tagaaaatac
147241 aacggatatc gatgtataag tgatctcgag aaataataag aataaagtaa tgcccgtaaa
147301 gataaacatc aacattgttt ggtaatcatt aaaccaatta gtatgaagtt gaactaattt
147361 cacagtagat tttattccag tgttatcctc gcatgtatac gtacctggta agatatcttt
147421 atatttctata atcaatgaga catcactatc cgataacgaa tgaagtctag cactagtatg
147481 ccatttactt aatatggtcg tcttggaagt tttattataa gttaaaatat catggttgtc
147541 caatttccat ctaatatact ttgtcggatt atctatagta cacggaataa tgatggtatt
147601 attacatgct gtatactcta tagtctttgt agatgttata atcataaaag tacagaggta
147661 tatcaacgat attctaactc ttgacatttt ttatttattt aaaatgatac ctttgttatt
147721 tatttttattc tattttgcta acggtatcga atggcataag tttgaaacga gtgaagaaat
147781 aatttctact tacttattag acgacgtatt atacacgggt gttaatgggg cggtatacac
147841 attttcaaat aataaactaa acaaaactgg tttagctaat actaattata tcacaacatc
147901 tataaaagta gaggatgcgg ataaggatac attagtatgc ggaaccaata acggaaatcc
147961 caaatgttgg aaaatagacg gttcagacga cccaaaacat agaggtagag gatacgctcc
148021 ttatcaaaat agcaaagtaa cgataatcag tcacaacgga tgtgtactat ctgacataaa
148081 catatcaaaa gaaggaatta aacgatggag aagatttgac ggaccatgtg gttatgattt
148141 atacacggcg gataacgtaa ttccaaaaga tggtttacga ggagcattcg tcgataaaga
148201 tggtacttat gacaaagttt acatttcttt cactgatact atcggctcaa agagaattgt
148261 caaaattccg tatatagcac aaatgtgcct aaacgacgaa ggtggtccat catcattgtc
148321 tagtcataga tggtcgacgt ttctcaaagt cgaattagaa tgtgatatcg acggaagaag
148381 ttatagacaa attattcatt ctagaactat aaaaacagat aatgatacga tactatatgt
148441 attcttcgat agtccgcatt atgtacctat tctatgaata ccattaaaca atctttttct
148501 acgtcaaaat tggaaggata tacaaagcaa ttgccgtctc cagctcctgg tatatgtcta
148561 ccagctggaa aagttgttcc acatacoacg tttgaagtca tagaaaaata taatgtacta
148621 gatgatatta taaagccttt atctaaccaa cctatcttcg aaggaccgtc tggtgttaaa
148681 tggttcgata taaaggagaa ggaaaatgaa catcgggaat atagaatata cttcataaaa
148741 gaaaattcta tatattcgtt cgatacaaaa tctaaacaaa ctcgtagctc gcaagtcgat
148801 gcgcgactat tttcagtaat ggtaacttcg aaaccgttat ttatagcaga tatagggata
148861 ggagtaggaa tgccacaaat gaaaaaaata cttaaaatgt aatcttaatc gagtacacca
148921 cacgacaatg aacaaacata agacagatta tgctggttat gcttgctgcg taatatgcgg
148981 tctaattgtt ggaattattt ttacagcgac actattaaaa gttgtagaac gtaaattagt
149041 tcatacacca tcaatagata aaacgataaa agatgcatat attagagaag attgtcctac
149101 tgactggata egctataata ataaatgtat ccatttatct actgatcgaa aaacctggga
149161 ggaaggacgt aatgcatgca aagctctaaa tccaaattcg gatctaatta agatagagac
149221 tccaaacgag ttaagttttt taagaagcat tagacgcgga tattgggtag gagaatccga
149281 aatattaaac cagacaaccc catataattt tatagctaag aatgccacga agaatggaac
149341 taaaaaacgg aaatatattt gtagcacaac gaatactccc aaactgcatt cgtgttacac
149401 tatataacaa ttacactaca tttttatcat accactactt cggttagatg ttttagaaaa
149461 aaataaatat cgccgtaccg ttcttgtttt tataaaaata acaattaaca attatcaaat
149521 ttttttttta atattttacg tggttgacca ttcttggtgg taaaataatc tcttagtgtt
149581 ggaatggaat gctgtttaat gtttccacac tcatcgtata ttttgacgta tgtagtcaca
149641 tcgtttacgc aatagtcaga ctgtagttct atcatgcttc ctacattaga aggaggaaca
149701 gttttaaagt ctcttggttt taatctatta ccgttagttt tcatgaaatc ctttgttta
149761 tccacttcac attttaaata aatgtccact atacattctt otgttaattt tactagatcg
149821 tcatgggtca tagaatttat aggttccgta gtccatggat ccaaactagc aaacttcgcg
149881 tatacggtat cgcgattagt gtatacacca actgtatgaa aattaagaaa acagtttaat
149941 agatcaacag aaatatttaa tcctccgttt gatacagatg caccatattt atggattttg

FIG. 23 CONT'D

```
150001 gattcacacg ttgtttgtct gaggggttcg tctagcgttg cttctacata aacttctatt
150061 cccatatatt ctttattgtc agaatcgcat accgatttat catcatacac tgtttgaaaa
150121 ctaaatggtc tacacatcaa aataacaaat actaacgagt acattctgca atattgttat
150181 cgtaattgga aaaatagtgt tcgagtgagt tggattatgt gagtattgga ttgtatattt
150241 tattttatat tttgtaataa gaataaaatg ctaatgtcaa gtttattcca atagatgtct
150301 tattaaaaac atatataata aataacaatg gctgaatggc ataaaattat cgaggatatc
150361 tcaaaaaata ataagttcga ggatgccgcc atcgttgatt acaagactac aaagaatgtt
150421 ctagctgcta ttcctaacag aacatttgcc aagattaatc cgggtgaaat tattcctctc
150481 atcactaatc gtaatattct aaaacctctt attggtcaga aatattgtat tgtatatact
150541 aactctctaa tggatgagaa cacgtatgct atggagttgc ttactgggta cgcccctgta
150601 tctccgatcg ttatagcgag aactcatacc gcacttatat ttttgatggg taagccaaca
150661 acatccagac gtgacgtgta tagaacgtgt agagatcacg ctacccgtgt acgcgcaact
150721 ggtaattaaa ataaaaagta atattcatat gtagtgtcaa ttttaaatga tgatgatgaa
150781 atggataata tccatattga cgatgtcaat aatgccggta ttggcataca gctcatcgat
150841 ttttagattt cattcagagg atgtggaatt atgttatggg catttgtatt ttgataggat
150901 ctataatgta gtaaatataa aatataatcc gcatattcca tatagatata attttattaa
150961 tcgcacgtta accgtagatg aactagacga taatgtcttt tttacacatg gtttatttttt
151021 aaaacacaaa tatggttcac ttaatcctag tttgattgtc tcattatcag gaaacttaaa
151081 atataatgat atacaatgct cagtaaatgt atcgtgtctc attaaaaatt tggcaacgag
151141 tacatctact atattaacat ctaaacataa gacttattct ctacatcggt ccacgtgtat
151201 tactataata ggatacgatt ctattatatg gtataaagat ataaatgaca agtataatgg
151261 catctatgat tttactgcaa tatgtatgct aatagcgtct acattgatag tgaccatata
151321 cgtgtttaaa aaaataaaaa tgaagtctta attatgctat gctattagaa atggataaaa
151381 tcaaaattac ggttgattca aaaattggta atgttgttac catatcgtat aacttggaaa
151441 agataactat tgatgtcaca cctaaaaaga aaaaagaaaa ggatgtatta ttagcgcaat
151501 cagttgctgt cgaagaggca aaagatgtca aggtagaaga aaaaaatatt atcgatattg
151561 aagatgacga tgatatggat gtagaaagcg cataatacga tctataaaaa taagtatata
151621 aatacttttt atttactgta ctattactgt gtagtggtga taccctactc gattattttt
151681 ttaaaaaaat acttattctg attcttctag ccatttccgt gttcgttcga atgccacatc
151741 gacgttaaag atagggagt agttgaaatc tagttctgca ttgttggtac gcacctcaaa
151801 tgtagtgttg gatatcttca acgtatagtt gttgagtagt gatggttttc taaatagaat
151861 tctcttcata tcattcttgc acgcgtacat ttttagcatc catcttggaa ttctagatcc
151921 ttgttctatt cccaatggtt tcatcaatag aagattaaac atatcgtacg aacacgatgg
151981 agagtaatcg tagcaaaagt aagcatttcc tttaatctca gatcccggat actggatata
152041 ttttgcagcc aacacgtgca tccatgcaac atttcctaca tataccggtc tatgcaccgc
152101 gtcatcatcg actgtacgat acataatgtt accgtgttgc ttacattgct cgtaaaagac
152161 tttcgtcaat ttgtctcctt ctccgtaaat tccagtgggt cttaggcaac aagtatacaa
152221 ttttgctcca ttcatgatta cggaattatt ggctttcata accagttgct cggccatacg
152281 tttacttttt gcgtatacat gtcctggtga tatatcataa agggtatgct catggccgat
152341 gaatggatca ccgtgtttat ttggtcctat tgcttccatg ctactagtat agatcaaata
152401 cttgattcct aggtccacac aagctgccaa tatagtctgt gttccataat agtttacttt
152461 catgatttca ttatcggtgt attttccaaa tacatccact agagcagccg tatgaataat
152521 cagatttacc ccatctagcg cttctctcac cttatcaaag tcgtttatat cacattgtat
152581 atagtttata accttaactt tcgaggttat tggttgtgga tctttctacaa tatctatgac
152641 tctgatttct tgaacatcat ctgcactaat taacagtttt actatatacc tgcctagaaa
152701 tccggcacca ccagtaaccg cgtacacggc cattgctgcc actcataata tcagactact
152761 tattctattt tactaaataa tggctgtttg tataatagac cacgataata tcagaggagt
152821 tatttacttt gaaccagtcc atggaaaaga taaagtttta ggatcagtta ttggattaaa
152881 atccggaacg tatagtttga taattcatcg ttacggagat attagtcaag gatgtgattc
152941 cataggcagt ccagaaatat ttatcggtaa catctttgta aacagatatg gtgtagcata
153001 tgtttattta gatacagatg taaatatatc tacaattatt ggaaaggcgt tatctatttc
153061 aaaaaatgat cagagattag cgtgtggagt tattggtatt tcttacataa atgaaagat
153121 aatacatttt cttacaatta acgagaatgg cgtttgatat atcagttaat gcgtctaaaa
153181 caataaatgc attagtttac ttttctactc agcaaaataa attagtcata cgtaatgaag
153241 ttaatgatac acactacact gtcgaatttg atagggacaa agtagttgac acgtttattt
153301 catataatag acataatgac accatagaga taagaggggt gcttccagag gaaactaata
153361 ttggttgcgc ggttaatacg ccggttagta tgacttactt gtataataag tatagtttta
```

FIG. 23 CONT'D

153421 aactgatttt agcagaatat ataagacaca gaaatactat atccggcaat atttattcgg
153481 cattgatgac actagatgat ttggctatta aacagtatgg agacattgat ctattattta
153541 atgagaaact taaagtagac tccgattcgg gactatttga ctttgtcaac tttgtaaagg
153601 atatgatatg ttgtgattct agaatagtag tagctctatc tagtctagta tctaaacatt
153661 gggaattgac aaataaaaag tataggtgta tggcattagc cgaacatata tctgatagta
153721 ttccaatatc tgagctatct agactacgat acaatctatg taagtatcta cgcggacaca
153781 ctgagagcat agaggataaa tttgattatt ttgaagacga tgattcgtct acatgttctg
153841 ccgtaaccga cagggaaacg gatgtataat ttttttttata gcgtgaagga tatgataaaa
153901 aatataattg ttgtatttat cccattccaa tcaccttata tgattctgta acacaatgaa
153961 ggagtctcat agatgtatag aggtcagata ctggtttgat aaactgttta ttccacatga
154021 gtatgtttga ctttatggtt agacccgcat actttaacaa atcactgaaa attggagtta
154081 ggtattgacc tctcagaatc agttgccgtt ctggaacatt aaatgtattt tttatgatat
154141 actccaacgc atttatgtgg gcatacaaca agtcattact aatggagtat tccaagagtt
154201 ttagttgtct agtatttaac aagagaagag atttcaacag actgtttatg aactcgaatg
154261 ccgcctcatt gtcgcttata ttgatgatgt cgaattctcc caatatcatc accgatgagt
154321 agctcatctt gttatcggga tccaagtttt ctaaagatgt cattaaaccc tcgatcatga
154381 atggatttat catcatcgtt tttatgttgg acatgagctt agtccgtttg tccacatcta
154441 tagacgacga tttctgaatt attttatata tccctctctt taactccagg aacttgtcag
154501 gatggtctac tttaatatgt tctcgtctaa gagatgaaaa tctttggatg gttgcacgcg
154561 acttttctct aaaggatgac gttgcccaag atcctctctt aaatgaatcc atcttatcct
154621 tggacaagat ggacagtcta ttttccttag atggtttaat atttttgtta cccatgatct
154681 ataaaggtag acctaatcgt ctcggatgac ctatatattt attttcagtt ttattatacg
154741 cataaattgt aaaaaatatg ttaggtttac aaaaatgtct cgtggggcat taatcgtttt
154801 tgaaggattg gacaaatctg gaaaaacaac acaatgtatg aacatcatgg aatctatacc
154861 ggcaaacacg atacaatatc ttaactttcc tcagagatcc actgtcactg gaaagatgat
154921 agatgactat ctaactcgta aaaaaaccta taatgatcat atagttaatc tattattttg
154981 tgcaaataga tgggagtttg catcttttat acaagaacaa ctagaacagg gaattacttt
155041 aatagttgat agatacgcgt tctctggagt agcgtatgcc gccgctaaag gcgcgtcaat
155101 gactctcagt aagagttatg aatctggatt gcctaaaccc gacttagtta tattcttgga
155161 atctggtagc aaagaaatta atagaaacgt cggcgaggaa atttatgaag atgttacatt
155221 ccaacaaaag gtattacaag aatataaaaa aatgattgaa gaaggagata ttcattggca
155281 aattatttct tctgaattcg aggaagatgt aaagaaggag ttgattaaga atatagttat
155341 agaggctata cacacggtta ctggaccagt ggggcaactg tggatgtaat agtgaaatta
155401 catttttat aaatagatgt tagtacagtg ttataaatgg atgaagcata ttactctggc
155461 aacttggaat cagtactcgg atacgtgtcc gatatgcata ccgaactcgc atcaatatct
155521 caattagtta ttgccaagat agaaactata gataatgata tattaaacaa ggacattgta
155581 aattttatca tgtgtagatc aaacttggat aatccattta tctctttcct agatactgta
155641 tatactatta tagatcaaga gaactatcag accgaattga ttaattcatt agacgacaat
155701 gaaattatcg attgtatagt taataagttt atgagctttt ataaggataa cctagaaaat
155761 atagtagatg ctatcattac tctaaaatat ataatgaata atccagattt taaaactacg
155821 tatgccgaag tactcggttc cagaatagcc gatatagata ttaaacaagt gatacgtgag
155881 aatatactac aattgtctaa tgatatccgc gaacgatatt tgtgaaaaat attaaaaaaa
155941 aatacttttt ttattaaatg acgtcgcttc gcgaatttag aaaattatgc tgtgatatat
156001 atcacgcatc aggatataaa gaaaaatcta aattaattag agactttata acagataggg
156061 atgataaata tttgatcatt aagctattgc ttcccggatt agacgataga atttataaca
156121 tgaacgataa acaaattata aaattatata gtataatatt taaacaatct caggaagata
156181 tgctacaaga tttaggatac ggatatatag gagcacttat taggacttta ttcaaagaga
156241 acacagaaat ccgtccacga gataaaagca ttttaacttt agaagacgtg gatagtttct
156301 taactacgtt atcatccgta actaaagaat cgcatcaaat aaaattattg actgatatcg
156361 catccgtttg tacatgtaat gatttaagat gtgtagtcat gcttattgat aaagatctaa
156421 aaattaaagc gggtcctcgg tacgtactta acgctattag tcctaatgcc tatgatgtgt
156481 ttagaaaatc taataacttg aaagagataa tagaaaatgc atctaaacaa aatctagact
156541 ctatatctat ttctgttatg actccaatta atcccatgtt agcggaatcg tgtgattctg
156601 tcaataaggc gtttaaaaaa tttccatcag gaatgtttgc ggaagtcaaa tacgatggtg
156661 aaagagtaca agttcataaa aataataacg agtttgcctt ctttagtaga aacatgaaac
156721 cagtactctc tcataaagtg gattatctca aagaatacat accgaaagca tttaaaaaag
156781 ctacgtctat cgtattggat tctgaaattg ttcttgtaga cgaacataat gtaccgctcc

FIG. 23 CONT'D

156841 cgtttggaag tttaggaata cacaaaaaga aagaatataa aaactctaac atgtgtttgt
156901 tcgtgtttga ctgtttgtac tttgatggat tcgatatgac ggacattcca ttgtacgaac
156961 gaagatcttt tctcaaagat gttatggttg aaataccaaa tagaatagta ttctcagagt
157021 tgacgaatat tagtaacgag tctcagttaa ctgacgtatt ggatgatgca ctaacgagaa
157081 aattagaagg attggtctta aaagatatta atggagtata cgaaccggga aagagaagat
157141 ggttaaaaat aaagcgagac tatttgaacg agggttccat ggcagattct gccgatttag
157201 tagtactagg tgcttactat ggtaaaggag caaagggtgg tatcatggca gtctttctaa
157261 tgggttgtta cgacgatgaa tccggtaaat ggaagacggt taccaagtgt tcaggacacg
157321 atgataatac gttaagggtt ttgcaagacc aattaacgat ggttaaaatt aacaaggatc
157381 ccaaaaaaat tccagagtgg ttggtagtta ataaaatcta tattcccgat tttgtagtag
157441 aggatccgaa acaatctcag atatgggaaa tttcaggagc agagtttaca tcttccaagt
157501 cccataccgc aaatggaata tccattagat ttcctagatt tactaggatt agagaagata
157561 aaacgtggaa agaatctact catctaaacg atttagtaaa cttgactaaa tcttaatagt
157621 tacatacaaa ctgaaaatta aaataacact atttagttgg tggtcgccat ggatggtgtt
157681 attgtatact gtctaaacgc gttagtaaaa catggcgagg aaataaatca tataaaaaat
157741 gatttcatga ttaaaccatg ttgtgaaaga gtttgtgaaa aagtcaagaa cgttcacatt
157801 ggcggacaat ctaaaaacaa tacagtgatt gcagatttgc catatatgga taatgcggta
157861 tccgatgtat gcaattcact gtataaaaag aatgtatcaa gaatatccag atttgctaat
157921 ttgataaaga tagatgacga tgacaagact cctactggtg tatataatta ttttaaacct
157981 aaagatgtta ttcctgttat catatctata ggaaaggata aagatgtctg tgaactatta
158041 atctcatcag acatatcgtg tgcatgcgtg gagttaaatt catatcacgt agccattctt
158101 cccatggatg tttcctttct taccaaagga aatgcatcat tgattattct cctgtttgat
158161 ttctctatcg atgcagcacc tctcttaaga agtgtaaccg ataataatgt tattatatct
158221 agacaccagc gtctacatga cgagcttccg agttccaatt ggttcaagtt ttacataagt
158281 ataaagtccg actattgttc tatattatat atggttgttg atggatctgt gatgcatgcg
158341 atagctgata atagaactca cgcaattatt agcaaaaata tattagacaa tactacgatt
158401 aacgatgagt gtagatgctg ttattttgaa ccacagatta ggattcttga tagagatgag
158461 atgctcaatg gatcatcgtg tgatatgaac agacattgta ttatgatgaa tttacctgat
158521 gtaggcaaat ttggatctag tatgttgggg aaatatgaac ctgacatgat taagattgct
158581 ctttcggtgg ctggtaattt aataagaaat cgagactaca ttcccgggag acgaggatat
158641 agctactacg tttacggtat agcctctaga taatttttct aagcacgaaa taaaaaacat
158701 aattttaaac caatctattt catactattt tgtgtgatca ccatggacat aaagatagat
158761 attagtattt ctggtgataa atttacggtg actactagga gggaaaatga agaaagaaaa
158821 aaatatctac ctctccaaaa agaaaaaact actgatgtta tcaaacctga ttatcttgag
158881 tacgatgact tgttagatag agatgagatg tttactattc tagaggaata ttttatgtac
158941 agaggtctat taggcctcag aataaaatat ggacgactct ttaacgaaat taaaaaattc
159001 gacaatgatg cggaagaaca attcggtact atagaagaac tcaagcagaa actttagatta
159061 aattctgaag agggagcaga taacttttata gattatataa aggtacaaaa acaggatatc
159121 gtcaaacttа ctgtatacga ttgcatatct atgataggat tgtgtgcatg cgtggtagat
159181 gtttggagaa atgagaaact gttttctaga tggaaatatt gtttacgagc tattaaactg
159241 tttattaatg atcacatgct tgataagata aaatctatac tgcagaatag actagtatat
159301 gtggaaatgt catagaaagt taaaagttaa tgagagcaaa aatatataag gttgtattcc
159361 atatttgtta ttttttctgt aatagttaga aaaatacatt cgatggtcta tctaccagat
159421 tattatgtgt tataaggtac tttttctcat aataaactag agtatgagta agatagtgtt
159481 tttcaaaaca tataaatcta aaattgatgg atgagatata cagctattaa tttcgaaaat
159541 atattttaat ctgataactt taaacatgga tttttgatgg tggtttaacg ttttaaaaaa
159601 agattttgtt attgtagtat atgataatat taaaagatgg atataaagaa tttgctgact
159661 gcatgtacta ttttttacat tactacattg gctacggcag atatacctac tccgccacca
159721 acgggtcatg tgacaaggga gaatatcttg ataagaggca taatcaatgt tgtaatcggt
159781 gtccacctgg agaatttgcc aaggttagat gtaatggtaa cgataacaca aaatgtgaac
159841 gctgcccacc tcatacatat accacaatcc caattatttt aatggatgtc atcaatgtag
159901 aaaatgccca accggatcat ttgataaggt aaagtgtacc ggaacacaga acagtaaatg
159961 ttcgtgtctt cctggttggt attgtgctac tgattcttca cagactgaag attgttgaaa
160021 ttgtgtacca aaaaggagat gtccatgcgg atactttggt ggaatagatg aacaaggaaa
160081 tcctatttgt aaatcgtgtt gtgttggtga atattgcgac tacctacgta attatagact
160141 tgatccattt cctccatgca aactatctaa atgtaattaa ttatgatttt gatgataatg
160201 ttaccataca ttatatcgct acttggttag tgtattattc agtatgaaga cctattaata

FIG. 23 CONT'D

```
160261 attacttatc ttttgacgat cttgttataa ttataatata aaaatactta tggcatagta
160321 actcataatt gctgacgcga taaattcgta ataatctgtt ttgttcaaat ttttataagg
160381 aatctacagg cataaaaata aaaatataat ttataatata ctcttacagc gcgccatcat
160441 gaataacagc agtgaattga ttgctgttat taatggattt agaaatagtg gacgattttg
160501 tgatattagt atagttatta atgatgaaag gataaacgct cataaactca tcctatctgg
160561 agcctccgaa tatttttcca ttctgtttte caataatttt atcgattcta atgaatacga
160621 agttaatcta agtcatttag attatcaaag cgttaacgat ttgatcgatt acatttatgg
160681 gataccttfg agcctaacta acgataacgt gaaatatatt ctttcaaccg ctgatttttt
160741 acaaaattgga tctgctatta cggagtgtga aaattacata cttaaaaatc tttgttctaa
160801 aaactgtatc gatttctaca tatacgctga taaatataat aacaagaaaa tagaatcagc
160861 gtcgtttaac acaatattac aaaatatttt gagactcatc aacgatgaaa actttaaata
160921 cttaacagag gaatcaatga taaaaatttt aagcgatgat atgttaaata taaaaaatga
160981 ggattttgca ccactaattc tcattaaatg gttagaggagt actcaacaat catgcaccgt
161041 cgagttactt agatgcctca gaatatcatt gctttcccca caagttataa aatcacttta
161101 tagtcatcaa ctggttagtt caatctacga atgtataaca ttcttaaaca atatagcatt
161161 cttggatgaa tcatttccta gataccatag catcgagttg atatctatcg gtataagtaa
161221 ttcgcatgat aagatttcca taaactgcta caatcataaa aaaaatacat gggaaatgat
161281 atcttcacgt agatataggt gtagtttcgc agtggccgtc ctggataata ttatctatat
161341 gatgggtgga tatgatcagt ccccgtatag aagttcaaag gttatagcgt acaatacatg
161401 tacaaattct tggatatatg atataccaga gctaaaatat cctcgttcta attgtggggg
161461 actggctgat gacgaataca tttattgtat aggcggcata cgcgatcagg attcatcgtt
161521 gacatctagt attgataaat ggaagccatc aaaaccatat tggcagaagt atgctaaaat
161581 gcgcgaacca aaatgtgata tggggttgc gatgttaaac ggattaatat atgtcatggg
161641 tggaatcgtt aaaggtgaca cgtgtaccga cgcactagag agtttatcag aagatggatg
161701 gatgaagcat caacgtcttc caataaaaat gtccaatatg tcgacgattg ttcatgatgg
161761 caagatttat atatctggag gttacaacaa tagtagtgta gttaatgtaa tatcgaatct
161821 agtccttagc tataatccga tatatgatga atggaccaaa ttatcatcat taaacattcc
161881 tagaattaat cccgctctat ggtcagcgca taataaatta tatgtaggag gaggaatatc
161941 tgatgatgtt cgaactaata catctgaaac atacgataaa gaaaaagatt gttggacatt
162001 ggataatggt cacgtgttac cacgcaatta tataatgtat aaatgcgaac cgattaaaca
162061 taaatatcca ttggaaaaaa cacagtacac gaatgatttt ctaaagtatt tggaaagttt
162121 tataggtagt tgatagaaca aaatacataa ttttgtaaaa ataaatcact ttttatacta
162181 atatgacacg attaccaata cttttgttac taatatcatt agtatacgct acacctttcc
162241 ctcagacatc taaaaaaata ggtgatgatg caactctatc atgtaatcga aataatacaa
162301 atgactacgt tgttatgagt gcttggtata aggagcccaa ttccattatt cttttagctg
162361 ctaaaagcga cgtcttgtat tttgataatt ataccaagga taaaatatct tacgactctc
162421 catacgatga tctagttaca actatcacaa ttaaatcatt gactgctaga gatgccggta
162481 cttatgtatg tgcattcttt atgacatcaa ctacaaatga cactgataaa gtagattatg
162541 aagaatactc cacagagttg attgtaaata cagatagtga atcgactata gacataatac
162601 tatctggatc tacacattca ccggaaacta gttctaagaa acctgattat atagataatt
162661 ctaattgctc gtcggtattc gaaatcgcga ctccggaacc aattactgat aatgtagaag
162721 atcatacaga caccgtcaca tacactagtg atagcattaa tacagtaagt gcatcatctg
162781 gagaatccac aacagacgag actccggaac caattactga taaagaagat catacagtta
162841 cagacactgt ctcatacact acagtaagta catcatctgg aattgtcact actaaatcaa
162901 ccaccgatga tgcggatctt tatgatacgt acaatgataa tgatacagta ccaccaacta
162961 ctgtaggcgg tagtacaacc tctattagca attataaaac caaggacttt gtagaaatat
163021 ttggtattac cgcattaatt atattgtcgg ccgtggcaat tttctgtatt acatattata
163081 tatataatag acgttcacgt aaatacaaaa cagagaacaa agtctagatt tttgacttac
163141 ataaatgtct gggatagtaa aatctatcat attgagcgga ccatctggtt taggaaagac
163201 agccatagcc aaaagactat gggaatatat ttggatttgt ggtgtcccat accactagat
163261 ttcctcgtcc tatggaacga gaaggtgttg attaccatta cgttaacaga gaggccatct
163321 ggaagggaat agccgccgga aactttctag aacatactga gttttagga aatatttacg
163381 gaacttctaa aacagctgtg aatacagcgg ctattaataa tcgtatttgt gtgatggatc
163441 taaacatcga cggtgttaga agtcttaaaa atacgtacct aatgccttac tcggtgtata
163501 taagacctac ctctcttaaa atggttgaga ccaagcttcg ttgtagaaac actgaagcta
163561 acgatgagat tcatcgtcgc gtgtattgg caaaaacgga tatggatgag gccaacgaag
163621 caggtctatt cgacactatt atcattgaag atgatgtgaa tttagcatat agtaagttaa
```

FIG. 23 CONT'D

163681 ttcagatact acaggacogt attagaatgt attttaacac taattagaga cttaagactt
163741 aaaacttgat aattaataat ataactcgtt tttatatgtg gctatttcaa cgtctaatgt
163801 attagttaaa tattaaaact taccacgtaa aacttaaaat ttaaaatgat atttcattga
163861 cagatagatc acacattatg aactttcaag gacttgtgtt aactgacaat tgcaaaaatc
163921 aatgggtcgt tggaccatta ataggaaaag gtggattcgg tagtatttat actactaatg
163981 acaataatta tgtagtaaaa atagagccca aagctaacgg atcattattt accgaacagg
164041 cattttatac tagagtactt aaaccatccg ttatcgaaga atggaaaaaa tctcacaata
164101 taaagcacgt aggtcttatc acgtgcaagg catttggtct atacaaatcc attaatgtgg
164161 aatatcgatt cttggtaatt aatagattag gtgcagatct agatgcggtg atcagagcca
164221 ataataatag attaccaaaa aggtcggtga tgttgatcgg aatcgaaatc ttaaatacca
164281 tacaatttat gcacgagcaa ggatattctc acggagatat taaagcgagt aatatagtct
164341 tggatcaaat agataagaat aaattatatc tagtggatta cggattggtt tctaaattca
164401 tgtctaatgg agaacatgtt ccatttataa gaaatccaaa taaaatggat aacggtactc
164461 tagaatttac acctatagat tcgcataaag gatacgttgt atctagacgt ggagatctag
164521 aaacacttgg atattgtatg attagatggt tgggaggtat cttgccatgg actaagatat
164581 ctgaaacaaa gaattgtgca ttagtaagtg ccacaaaaca gaaatatgtt aacaatactg
164641 cgactttgtt aatgaccagt ttgcaatatg cacctagaga attgctgcaa tatattacca
164701 tggtaaactc tttgacatat tttgaggaac ccaattatga cgagtttcgg cacatattaa
164761 tgcagggtgt atattattaa gtgtggtgtt tggtcgatgt aaaatttttg tcgataaaaa
164821 ttaaaaaata acttaattta ttattgatct cgtgtgtaca accgaaatca tggcgatgtt
164881 ttacgcacac gctctcggtg ggtacgacga gaatcttcat gccttttcctg gaatatcatc
164941 gactgttgcc aatgatgtca ggaaatattc tgttgtgtca gtttataata acaagtatga
165001 cattgtaaaa gacaaatata tgtggtgtta cagtcaggtg aacaagagat atattggagc
165061 actgctgcct atgtttgagt gcaatgaata tctacaaatt ggagatccga tccatgatca
165121 agaaggaaat caaatctcta tcatcacata tcgccacaaa aactactatg ctctaagcgg
165181 aatcgggtac gagagtctag acttgtgttt ggaaggagta gggattcatc atcacgtact
165241 tgaaacagga aacgctgtat atggaaaagt tcaacatgat tattctacta tcaaagagaa
165301 ggccaaagaa atgaatgcac ttagtccagg acctatcatt gattaccacg tctggatagg
165361 agattgtatc tgtcaagtta ctgctgtgga cgtacatgga aaggaaatta tgagaatgag
165421 attcaaaaag ggtgcggtgc ttccgatccc aaatctggta aaagttaaac ttgggagaga
165481 tgatacagaa aatctttctt ctactatatc ggcggcacca tcgaggtaac cacctctctg
165541 gaagacagcg tgaataatgt actcatgaaa cgtttggaaa ctatacgcca tatgtggtct
165601 gtcgtatatg atcattttga tattgtgaat ggtaaagaat gctgttatgt gcatacgcat
165661 ttgtctaatc aaaatcttat accgagtact gtaaaaacaa atttgtacat gaagactatg
165721 ggatcatgca ttcaaatgga ttccatggaa gctctagagt atcttagcga aatgaaggaa
165781 tcaggtggat ggagtcccag accagaaatg caggaatttg aatatccaga tggagtggaa
165841 gacactgaat caattgagag attggtagag gagttcttca atagatcaga acttcaggct
165901 ggtgaatcag tcaaatttgg taattctatt aatgttaaac atacatctgt ttcagctaag
165961 caactaagaa cacgtatacg gcagcagctt cctttatact ctcatctttt accaacacaa
166021 agggtggata tttgttcatt ggagttgata ataatacaca caaagtaatt ggattcacgg
166081 tgggtcatga ctacctcaga ctggtagaga atgatatagc aaagcatatc aaaagacttc
166141 gtgttgtgca tttctgtgag aagaaagagg acatcaagta cacgtgtcga ttcatcaagg
166201 tatataaacc tggggatgag gctacctcga catacgtgtg cgctatcaaa gtggaaagat
166261 gctgttgtgc tgtgtttgca gattggccag aatcatggta tatggatact aatggtatca
166321 agaagtattc tccagatgaa tgggtgtcac atataaaatt ttaattaatg taatagagaa
166381 caaataataa ggttgtaata tcatatagac aataactaac aattaattag taactgttat
166441 ctctttttta actaaccaac taactatata cctattaata catcgtaatt atagttctta
166501 acatctatta atcattaatt cgcttcttta attttttata aactaacatt gttaattgaa
166561 aagggataac atgttacaga atataaatta tatatggatt tttttaaaaa ggaaatactt
166621 gactggagta tatatttatc tcttcattat atagcacgcg tgttttccaa ttttttccaca
166681 tcccatataa tacaggatta taatctcgtt cgaacatacg agaaagtgga taaaacaata
166741 gttgattttt tatctaggtt gccaaatttta ttccatattt tagaatatgg ggaaaatatt
166801 ctacatattt attctatgga tgatgctaat acgaatatta taatttttttt tctagataga
166861 gtattaaata ttaataagaa cgggtcattt atacacaatc tcaggttatc atcatccatt
166921 aatataaaag aatatgtata tcaattagtt aataatgatc atccagataa taggataaga
166981 ctaatgcttg aaaatggacg tagaacaaga catttttttgt cctatatatc agatacagtt
167041 aatatctata tatgtatttt aataaatcat ggattttata tagatgccga agacagttac

FIG. 23 CONT'D

```
167101 ggttgtacat tattacatag atgtatatat gactataaga aatcagaatc agaatcatac
167161 aatgaattaa ttaagatatt gttaaataat ggatcagatg tagataaaaa agatacgtac
167221 ggaaacacac cttttatcct attatgtaaa cacgatatca acaacgtgga attgtttgag
167281 atatgtttag agaatgctaa tatagactct gtagacttta atagatatac acctcttcat
167341 tatgtctcat gtcgtaataa atatgatttt gtaaagttat taatttctaa aggagcaaat
167401 gttaatgcgc gtaatagatt cggaactact ccatttttatt gtggaattat acacggtatc
167461 tcgcttataa aactatattt ggaatcagac acagagttag aaatagataa tgaacatata
167521 gttcgtcatt taataatttt tgatgctgtt gaatctttag attatctatt atccagagga
167581 gttattgata ttaactatcg tactatatac aacgaaacat ctatttacga cgctgtcagt
167641 tataatgcgt ataatacgtt ggtctatcta ttaaacagaa atggtgattt tgagacgatt
167701 actactagtg gatgtacatg tatttcggaa gcagtcgcaa acaacaacaa aataataatg
167761 gaagtactat tgtctaaacg accatctttg aaaattatga tacagtctat gatagcaatt
167821 actaaacata aacagcataa tgcagattta ttgaaaatgt gtataaaata tactgcgtgt
167881 atgaccgatt atgatactct tatagatgta cagtcgctac agcaatataa atggtatatt
167941 ttaaaatgtt tcgatgaaat agatatcatg aagagatgrt atataaaaaa taaaactgta
168001 ttccaattag ttttttgtat caaagacatt aatactttaa tgagatacgg taaacatcct
168061 tctttcgtga aatgcactag tctcgacgta tacggaagtc gtgtacgtaa tatcatagca
168121 tctattagat atcgtcagag attaattagt ctattatcca agaagctgga tcctggagat
168181 aaatggtcgt gttttcctaa cgaaataaaa tataaaatat tggaaaactt taacgataac
168241 gaactatcca catatctaaa aatcttataa acactattaa aatataaaat ctaagtagga
168301 taaaatcaca ctacatcatt gtttcctttt agtgctcgac agtgtatact atttttaaca
168361 ctcataaata aaaatgaaaa cgatttccgt tgttacgttg ttatgcgtac tacctgctgt
168421 tgtttattca acatgtactg tacccactat gaataacgct aaattaacgt ctaccgaaac
168481 atcgtttaat gataaacaga aagttacgtt tacatgtgat cagggatatc attcttcgga
168541 tccaaatgct gtctgcgaaa cagataaatg gaaatacgaa aatccatgca aaaaaatgtg
168601 cacagtttct gattacatct ctgaattata taataaaccg ctatacgaag tgaattccac
168661 catgacacta agttgcaacg gcgaaacaaa atattttcgt tgcgaagaaa aaaatggaaa
168721 tacttcttgg aatgatactg ttacgtgtcc taatgcggaa tgtcaacctc ttcaattaga
168781 acacggatcg tgtcaaccag ttaaagaaaa atactcattt ggggaatata tgactatcaa
168841 ctgtgatgtt ggatatgagg ttattggtgc ttcgtacata agttgtacag ctaattcttg
168901 gaatgttatt ccatcatgtc aacaaaatg tgatatgccg tctctatcta atggattaat
168961 ttccggatct acattttcta tcggtggcgt tatacatctt agttgtaaaa gtggttttac
169021 actaacgggg tctccatcat ccacatgtat cgacggtaaa tggaatcccg tactcccaat
169081 atgtgtacga actaacgaag aatttgatcc agtggatgat ggtcccgacg atgagacaga
169141 tttgagcaaa ctctcgaaag acgttgtaca atatgaacaa gaaatagaat cgttagaagc
169201 aacttatcat ataatcatag tggcgttaac aattatgggc gtcatatttt taatctccgt
169261 tatagtatta gtttgttcct gtgacaaaaa taatgaccaa tataagttcc ataaattgct
169321 accgtaaata taaatccgtt aaaataatga ataattaata acgaacaagt atcaaaagat
169381 taaagaatta tagctagaat caattgagat gtcttcttca gtggatgttg atatctacga
169441 tgccgttaga gcatttttac tcaggcacta ttataacaag agatttattg tgtatggaag
169501 aagtaacgcc atattacata atatatacag gctatttaca agatgcgccg ttataccgtt
169561 cgatgatata gtacgtacta tgccaaatga atcacgtgtt aaacaatggg tgatggatac
169621 acttaatggt ataatgatga atgaacgcga tgtttctgta agcgttggca ccggaatact
169681 attcatggaa atgttttccg attacaataa aaatagtatc aacaatcaac taatgtatga
169741 tataattaat agcgtatcta taattctagc taatgagaga tatagaagcg cttttaacga
169801 cgatggtata tacatccgta gaaatatgat taacaagttg tacggatacg catatctaac
169861 tactattggc acgatcgctg gaggtgtttg ttattatctg ttgatgcatc tagttagttt
169921 gtataaataa ttatttcaat atactagtta aaattttaag attttaaatg tataaaaaac
169981 taataacgtt tttatttgta ataggtgcat tagcatccta ttcgaataat gagtacacta
170041 cgttaataa actgagtgta aaactctata tagatggagt agataatata gaaaattcat
170101 atactgatga taataatgaa ttggtgttaa attttaaaga gtacacaatt tctattatta
170161 cagagtcatg cgacgtcgga tttgattcca tagatataga tgttataaac gactataaaa
170221 ttattgatat gtataccatt gactcgtcta ctattcaacg cagaggtcac acgtgtagaa
170281 tatctaccaa attatcatgc cattatgata agtaccctta tattcacaaa tatgatggtg
170341 atgagcgaca atattctatt actgcagagg gaaaatgcta taaaggaata aaatatgaaa
170401 taagtatgat caacgatgat actctattga gaaaacatac tcttaaaatt ggatctactt
170461 atatatttga tcgtcatgga catagtaata catattatta aaaatatgat ttttaaaaat
```

FIG. 23 CONT'D

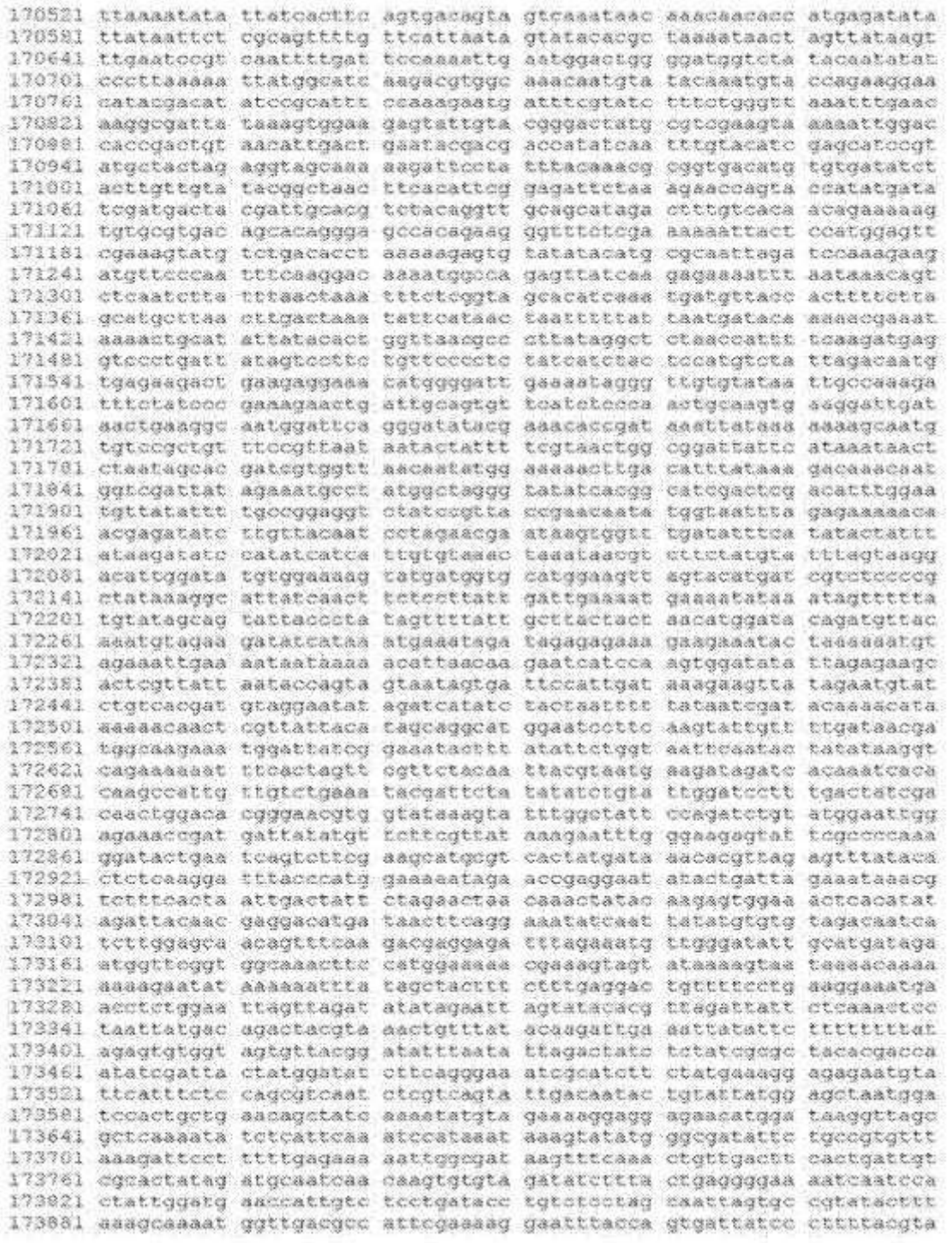

170521 ttaaaatata ttatcacttc agtgacagta gtcaaataac aaacaacacc atgagatata
170581 ttataattct cgcagttttg ttcattaata gtatacacgc taaaataact agttataagt
170641 ttgaatccgt caattttgat tccaaaattg aatggactgg ggatggtcta tacaatatat
170701 cccttaaaaa ttatggcatc aagacgtggc aaacaatgta tacaaatgta ccagaaggaa
170761 catacgacat atccgcattt ccaaagaatg atttcgtatc tttctgggtt aaatttgaac
170821 aaggcgatta taaagtggaa gagtattgta cgggactatg cgtcgaagta aaaattggac
170881 caccgactgt aacattgact gaatacgacg accatatcaa tttgtacatc gagcatccgt
170941 atgctactag aggtagcaaa aagattccta tttacaaacg cggtgacatg tgtgatatct
171001 acttgttgta tacggctaac ttcacattcg gagatttctaa agaaccagta ccatatgata
171061 tcgatgacta cgattgcacg tctacaggtt gcagcataga ctttgtcaca acagaaaaag
171121 tgtgcgtgac agcacaggga gccacagaag ggtttctcga aaaaattact ccatggagtt
171181 cgaaagtatg tctgacacct aaaaagagtg tatatacatg cgcaattaga tccaaagaag
171241 atgttcccaa tttcaaggac aaaatggcca gagttatcaa gagaaaattt aataaacagt
171301 ctcaatctta tttaactaaa tttctcggta gcacatcaaa tgatgttacc actttcttta
171361 gcatgcttaa cttgactaaa tattcataac taatttttat taatgataca aaaacgaaat
171421 aaaactgcat attatacact ggttaacgcc cttataggct ctaaccattt tcaaagatgag
171481 gtccctgatt atagtccttc tgttccccta tatcatctac tccatgtcta ttagacaatg
171541 tgagaagact gaagaggaaa catggggatt gaaaatagag ttgtgtataa ttgccaaaga
171601 tttctatccc gaaagaactg attgcagtgt tcatctccca actgcaagtg aaggattgat
171661 aactgaaggc aatggattca gggatatacg aaacaccgat aaatttataa aaaagcaatg
171721 tgtccgctgt ttccgttaat aatactattt tcgtaactgg cggattattc ataaataact
171781 ctaatagcac gatcgtggtt aacaatatgg aaaaacttga catttataaa gacaaacaat
171841 ggtcgattat agaaatgcct atggctaggg tatatcacgg catcgactcg acatttggaa
171901 tgttatattt tgccggaggt ctatccgtta ccgaacaata tggtaattta gagaaaaaca
171961 acgagatatc ttgttacaat cctagaacga ataagtggtt tgatatttca tatactattt
172021 ataagatatc catatcatca ttgtgtaaac taaataacgt cttctatgta tttagtaagg
172081 acattggata tgtggaaaag tatgatggtg catggaagtt agtacatgat cgtctccccg
172141 ctataaaggc attatcaact tctccttatt gattgaaaat gaaaatataa atagttttta
172201 tgtatagcag tattacccta tagttttatt gcttactact aacatggata cagatgttac
172261 aaatgtagaa gatatcataa atgaaataga tagagagaaa gaagaaatac taaaaaatgt
172321 agaaattgaa aataaataaa acattaacaa gaatcatcca agtggatata ttagagaagc
172381 actcgttatt aataccagta gtaatagtga ttccattgat aaagaagtta tagaatgtat
172441 ctgtcacgat gtaggaatat agatcatatc tactaatttt tataatcgat acaaaacata
172501 aaaaacaact cgttattaca tagcaggcat ggaatcctto aagtattgtt ttgataacga
172561 tggcaagaaa tggattatcg gaaatacttt atattctggt aattcaatac tatataaggt
172621 cagaaaaaat ttcactagtt cgttctacaa ttacgtaatg aagatagatc acaaatcaca
172681 caagccattg ttgtctgaaa tacgattcta tatatctgta ttggatcctt tgactatcga
172741 caactggaca cgggaacgtg gtataaagta tttggctatt ccagatctgt atggaattgg
172801 agaaaacgat gattatatgt tcttcgttat aaagaatttg ggaagcgtat tcgccccaaa
172861 ggatactgaa tcagtcttcg aagcatgcgt cactatgata aacacgttag agtttataca
172921 ctctcaagga tttacccatg gaaaaataga accgaggaat atactgatta gaaataaacg
172981 tctttcacta attgactatt ctagaactaa caaactatac aagagtggaa actcacatat
173041 agattacaac gaggacatga taacttcagg aaatatcaat tatatgtgtg tagacaatca
173101 tcttggagca acagtttcaa gacgaggaga tttagaaatg ttgggatatt gcatgataga
173161 atggttcggt ggcaaaactto catggaaaaa cgaaagtagt ataaaagtaa taaaacaaaa
173221 aaaagaatat aaaaaattta tagctacttt ctttgaggac tgttttcctg aaggaaatga
173281 acctctggaa ttagttagat atatagaatt agtatacacg ttagattatt ctcaaaactcc
173341 taattatgac agactacgta aactgtttat acaagattga aattatattc ttttttttat
173401 agagtgtggt agtgttacgg atatttaata ttagactatc tctatcgcgc tacacgacca
173461 atatcgatta ctatggatat cttcagggaa atcgcatctt ctatgaaagg agagaatgta
173521 ttcatttctc cagcgtcaat ctcgtcagta ttgacaatac tgtattatgg agctaatgga
173581 tccactgctg aacagctatc aaaatatgta gaaaaggagg agaacatgga taaggttagc
173641 gctcaaaata tctcattcaa atccataaat aaagtatatg ggcgatattc tgccgtgttt
173701 aaagattcct ttttgagaaa aattggcgat aagtttcaaa ctgttgactt cactgattgt
173761 cgcactatag atgcaatcaa caagtgtgta gatatcttta ctgaggggaa aatcaatcca
173821 ctattggatg aaccattgtc tcctgatacc tgtctcctag caattagtgc cgtatacttt
173881 aaagcaaaat ggttgacgcc attcgaaaag gaatttacca gtgattatcc cttttacgta

FIG. 23 CONT'D

```
173941 tctccgacgg aaatggtaga tgtaagtatg atgtctatgt acggcaaggc atttaatcac
174001 gcatctgtaa aggaatcatt cggcaacttt tcaatcatag aactgccata tgttggagat
174061 actagtatga tggtcattct tccagacaag attgatggat tagaatccat agaacaaaat
174121 ctaacagata caaatttaa gaaaatggtgt aactctctgg aagctacgtt tatcgatgtt
174181 cacatttccca agtttaaggt aacaggcttg tataatctgg tggatacttt agtaaagtca
174241 ggactgacag aggtgttcgg ttcaactgga gattatagca atatgtgtaa ttcagatgtg
174301 agtgtcgacg ctatgatcca caaaacgtat atagatgtca atgaagagta tacagaagca
174361 gctgcagcaa cttgtgcact ggtgtcagac tgtgcatcaa caattacaaa tgagttctgt
174421 gtagatcatc cgttcatcta tgtgattagg catgttgatg gaaaaattct tttcgttggt
174481 agatattgct ctccgacaac taattgttaa ccatttttth taaaaaatag aaaaaacatg
174541 tggtattagt gcaggtcgtt attcttccaa ttgcaattgg taagatgacg gccaacttta
174601 gtacccacgt cttttcacca cagcactgtg gatgtgacag actgaccagt attgatgacg
174661 tcagacaatg tttgactgaa tatatttatt ggtcgtccta tgcataccgc aacaggcaat
174721 gcgctggaca attgtattcc acactcctct cttttagaga tgatgcggaa ttagtgttca
174781 tcgacattcg cgagctggta aaaaatatgc cgtgggatga tgtcaaagat tgtgcagaaa
174841 tcatccgttg ttatataccg gatgagcaaa aaaccatcag agagatttcg gccatcatcg
174901 gactttgtgc atatgctgct acttactggg gaggtgaaga ccatcccact agtaacagtc
174961 tgaacgcatt gtttgtgatg cttgagatgc tcaattacgt ggattataac atcatattcc
175021 ggcgtatgaa ttgatgagtt gtacatcttg acattttctt ctttcttctc ttctcccttt
175081 cccagaaaca aacttttttt acccactata aaataaaatg agtatactac ctgttatatt
175141 tctttctata ttttttttatt cttcattcgt tcagactttt aacgcgcctg aatgtatcga
175201 caaagggcaa tattttgcat cattcatgga gttagaaaac gagccagtaa tcttaccatg
175261 tcctcaaata aatacgctat catccggata taatatatta gatattttat gggaaaaacg
175321 aggagcggat aatgatagaa ttataccgat agataatggt agcaatatgc taattctgaa
175381 cccgacacaa tcagactctg gtatttatat atgcattacc acgaacgaaa cctactgtga
175441 catgatgtcg ttaaatttga caatcgtgtc tgtctcagaa tcaaatatag atcttatctc
175501 gtatccacaa atagtaaatg agagatctac tggcgaaatg gtatgtccca atattaatgc
175561 atttattgct agtaacgtaa acgcagatat tatatggagc gggcatcgac gccttagaaa
175621 taagagactt aaacaacgga cacctggaat tattaccata gaagatgtta gaaaaaatga
175681 tgctggttat tatacatgtg ttttagaata tatatacggt ggcaaaacat ataacgtaac
175741 cagaattgta aaattagagg tacgggataa aataatacct tctactatgc aattaccaga
175801 tggcattgta acttcaatag gtagtaattt gactattgca tgcagagtat cgttgagacc
175861 tcccacaacg gatgcagacg tcttttggat aagtaatggt atgtattacg aagaagatga
175921 tgcggacgga aacggtagaa taagtgtagc aaataaaatc tatatgaccg ataagagacg
175981 tgttattaca tccoggttaa acattaatcc tgtcaaggaa gaagatgcta caacgtttac
176041 gtgtatggcg tttactattc ctagcatcag taaaacagtt actgttagta taacgtgaat
176101 gtatgttgtt acatttccat gtcaattgag tttataagaa tttttataca ttatcttcca
176161 acaagcaatt gacgaacgta ttgctatgat taactcccac gatactatgc atattattaa
176221 tcattaactt gcagactata cctagagcta ttttgacata ctcgtgttct tgtgtaattg
176281 cagtatctat attattaaag tacgtaaatc tagctatagt tttattattt aattttagat
176341 aatataccgt ctccttattt ttaaaaattg ccacatcctt tattaaatca tgaatgggaa
176401 tttctatgtc atagttaata tattgtgaac aacaagagca gatatctata ggaaagggtg
176461 gaatgcgata cattgatcta tgtagtttta aaacacacgc aaactttgaa gaatttatat
176521 aaatcattcc atcgatacat ccttctatgt tgagatgtat atatccagga attcgtttat
176581 taatatcggg aaatgtataa actaaaacat tgcccggaag cggagcttct accggagtta
176641 tatcagtttt taacttacaa aatgtaacca ataccttgc atgacttgtt ttgttcggca
176701 acgttagttt aaacttgacg aatggattaa ttacaatagc atgatccgcg catctattaa
176761 gttttttttac tttaacgccc ttgtatgttt ttacagagac tttatctaaa tttctagtgc
176821 ttgtatgtgt tataaatata acgggatata gaactgaatc acctacctta gataccccaat
176881 tacattttat cagatccaga taataaacaa attttgtcgc cctaactaat tctatattgt
176941 tatatatttt acaattggtt atgatatcat gtaataactt ggaatctaac gcacatcgtc
177001 gtacgtttat acaattgtga tttagtgtag tatatctaca catgtatttt tccgcgctat
177061 agtattctgg actagtgata aaactatcgt tatatctgtc ttcaatgaac tcatcgagat
177121 attgctctct gtcatattca tacacctgca taaacttttct agacatctta caatccgtgt
177181 tattttagga tcatatttac atatttacgg gtatatcaaa gatgttagat tagttaatgg
177241 gaatcgtcta taataatgaa tattaaacaa ttatatgagg acttttacca caaagcatca
177301 taaaaatgag tcgtcgtctg atttatgttt taaatatcaa ccgcgaatca actcataaaa
```

FIG. 23 CONT'D

```
177361 tacaagagaa tgaaatatat acatatttta gtcattgcaa tatagaccat acttctacag
177421 aacttgattt tgtagttaaa aactatgatc taaacagacg acaacctgta actgggtata
177481 ctgcactaca ctgctatttg tataataatt actttacaaa cgatgtactg aagatattat
177541 taaatcatgg agtggatgta acgatgaaaa ccagtagcgg acgtatgcct gtttatatat
177601 tgcttactag atgttgcaat atttcacatg atgtagtgat agatatgata gacaaagata
177661 aaaaccactt attacataga gactattcca acctattact agagtatata aaatctcgtt
177721 acatgttatt aaaggaagag gatatcgatg agaacatagt atccacttta ttagataagg
177781 gaatcgatcc taactttaaa caagacggat atacagcgtt acattattat tatttgtgtc
177841 tcgcacacgt ttataaacca ggtgagtgta gaaaaccgat aacgataaaa aaggccaagc
177901 gaattatttc tttgtttata caacatggag ctaatctaaa cgcgttagat aattgtggta
177961 atacaccatt ccatttgtat cttagtattg aaatgtgtaa taatattcat atgactaaaa
178021 tgctgttgac ttttaatccg aatttcgaaa tatgtaataa tcatggatta acgcctatac
178081 tatgttatat aacttccgac tacatacaac acgatattct tgttatgtta atacatcact
178141 atgaaacaaa tgttggagaa atgccgatag atgagcgtcg tataatcgta ttcgagttta
178201 tcaaaacata ttctacacgt cctgcagatt cgataactta tttgatgaat aggtttaaaa
178261 atatagatat ttatacccgc tatgaaggaa agacattatt acacgtagca tgtgaatata
178321 ataatacaca cgtaatagat tatcttatac gtatcaacgg agatataaat gcgttaaccg
178381 acaataacaa acacgctaca caactcatta tagataacaa agaaaattcc ccatatacca
178441 ttaattgttt actgtatata cttagatata ttgtagataa gaatgtgata agatcgttgg
178501 tggatcaact tccatctcta cctatcttcg atataaaatc atttgagaaa ttcatatcct
178561 actgtatact tttagatgac acattttaca atagacacgt taggaatcgc gattctaaaa
178621 cgtatcgata cgcattttca aaatacatgt cgtttgataa atacgatggt ataataacta
178681 aatgtcataa agaaacaata ttgctcaaac tatccactgt tctagacact acactatatg
178741 cagttttaag atgccataat tcgaaaaagt taagaagata cctcaccgag ttaaaaaaat
178801 ataataacga taagtccttt aaaatatatt ctaatattat gaatgagaga taccttaatg
178861 tatattataa agatatgtac gtgtcaaagg tatatgataa actatttcct gttttcacag
178921 ataaaaattg tctactaaca ttactacctt cagaaattat atacgaaata ttatacatgc
178981 tgacaattaa cgatctttat aatatatcgt atccacctac caaagtatag ttgtattttt
179041 ctcatgcgat gtgtgtaaaa aaactgatat tatataaata ttttagtgcc gtataataaa
179101 gatgacgatg aaaatgatgg tacatatata tttcgtatca ttattgttat tgctattcca
179161 cagttacgcc atagacatcg aaaatgaaat cacagaattc ttcaataaaa tgagagatac
179221 tctaccagct aaagactcta aatggttgaa tccagcatgt atgttcggag gcacaatgaa
179281 tgatatagcc gctctaggag agccattcag cgcaaagtgt cctcctattg aagacagtct
179341 tttatcgcac agatataaag actatgtggt taaatgggaa aggctagaaa aaaatagacg
179401 gcgacaggtt tctaataaac gtgttaaaca tggtgattta tggatagcca actatacatc
179461 taaattcagt aaccgtaggt atttgtgcac cgtaactaca aagaatggtg actgtgttca
179521 gggtatagtt agatctcata ttagaaaacc tccttcatgc attccaaaaa catatgaact
179581 aggtactcat gataagtatg gcatagactt atactgtgga attctttacg caaaacatta
179641 taataatata acttggtata aagataataa ggaaattaat atcgacgaca ttaagtattc
179701 acaaacggga aaggaattaa ttattcataa tccagagtta gaagatagcg gaagatacga
179761 ctgttacgtt cattacgacg acgttagaat caagaatgat atcgtagtat caagatgtaa
179821 aatacttacg gttataccgt cacaagacca caggtttaaa ctaatactag atccaaaaat
179881 caacgtaacg ataggagaac ctgccaatat aacatgcact gctgtgtcaa cgtcattatt
179941 gattgacgat gtactgattg aatgggaaaa tccatccgga tggcttatag gattcgattt
180001 tgatgtatac tctgttttaa ctagtagagg cggtattacc gaggcgacct tgtactttga
180061 aaatgttact gaagaatata taggtaatac atataaatgt cgtggacaca actattattt
180121 tgaaaaaacc cttacaacta cagtagtatt ggagtaaata tacaatgcat ttttatatac
180181 attactgaat aattattatt attatttata tcgtatttgt gctataacgc gactatctag
180241 gtatttgtat ctcaccgata gagaacatat aaatgtagac tctattaaac agttgtgtaa
180301 aatatcagat cctaatgcat gttatagatg tggatgtacg gctttacatg agtactttta
180361 taattataga tcagtcaacg gaaaatacaa gtatagatac aacggttact atcaatatta
180421 tttatctagc gattatgaaa attataatga atattattat gatgattatg atagaactgg
180481 tatgaacagt gagagtgata atatatcaat caaaacagaa tatgaattct atgatgaaac
180541 acaagatcaa agtacacaac tagtagatta cgacattaaa ctcaaaacca atgaggatga
180601 ttttatggct atgatagatc agtgggtgtc catgattata tagatgaatc aattaataaa
180661 gtagtatatg gaagagagtc tcacgtaaga tggcgggata tatggcaaga acataatgat
180721 ggcgtataca gtataggaaa ggagtgcata gataatatat acgaagacaa ccataccgta
```

FIG. 23 CONT'D

180781 gacgaattct acaagataga cagcgtatca gatgtagatg acgcggaaca catatctccg
180841 ataactaatg atgtatctac acaaacatgg gaaaagaaat cagagttaga tagatacatg
180901 gaaatgtatc ctcgtcatag atatagtaag cattctgtct ttaagggatt ttctgacaaa
180961 gttagaaaaa atgatttaga catgaatgtg gtaaaagaat tactttctaa cggtgcatct
181021 ctaacaatta aggatagcag taataaggat ccaataaccg tttatttccg aagaacgata
181081 atgaatttag aaatgattga tgaacgaaag tatatagtac actcctatct aaaaaattat
181141 aaaaatttcg attatccatt tttcaggaag ttagttttga ctaataaaca ttgtctcaac
181201 aattattata atataagcga cagcaaatat ggaacaccgc tacatatatt ggcgtctaat
181261 aaaaaattaa taactcctaa ttacatgaag ttattagtgt ataacggaaa tgatataaac
181321 gcacgaggtg aagatacaca aatgcgaact ccattacaca aatatttgtg taaatttgta
181381 tatcataata ttgaatatgg tatccgatac tataatgaaa agattataga cgcatttata
181441 gagttaggag ccgatctaac tattccaaat gacgatggaa tgataccagt agtttactgt
181501 atacactcaa atgccgaata tggttataac aatattacta acataaagat aatacgtaaa
181561 ctacttaatc ttagtagacg tgcgtcacat aatctattta gagatcgagt catgcacgat
181621 tatataagta atacatatat tgatcttgag tgtttagata ttattagatc gttggatgga
181681 ttcgatatca atggttactt tgaaggacgt acaccacttc attgcgctat acaacataac
181741 ttcactcaga ttgctaagta cttattagat cgaggagctg atatagtcgt acccaacaca
181801 ttgattatac atcagtacat acagtaaata gcatagatat ggaggaggat acaaatattt
181861 caaataaagt tataaggtac aacactgtca ataatatatg ggaaacatta cctaacttct
181921 ggactggaac tataaatcca ggcgtggtct cgcataaaga tgatatatat gttgtatgcg
181981 acatcaaaga tgaaaaaaat gttaaaactt gtatatttag atataacacg aatacgtata
182041 acggatggga attggtcacg acgacagaaa gcagattatc agctctgcat actattcttt
182101 ataacaatac cataatgatg ttacattgtt atgaatcgta tatgttacaa gatacattta
182161 atgtgtacac tcgcgaatgg aatcatatgt gtcatcaaca ttcgaatagt tatatcatgt
182221 acaatatact acccatctac taaatataat agaataaaat aaatgagtat gatcatttta
182281 gataacgatt gattttatca ttaccgcttc attcttatat tctttgctta cggaacctat
182341 atttagaaac atctactaac gatttttat gcttgcatta ttaatggtat gtaatatgat
182401 tgattgtgta cgcaatacca atttgttaag tatgaatacg gggtacaaac ataaactgaa
182461 gtttaacatt atttatttat gatatatatc gttattgttt ggtctatacc atggatatct
182521 ttaaagaact aatcttaaaa cacacggatg aaaatgtttt gattttctcca gtttctattt
182581 tatctacttt atctattcta aatcatggag cagctggttc tacagctgaa caactatcaa
182641 aatatataga gaatatgaat gagaatacac ccgatgacaa taatgacatg gacgtagata
182701 ttccgtattg tgcgacacta gctaccgcaa ataaaatata cggtagcgat agtatcgagt
182761 tccacgcctc cttcctacaa aaaataaaag acgattttca aactgtaaac tttaataatg
182821 ctaaccaaac aaaggaacta atcaacgaat gggttaagac aatgacaaat ggtaaaatta
182881 attccttatt gactagtccg ctatccatta atactcgtat gacagttgtt agcgccgtcc
182941 attttaaagc aatgtggaaa tatccatttt ctaaacatct tacatataca gacaagtttt
183001 atatttctaa gaatatagtt accagtgttg atatgatggt gagcactgag aataacttgc
183061 aatatgtaca tattaatgaa ttattcggag gattctctat tatcgatatt ccatacgagg
183121 gaaactctag tatggtaatt atactaccgg acgacataga aggtatatat aacatagaaa
183181 aaaatataac agatgaaaaa tttaaaaaat ggtgtggtat gttatctact aaaagtatag
183241 acttgtatat gccaaagttt aaagtggaaa tgacagaacc gtataatctg gtaccgattt
183301 tagaaaattt aggacttact aatatattcg gatattatgc agattttagc aagatgtgta
183361 atgaaactat cactgtagaa aaatttctac atacgacgtt tatagatgtt aatgaggagt
183421 atacagaagc atcggccgtt acaggagtat ttatgactaa cttttcgatg gtatatcgta
183481 cgaaggtcta cataaaccat ccattcatgt acatgattaa agacaacaca ggacgtatac
183541 tttttatagg gaaatactgc tatccgcaat aaatataaac aaatagactt ttatcacgtt
183601 tatctatgtc taaatattac aaatagtaat agtataaact aaagctgata atacttaaaa
183661 aaataaataat atcatttaca attaatagta taaactaaaa attaaacaaa tcgttattat
183721 aagtaatatc aaaatgatga tatacggatt aatagcgtgt cttatattcg tgacttcatc
183781 catcgctagt ccacttttata ttcccgttat tccacccatt tcggaagata aatcgttcaa
183841 tagtgtagag gtattagttt ccttgtttag agatgaccaa aaagactata cggtaacttc
183901 tcagttcaat aactacacta tcgataccaa agactggact atcggcgtac tatccacacc
183961 tgatggtttg gatataccat tgactaatat aacttattgg tcacggttta ctataggtcg
184021 tgcattgttc aaatcagagt ctgaggatat tttccaaaag aaaatgagta ttctaggtgt
184081 ttctatagaa tgtaagaagt cgtcgacatt acttactttt ttgaccgtgc gtaaaatgac
184141 tcgagtattt aataaatttc cagatatggc ttattatcga ggagactgtt taaaagccgt

FIG. 23 CONT'D

184201 ttatgtaaca atgacttata aaaatactaa aactggagag actgattaca cgtacctctc
184261 taatgggggg ttgcctgcat actatcgtaa tggggtcgat ggttgattat tgattagtat
184321 attccttatt ctttttattc acacaaaaag aacatttttа taaaacatgaa accactgtct
184381 aaatgtaatt atgatcttga tttatagatg aagatcagcc tttagaggat tttaaccagt
184441 atgtttaata tgaaaaaaat aaacataaca tattttgaga ttaagcgcta ttgtgcaaga
184501 ttatattaga atcaaattaa tctttcatac gagaaaaata acgacatacg tcgtcaacaa
184561 attaaacttt ttatttatta gttaactagc ttatagaact tgctcattgt tatgtttcta
184621 aaacgggtac gacatatagg acaattatcc gacgcaccgg tttctcttcg tgttttatgc
184681 catatattga tgcatgttat gcaaaatata tgagtacacg aatccaataa accaaagtat
184741 ctatcgtttt gagtaaacaa cttcatagca aattccacat tctttttctt tacttactct
184801 atacacgtcc tcgtatttat ccagtatttt gatgatatcc aactcagaaa tggttgttgt
184861 attattgggt gtattgggag tataggtatt attagctatg taccaatttа ccaaccctct
184921 taatattgat tgaacaatca catcggttat ccaatcaate accacattaa taactaaatt
184981 gtagtgtata tatagaccat atatgtttct attttttga cagttacgta tagtttcagt
185041 aagttttgat tgttgtattc ctgtatctct agataagtta gtcatatagt cccttccggc
185101 gatacgtttt ttccaagccc gaaattgatt agccaaatgt gtatttattt ttgtgatatt
185161 gatataatat gtaatgttat taatatttcg gataatgcat actgttagtc ttatatcatt
185221 tggttcatct atgtattgta atattgttac atgatctata gatgatgtat tgattttggc
185281 aggatcgaat tccatatccg cgactaaaca gtgaaaaaaa tgtaaatact ttttaaattt
185341 taaattagta aaacttttтt ttatttttta tgattccaaa aatactgaat acaaagtcct
185401 aaattataaa tatggagatc atactaccac aacttattat tatgcatact cagccggtgt
185461 aatagataga tatatataat tctattacac cggcagacaa ttaccgatcg gtatttgtcg
185521 ttaccaacat accgtataat atgtaatata caattccata acccattgac agttgttata
185581 catcaaaatt gcaattcttt tgattacgat gttataagaa tgtagttaat tgatgtatga
185641 tgttaatgtg tcctcttttcc tcttataaca tcgtaatcaa aaacttтttt ataatatata
185701 cctaataatg tgtcttaata gttctcgtga ttcgtcaaac aatcattctt ataaaatata
185761 ataaagcaac gtaaaacaca taaaaataag cgtaactaat aagacaatgg atatttacga
185821 cgataaaggt ctacagacta ttaaactgtt taataatgaa tttgattgta taaggaatga
185881 catcagagaa ttatttaaac atgtaactga ttccgatagt atacaacttc cgatggaaga
185941 caattctgat attatagaaa atatcagaaa aatactatat agacgattaa aaaatgtaga
186001 atgtgttgac atcgatagta caataacttt tatgaaatac gatccaaatg atgataataa
186061 gcgtacgtgt tctaattggg taccccttaac taataactat atggaatatt gtctagtaat
186121 atatttggaa acaccgatat gtggaggcaa aataaaatta taccacccta caggaaatat
186181 aaagtcggat aaggatatta tgtttgcaaa gactctagac tttaaatcaa agaaagtgtt
186241 aactggacgt aaaacaattg ccgttctaga catatccgtt tcatataata gatcaatgac
186301 tactattcac tacaacgacg acgttgatat agatatacat actgataaaa atggaaaaga
186361 gttatgttat tgttatataa caatagatga tcattacttg gttgatgtgg aaactatagg
186421 agttatagtc aatagatctg gaaaatgtct gttagtaaat aaccatctag gtataggtat
186481 cgttaaagat aaacgtataa gcgatagttt tggagatgta tgtatggata caatatttga
186541 cttttctgaa gcacgagagt tattttcatt aactaatgat gataacagga atatagcatg
186601 ggacactgat aaactagacg atgatacaga tatatggact cccgtcacag aagatgatta
186661 caaatttctt tctagactag tattgtatgc aaaatctcaa tcggatactg tattcgacta
186721 ttatgttctt actggtgata cggaaccacc cactgtattc attttcaagg taactagatt
186781 ttactttaat atgccgaaat aaaaaatttt tgtataatat ctagaggtag aggtattgtt
186841 tagataaata caaataacat agatacatcg catacttagc atttttatаa atatacataa
186901 gacatacact ttatacattt ttttтgtaaa aatactcata aaaaaattta taaaaattat
186961 ggcacaacca tatcttgtat aggtagttta gttcgtcgag tgaacctata aacagataat
187021 agacaacacg taataataat aatgcctact aatacaagca taatacggg agatgggata
187081 tatgacgttg tagtgtttgg gttttctgaa cgttgatagt ctactaatac tacatgctga
187141 catctaatgc ctgtataacc atgagagcat ctacaatаca taccgtcaat atctctagcg
187201 tggatacagt caccgtgtaa acaatatcca tctcctctg gaccgcataa tctgatagct
187261 ggaatatctg ttgtagcgtt tgtaatttct ggcgatgtcg tttcgatagc gttaccacta
187321 tcggcgaatg atctgattat catagcagcg aacaacaaca tcagatattt catcgacatt
187381 tttgatggat tttgtgttta tgctgtttct cagtgtgtgt ttatgacaag attgggaatt
187441 ttatattatt aattcagtaa tataaactaa taatatattg ttaattgtgt aaatаatata
187501 aaaataacaa tacaatattg aatgtgttgc tgttaaaaat gatcataaac acggagttta
187561 ttttatatgt ctcgcataaa cattactaaa aaaatatatt gttctgtttt tctttcacat

FIG. 23 CONT'D

187621 ctttaattat gaaaaagtaa atcattatga gatggacgag attgtacgca tcgttcgcga
187681 cagtatgtgg tacatacota acgtatttat ggacgacggt aagaatgaag gtcacgtttc
187741 tgtcaacaat gtctgtcata tgtatttcac gttctttgat gtggatacat cgtctcatct
187801 gtttaagcta gttattaaac actgcgatct gaataaacga ggtaactctc cattacattg
187861 ctatacgatg aatacacgat ttaatccatc tgtattaaag atattgttac accacggcat
187921 gcgtaacttt gatagcaagg atgaaaaagg acaccactat caatcgataa caagatcttt
187981 gatatactaa cggacaccat tgatgacttt agtaaatcat ccgatctatt gctgtgttat
188041 cttagatata aattcaatgg gagcttaaac tattacgttc tgtacaaagg atccgacgag
188101 gatgaactca cttctcttca ttactactgt aaacacatat ccacgttcta caaaagcaat
188161 tattacaagt taagtcacac taagatgcga gccgagaagc gattcatcta cgcgataata
188221 gattatggag caaacattaa cgcggttaca cacttacctt caacagtata ccaaacatag
188281 tcctcgtgtg gtgtatgctc ttttatctcg aggagccgat acgaggatac gtaataatct
188341 tgattgtaca cccatcatgg aacgattgtg caacaggtca tattctcata atgttactca
188401 attggcacga acaaaaggaa gaaggacaac atcttacttta tctattcata aaacataatc
188461 aaggatacac tctcaatata ctacggtatc tactagatag gttcgacatt cagaaagacg
188521 aatactataa taccgccttt caaaattgta acaacaatgt tgcctcatac atcggatacg
188581 acatcaacct tccgactaaa gacggtattc gacttggtgt ttgaaaacag aaacatcata
188641 tacaaggcgg atgttgtgaa tgacatcatc caccacagac tgaaagtatc tctacctatg
188701 attaaatcgt tgttctacaa gatgtctctc cctacgacga ttactacgta aagaagataa
188761 tagcctactg cctattaagg gacgagtcat tcgcggaact acatagtaaa ttctgtttaa
188821 acgaggacta taaaagtgta tttatgaaaa atatatcatt cgataagata gattccatca
188881 tcgtgacata agtcgcctta aagagattcg aatctccgac accgacctgt atacggtatc
188941 acagctatct taaagccata cattcagaca gtcacatttc atttcccatg tacgacgatc
189001 tcatagaaca gtgccatcta tcgatggagc gtaaaagtaa actcgtcgac aaagcactca
189061 ataaattaga gtctaccatc ggtcaatcta gactatcgta tttgcctccg gaaattatgc
189121 gcaatatcat ctaaacagta tgttgtacga aaagaaccat tacaaatatt atccatgata
189181 gaaagaaaat atctatatga ttggagaagt aggaaacagg aacaagacga cgattactac
189241 attattaaat catgaagtcc gtattatact cgtatatatt gtttctctca tgtataataa
189301 taaacggaag agatatagca ccgcatgcac catccgatgg aaagtgtaaa gacaacgaat
189361 acaaacgcca taatttgtgt ccgggaacat acgcttccag attatgcgat agcaagacta
189421 acacacaatg tacgccgtgt ggttcgggta ccttcacatc tcgcaataat catttacccg
189481 cttgtctaag ttgtaacgga agacgcgacc gtgtaacacg actcacaata gaatctgtga
189541 atgctctccc ggatattatt gtcttctcaa aggatcatcc ggatgcaagg catgtgttcc
189601 ccaaacaaaa tgtggaatag gatacggagt atccggagac gtcatctgtt ctccgtgtgg
189661 tctcggaaca tattctcaca ccgtctcttc cgcagataaa tgcgaacccg tacccagtaa
189721 taccttttaac tatatcgatg tggaaattaa tctgtatcca gttaacgacc actaccggtc
189781 tcagcgaatc catctcaacg tcggaactaa ctattactat gaatcataaa gactgtaatc
189841 ccgtatttcg tgaggaatac ttctccgtcc ttaataaggt agcaacttca ggtttcttta
189901 caggagaaag gtgtgcactc tgaatttcga gattaaatgc aataacaaaa atttttcctc
189961 caaacagtta acgaaagcaa agaatgatga cggtatcatg ccgcattcgg agactgtcta
190021 tctagcgtcg acatctatat actatatagt aataccaata ctcaagacta cgaaactgat
190081 acaatctctt atcatgtggg taatgttctc gatgtcgata gccatatgcc cggtagttgc
190141 gatatacata aactgatcac taattccaaa cccacccgct ttttatagta agtttttcac
190201 ccataaataa taaatacaat aattaatttc tcgtaaaagt agaaaatata ttctaattta
190261 ttgcacggta aggaagtaga atcataaaga acagtactca atcaatagca atcatgaaac
190321 aatatatcgt cctggcatgc atgtgcctgc cagtcttcag caatcatcct catcctcctc
190381 ctcgtgtacg gaagaagaaa acaaacatca tatgggaatc gatgttatta tcaaagtcac
190441 aaagcaagac caaacaccga ccaatgataa gatttgccaa tccgtaacgg aaattacaga
190501 gtccgagtca gatccagatc ccgaggtgga atcagaagat gattccacat cagtcgagga
190561 tgtagatcct cctaccactt attactccat catcggtgga ggtctgagaa tgaactttgg
190621 attcaccaaa tgtcctcaga ttaaatccat ctcagaatcc gctgatggaa acacagtgaa
190681 tgctagattg tccagcgtgt ccccaggaca aggtaaggac tctcccgcga tcactcatga
190741 agaagctctg gctatgatca aagactgtga ggtgtctatc gacatcagat gtagcgaaga
190801 agagaaagac agcgacatca agacccatcc agtactcggg tctaacatct ctcataagaa
190861 agtgagttac gaagatatca tcggttcaac gatcgtcgat acaaaatgtg tcaagaatct
190921 agagtttagc gttcgtatcg gagacatgtg caaggaatca tctgaacttg aggtcaagga
190981 tggatttaag tatgtcgacg gatcggcatc tgaaggtgca accgatgata cttcactcat

FIG. 23 CONT'D

```
191041 cgattcaaca aaactcaaag cgtgtgtctg aatcgataac tctattcatc tgaaattgga
191101 tgagtagggt taatcgaacg attcaggcac accacgaatt aaaaaagtgt accggacact
191161 atattccggt ttgcaaaaca aaaatgttct taactacatt cacaaaaagt tacctctcgc
191221 gacttcttct ttttctgtct caatagtgtg atacgattat gacactattc ctattcctat
191281 tcctatttcc tttcagggta tcacaaaaat attaaacctc tttctgatgg tctcataaaa
191341 aaagttttac aaaaatattt ttattctctt tctctctttg atggtctcat aaaaaaagtt
191401 ttacaaaaat atttttattc tctttctctc tttgatggtc tcataaaaaa agttttacaa
191461 aaatattttt attctctttc tctctttgat ggtctcataa aaaaagtttt acaaaaatat
191521 ttttattctc tttctctctt tgatggtctc ataaaaaaag ttttacaaaa atatttttat
191581 tctctttctc tctttgatgg tctcataaaa aaagttttac aaaaatattt ttattctctt
191641 tctctctttg atggtctcat aaaaaaagtt ttacaaaaat atttttattc tctttctctc
191701 tttgatggtc tcataaaaaa agttttacaa aaatattttt attctctttc tctctttgat
191761 ggtctcataa aaaatattaa acctctttct gatggtgtca ctaaaatatt tttattctca
191821 ttctcatttt ctctttctct cttcaatgga gtcataaaat atttttattc tctttctctc
191881 ttcgatggtc tcacaaaaat attaaacctc tttctgatgg tgtcactaaa atatttttat
191941 tctcattctc attttctctt tctctcttca atggagtcat aaaatatttt tattctcttt
192001 ctctcttcga tggtctcaca aaaatattaa acctctttct gatggagtcg taaaaaagtt
192061 ttatctcttt ctctcttcga tggtctcaca aaaatattaa acctctttct gatggagtcg
192121 taaaaaagtt ttatctcttt ctctcttcga tggtctcaca aaaatattaa acctctttct
192181 gatggagtcg taaaaaagtt ttatctcttt ctctcttcga tggtctcaca aaaatattaa
192241 acctctttct gatggagtcg taaaaaagtt ttatctcttt ctctcttcga tggtctcaca
192301 aaaatattaa acctctttct gatggagtcg taaaaaagtt ttatctcttt ctctcttcga
192361 tggtctcaca aaaatattaa acctctttct gatggagtcg taaaaaagtt ttatctcttt
192421 ctctcttcga tggtctcaca aaaatattaa acctctttct gatggagtcg taaaaaagtt
192481 ttatctcttt ctctcttcga tggtctcaca aaaatattaa acctctttct gatggagtcg
192541 taaaaaagtt ttatctcttt ctctcttcga tggtctcaca aaaatattaa acctctttct
192601 gatggagtcg taaaaaagtt ttatctcttt ctctcttcga tggtctcaca aaaatattaa
192661 acctctttct gatggagtcg taaaaaagtt ttatctcttt ctctcttcga tggtctcaca
192721 aaaatattaa acctctttct gatggagtcg taaaaaagtt ttatctcttt ctctcttcga
192781 tggtctcaca aaaatattaa acctctttct gatggagtcg taaaaaagtt ttatctcttt
192841 ctctcttcga tggtctcaca aaaatattaa acctctttct gatggagtcg taaaaaagtt
192901 ttatctcttt ctctcttcga tggtctcaca aaaatattaa acctctttct gatggagtcg
192961 taaaaaagtt ttatctcttt ctctcttcga tggtctcaca aaaatattaa acctctttct
193021 gatggagtcg taaaaaagtt ttatctcttt ctctcttcga tggtctcaca aaaatattaa
193081 acctctttct gatggagtcg taaaaaagtt ttatctcttt ctctcttcga tggtctcaca
193141 aaaatattaa acctctttct gatggagtcg taaaaaagtt ttatctcttt ctctcttcga
193201 tggtctcaca aaaatattaa acctctttct gatggagtcg taaaaaagtt ttatctcttt
193261 ctctcttcga tggtctcact aaaatatttt ttattctctt tctgatgcat caactatttc
193321 ttaaacaata acgtccaaca acatatactc gtcgagctta tcaacatccc ctatgcccat
193381 ctaggttacc agacaattgt atatcataaa ataatgttta taatttacac gttaaaatca
193441 tataataaaa cgtagatcgt ataatatttt ttggtatata aatgatctag taaaatccat
193501 gtaggggata ctgctcacat tttttctttg gtacaaaatt tcacacaagt ttttatacag
193561 acaaattctt gtccatatat tttaaaacat tgacttttgt actaagaaaa atatctagat
193621 caactatctc tttctctttc tctcttcgat ggtctcacaa aaatattaaa cctctttctg
193681 atggagtcgt aaaaaagttt tatctctttc tctcttcgat ggtctcacaa aaatattaaa
193741 cctctttctg atggagtcgt aaaaaagttt tatctctttc tctcttcgat ggtctcacaa
193801 aaatattaaa cctctttctg atggagtcgt aaaaaagttt tatctctttc tctcttcgat
193861 ggtctcacaa aaatattaaa cctctttctg atggagtcgt aaaaaagttt tatctctttc
193921 tctcttcgat ggtctcacaa aaatattaaa cctctttctg atggagtcgt aaaaaagttt
193981 tatctctttc tctcttcgat ggtctcacaa aaatattaaa cctctttctg atggagtcgt
194041 aaaaaagttt tatctctttc tcttcgatg gtctcacaaa aatattaaac ctctttctga
194101 tggagtcgta aaaaagtttt atctctttct ctcttcgatg gtctcacaaa aatattaaac
194161 ctctttctga tggagtcgta aaaaagtttt atctctttct ctcttcgatg gtctcacaaa
194221 aatattaaac ctctttctga tggagtcgta aaaaagtttt atctctttct ccttcgatgg
194281 tctcacaaaa atattaaacc tctttctgat ggagtcgtaa aaaagtttta tctctttctc
194341 cttcgatggt ctcacaaaaa tattaaacct ctttctgatg gagtcgtaaa aaagttttat
194401 ctctttctct cttcgatggt ctcacaaaaa tattaaacct ctttctgatg gagtcgtaaa
```

FIG. 23 CONT'D

```
194461 aaagttttat ctctttctct cttcgatggt ctcacaaaaa tattaaacct ctttctgatg
194521 gtctctataa agcgatcgat ctttcttaca ctctagagtt tcctacagtc atgggtcaca
194581 catttttttc tagacactaa ataaaattag taaaattaaa ttaattataa aattatatat
194641 ataatttact aactttagtt agataaatta ataatatata agttttagta cattaatatt
194701 atattttaaa t
```

FIG. 24A

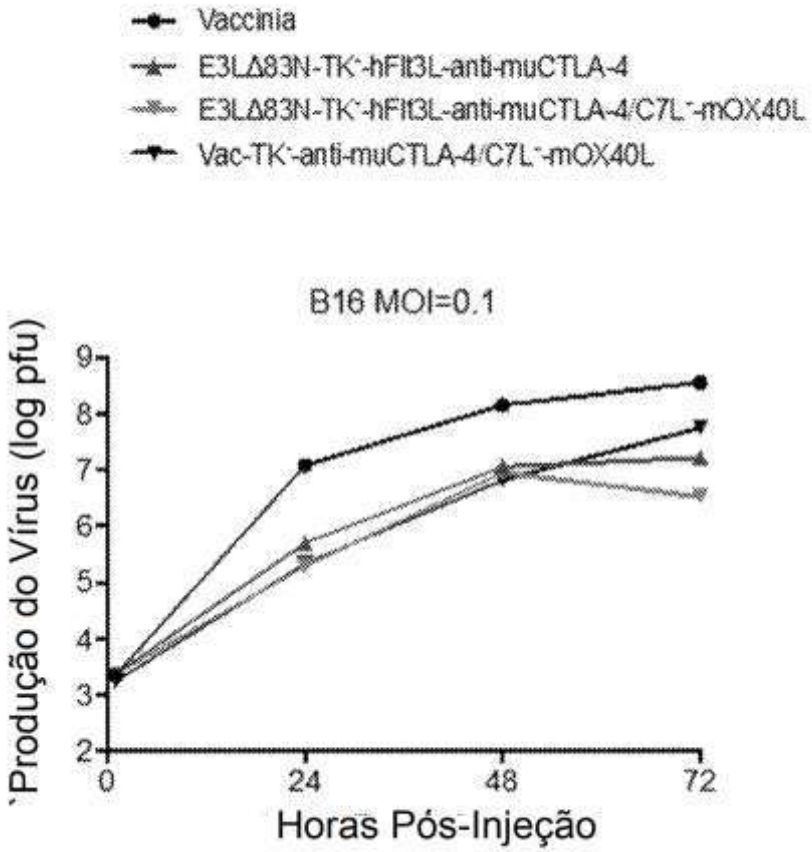

Vaccinia
E3LΔ83N-TK⁻-hFlt3L-anti-muCTLA-4
E3LΔ83N-TK⁻-hFlt3L-anti-muCTLA-4/C7L⁻-mOX40L
Vac-TK⁻-anti-muCTLA-4/C7L⁻-mOX40L
B16 MOI=0.1
Produção do Vírus (log pfu)
9
8
7
6
5
4
3
2
0
24
48
72
Horas Pós-Injeção

FIG. 24B

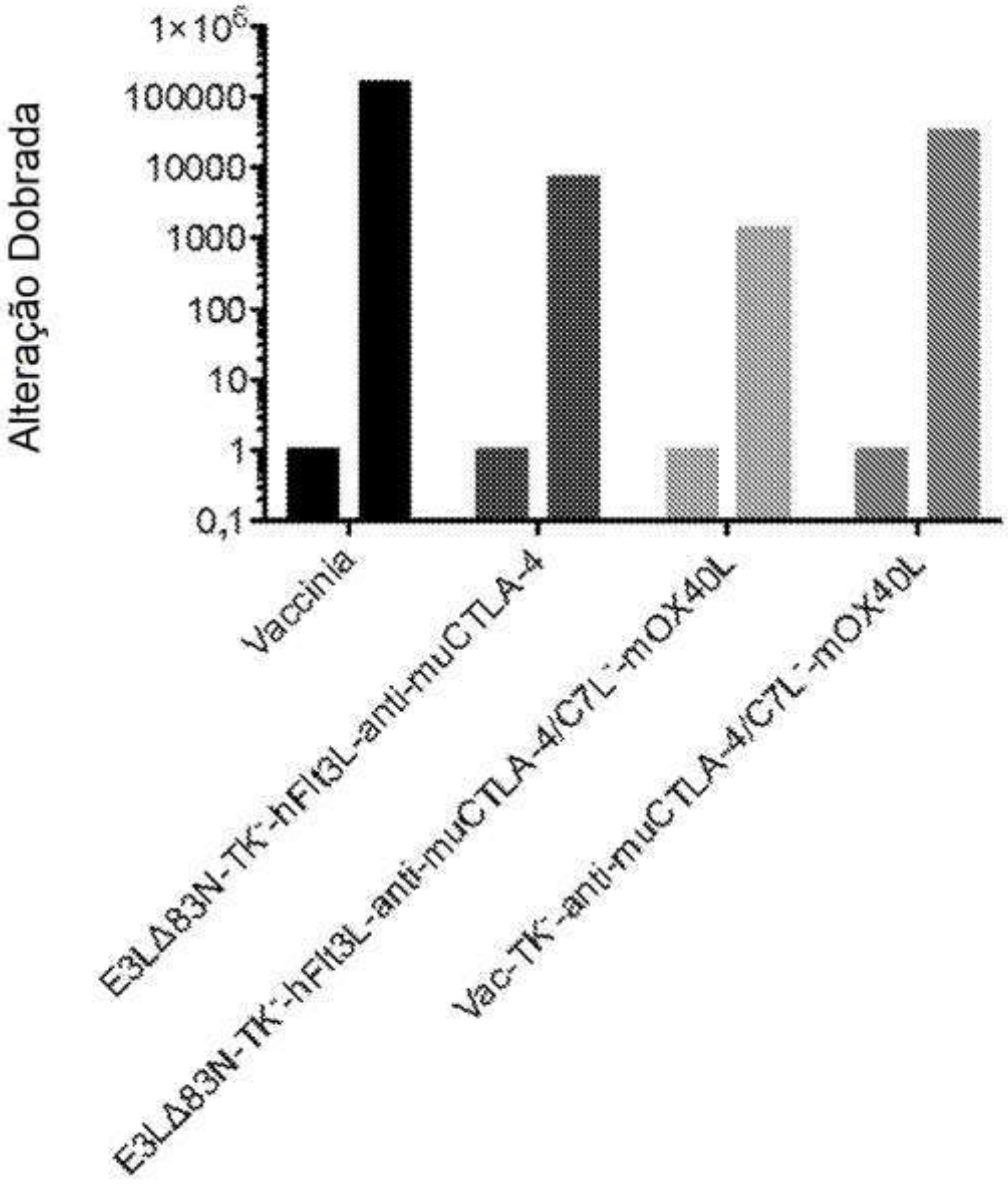

Alteração Dobrada
1×10^6
100000
10000
1000
100
10
1
0,1
Vaccinia
E3LΔ83N-TK⁻-hFlt3L-anti-muCTLA-4
E3LΔ83N-TK⁻-hFlt3L-anti-muCTLA-4/C7L⁻-mOX40L
Vac-TK⁻-anti-muCTLA-4/C7L⁻-mOX40L

FIG. 25

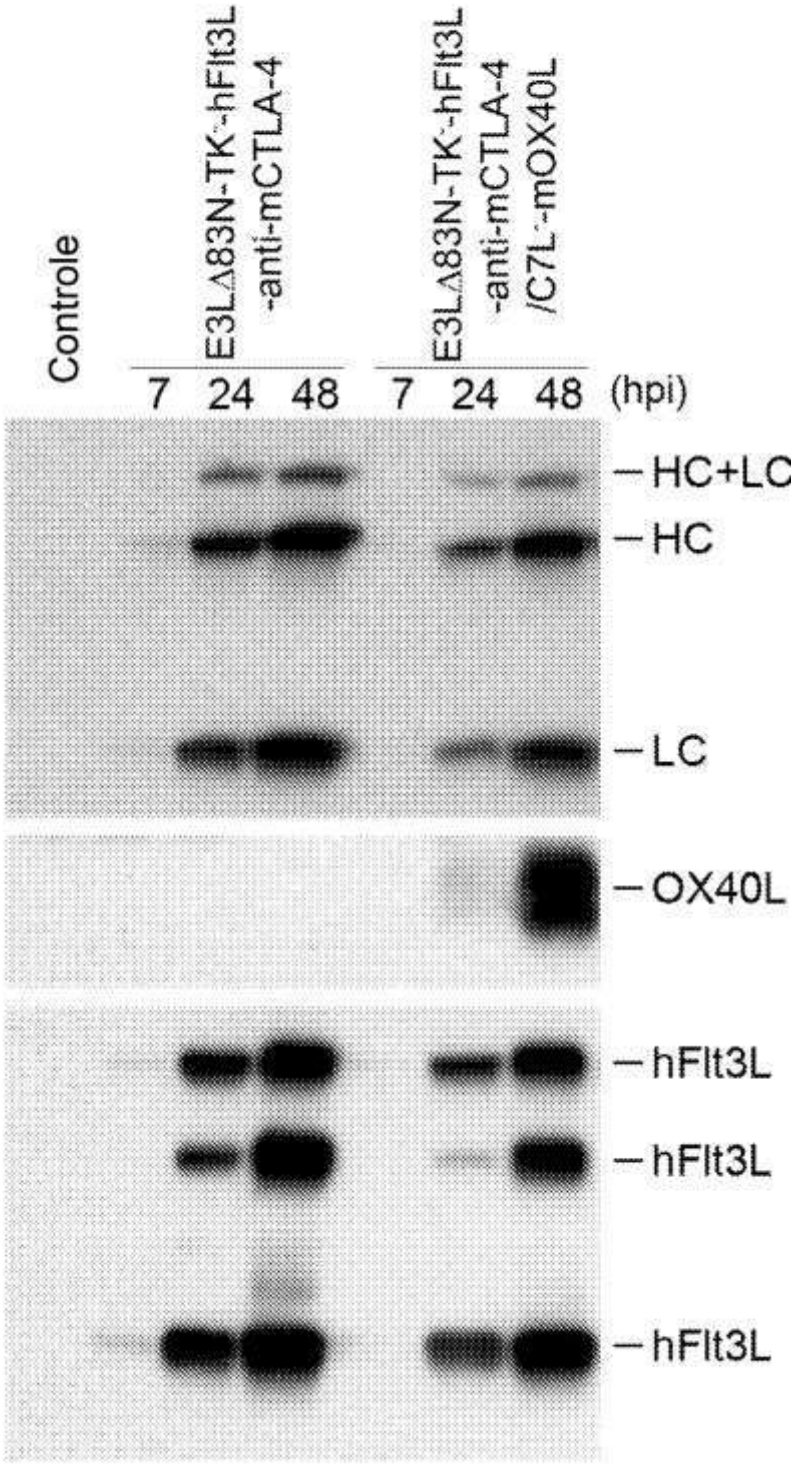

Controle
E3LΔ83N-TK⁻-hFlt3L -anti-mCTLA-4
E3LΔ83N-TK⁻-hFlt3L -anti-mCTLA-4 /C7L⁻-mOX40L
7 24 48 7 24 48 (hpi)
HC+LC
HC
LC
OX40L
hFlt3L
hFlt3L
hFlt3L

FIG. 26

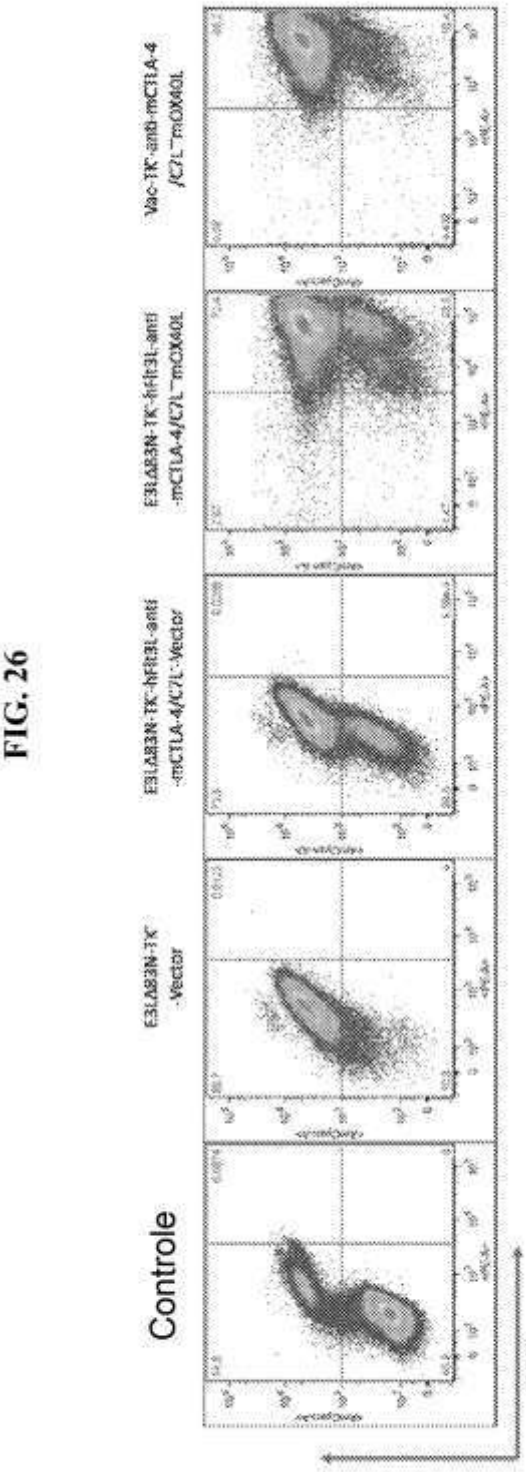

Controle
E3LΔB3N-TK-Vector
E3LΔB3N-TK-hFlt3L-anti-mCTLA-4/C7L-Vector
E3LΔB3N-TK-hFlt3L-anti-mCTLA-4/C7L-mOX40L
Vac-TK-anti-mCTLA-4/C7L-mOX40L
OX40L

FIG. 27

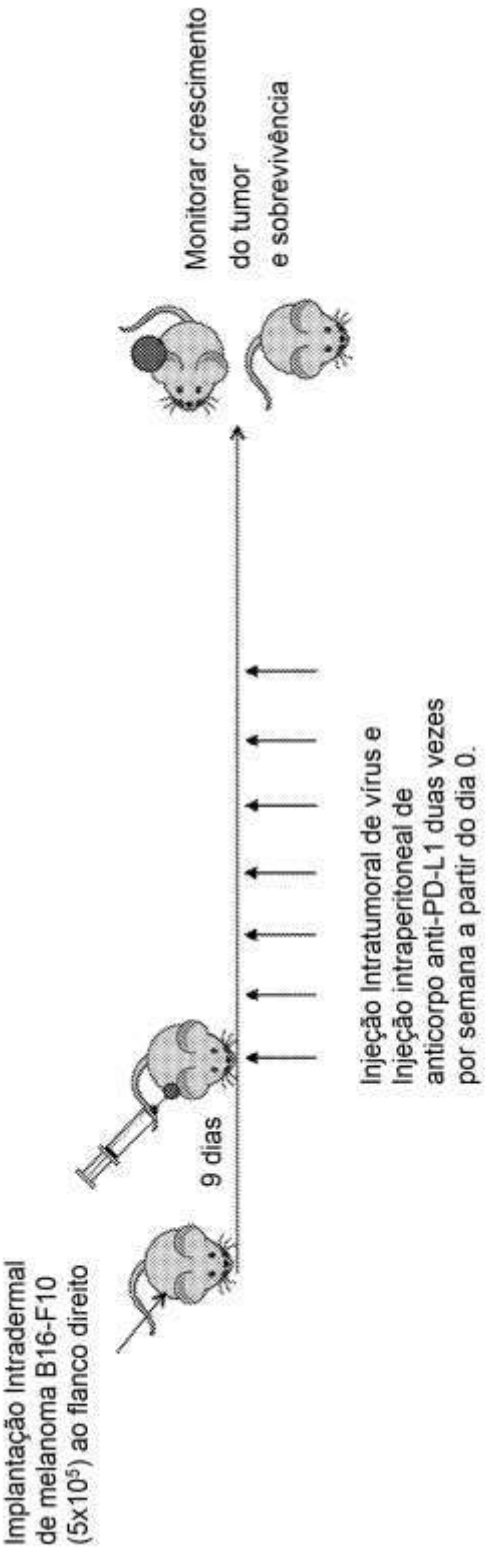

Implantação Intradermal
de melanoma B16-F10
(5x10^5) ao flanco direito
9 dias
Injeção Intratumoral de vírus e
Injeção intraperitoneal de
anticorpo anti-PD-L1 duas vezes
por semana a partir do dia 0.
Monitorar crescimento
do tumor
e sobrevivência

FIG. 28A

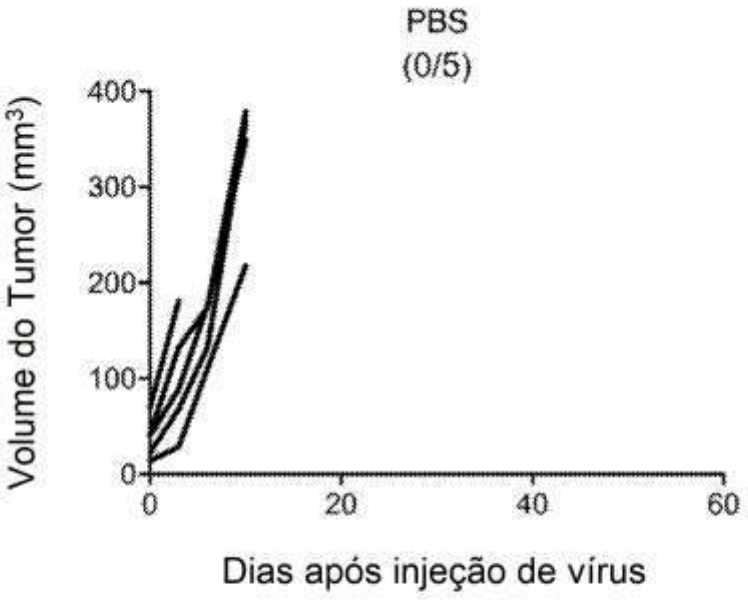


FIG. 28B

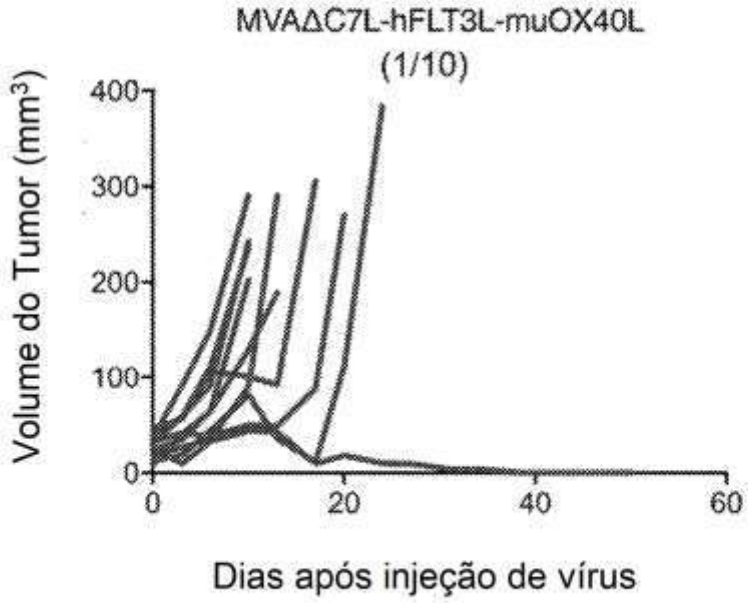


FIG. 28C

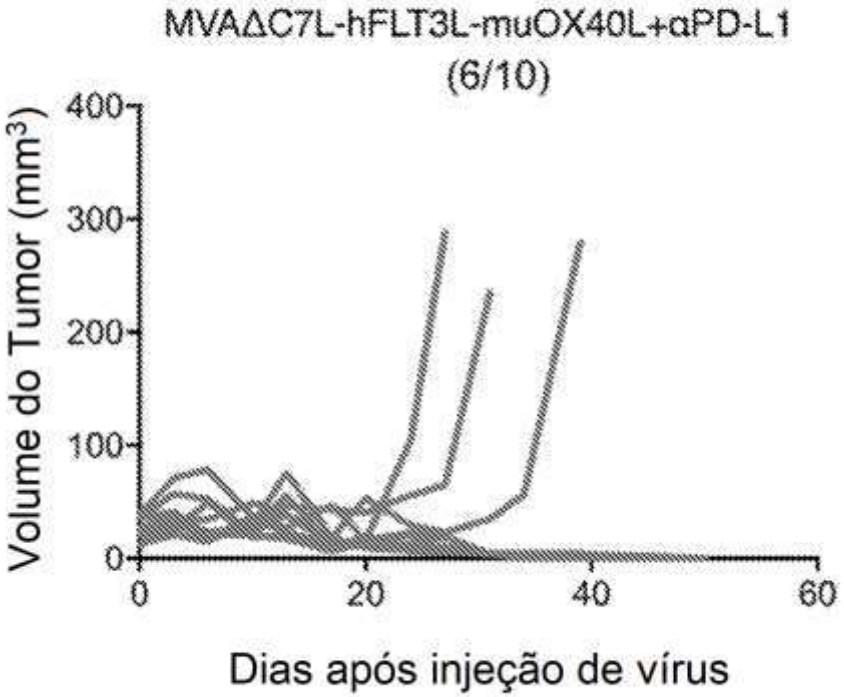

MVAΔC7L-hFLT3L-muOX40L+αPD-L1
(6/10)
Volume do Tumor (mm³)
400
300
200
100
0
0
20
40
60
Dias após injeção de vírus

FIG. 29A

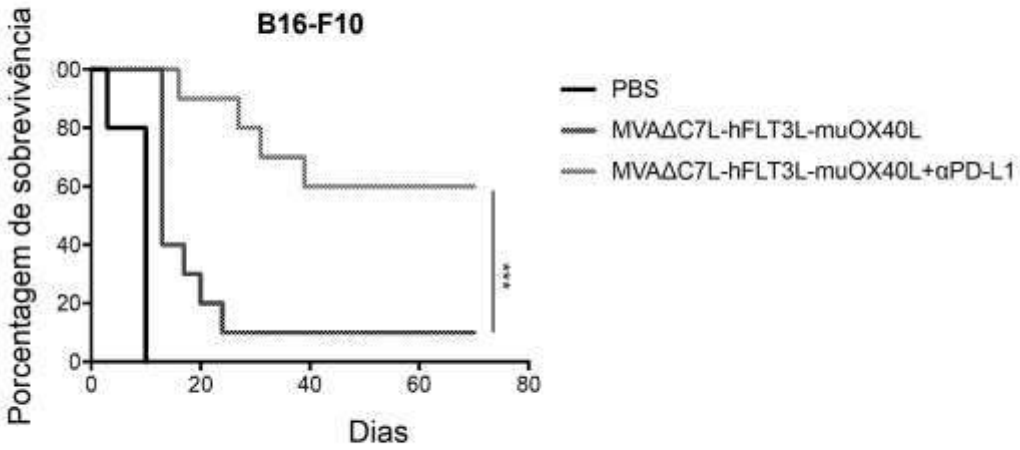


FIG 29B

PBS	MVAΔC7L-hFLT3L-muOX40L	MVAΔC7L-hFLT3L-muOX40L + αPD-L1
10	13	Indefinido

FIG. 30

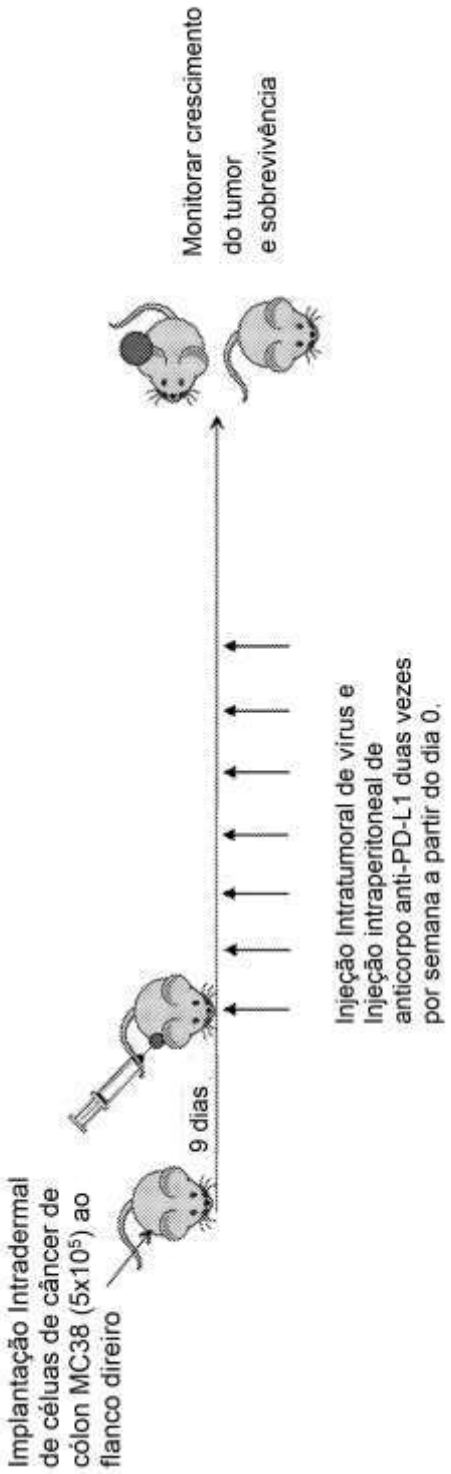

Implantação Intradermal de céluas de câncer de cólon MC38 ($5x10^5$) ao flanco direiro
9 dias
Injeção Intratumoral de vírus e Injeção intraperitoneal de anticorpo anti-PD-L1 duas vezes por semana a partir do dia 0.
Monitorar crescimento do tumor e sobrevivência

FIG. 31A

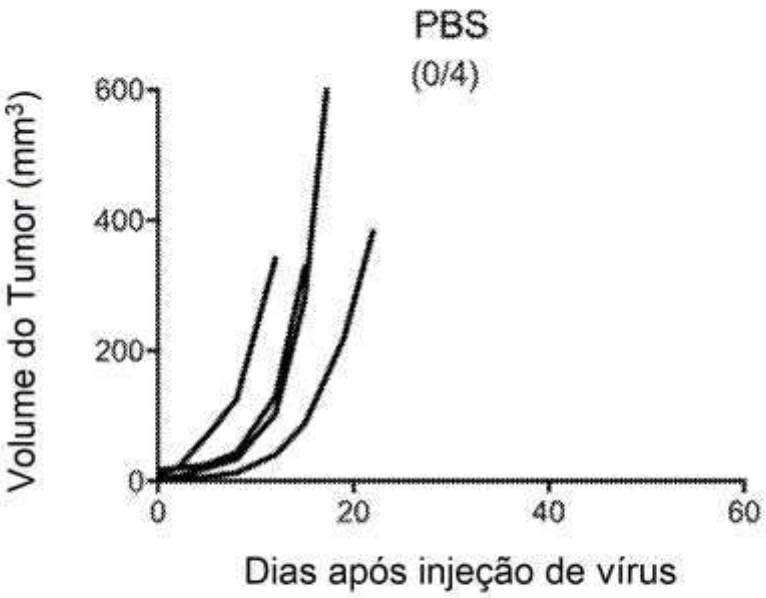


FIG 31B

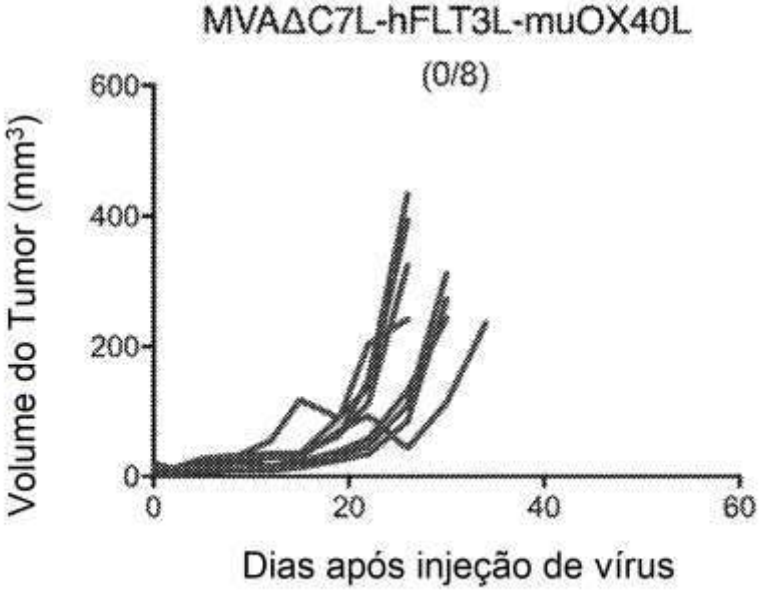


FIG. 31C

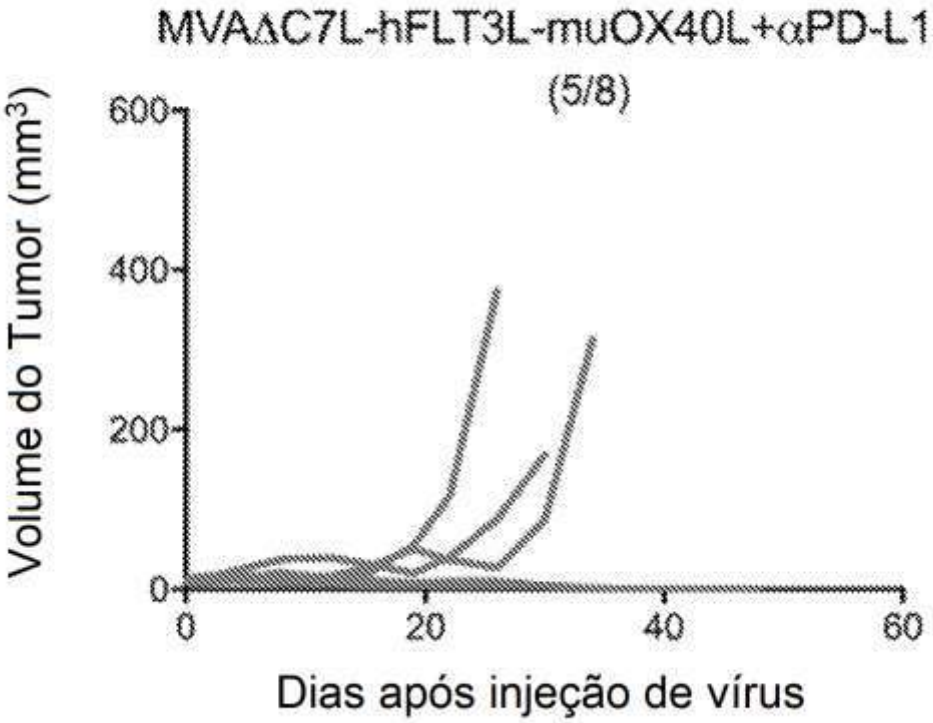

MVAΔC7L-hFLT3L-muOX40L+αPD-L1
(5/8)
Volume do Tumor (mm³)
600
400
200
0
0
20
40
60
Dias após injeção de vírus

FIG. 32A

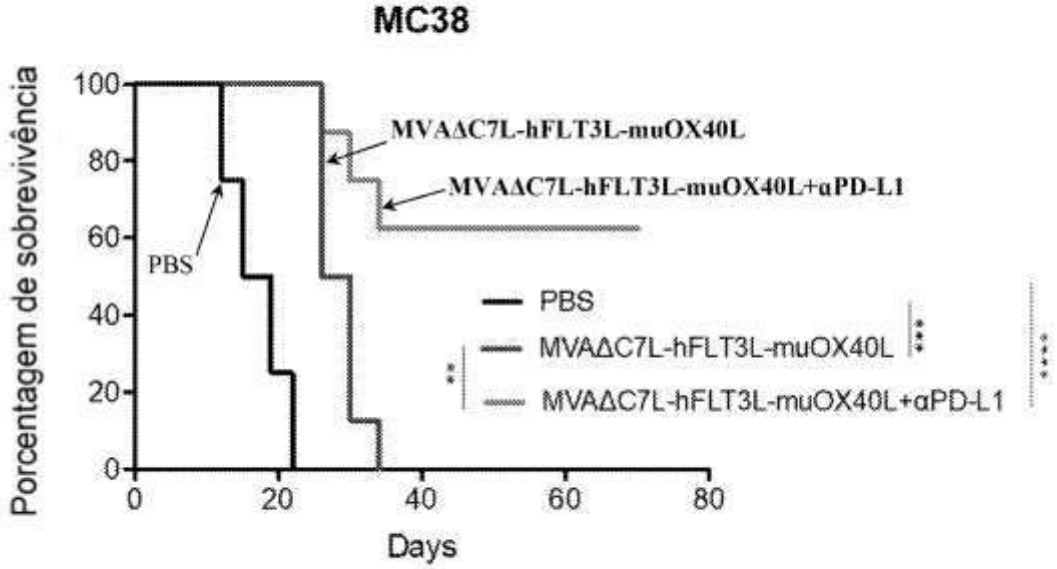


FIG. 32B

PBS	MVAΔC7L-hFLT3L-muOX40L	MVAΔC7L-hFLT3L-muOX40L + αPD-L1
17	28	Indefinido

FIG. 33

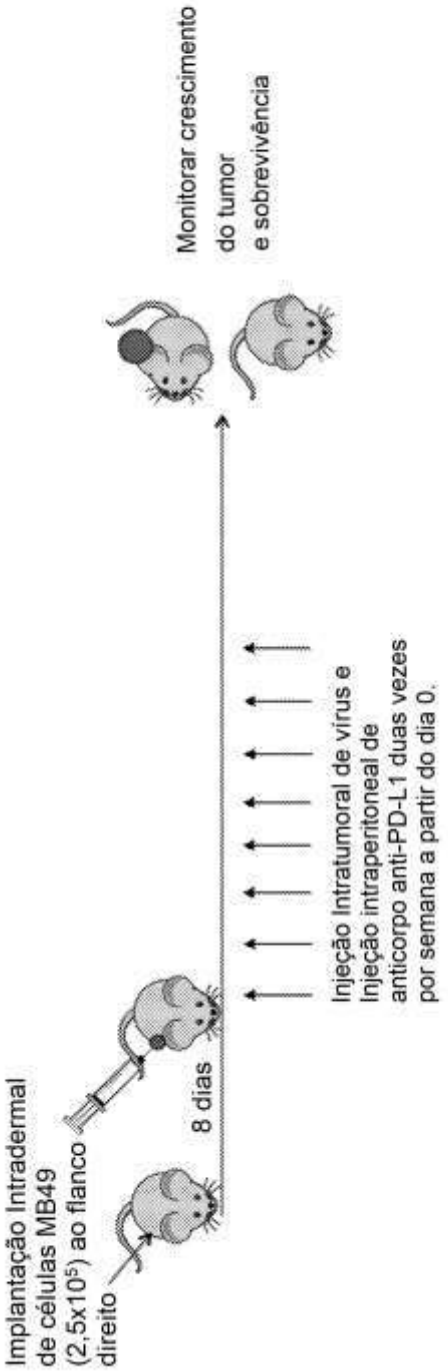

Implantação Intradermal
de células MB49
(2,5x10⁵) ao flanco
direito
8 dias
Injeção Intratumoral de vírus e
Injeção intraperitoneal de
anticorpo anti-PD-L1 duas vezes
por semana a partir do dia 0.
Monitorar crescimento
do tumor
e sobrevivência

FIG. 34A

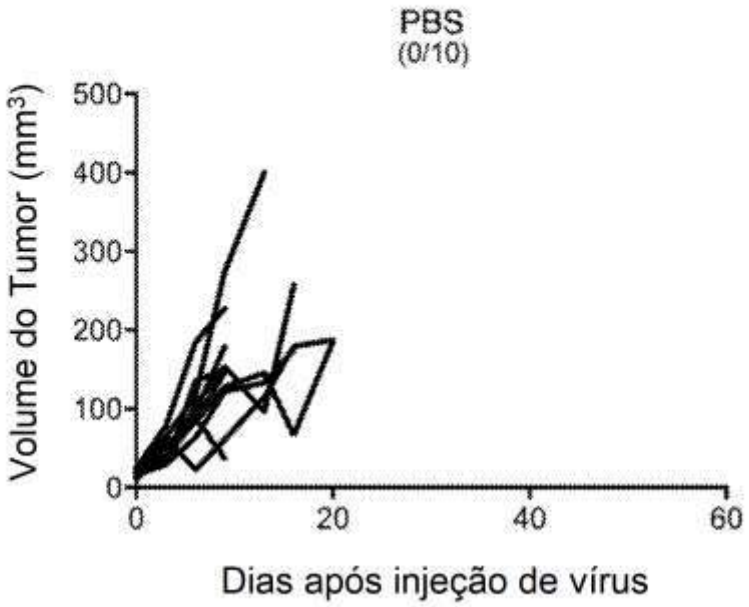


FIG. 34B

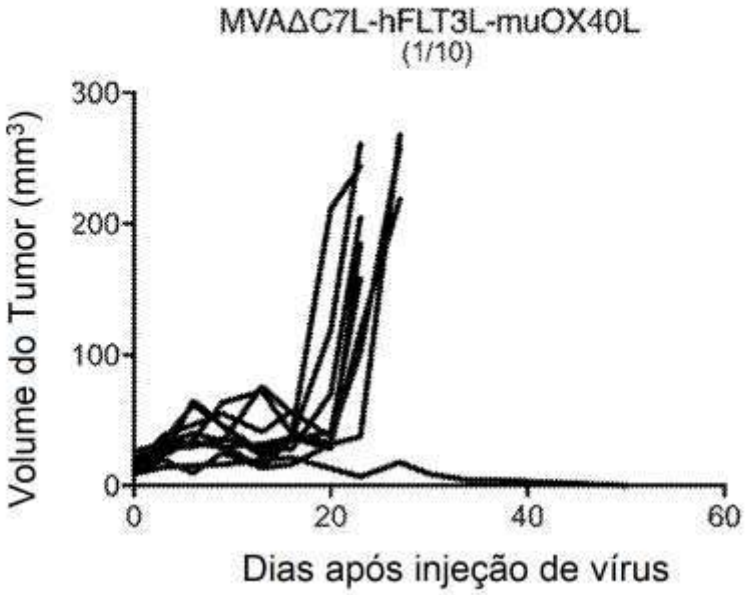


FIG. 34C

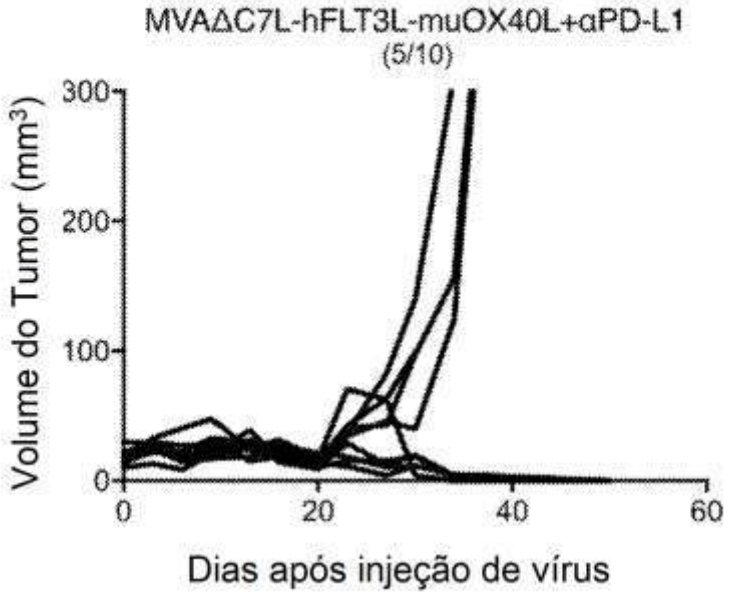


FIG. 34D

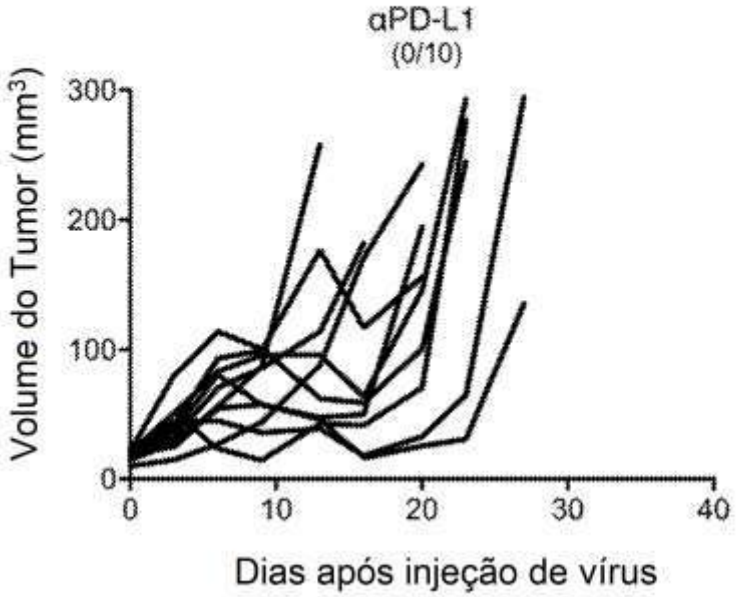


FIG. 35A

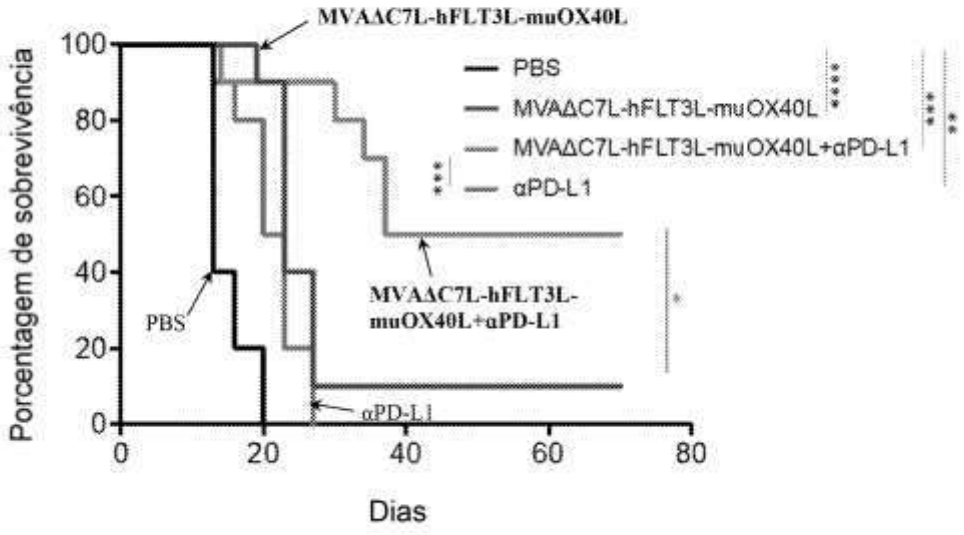


FIG. 35B

PBS	MVAΔC7L-hFLT3L-muOX40L	MVAΔC7L-hFLT3L-muOX40L + αPD-L1	αPD-L1
13	23	43.5	21,5

FIG. 36

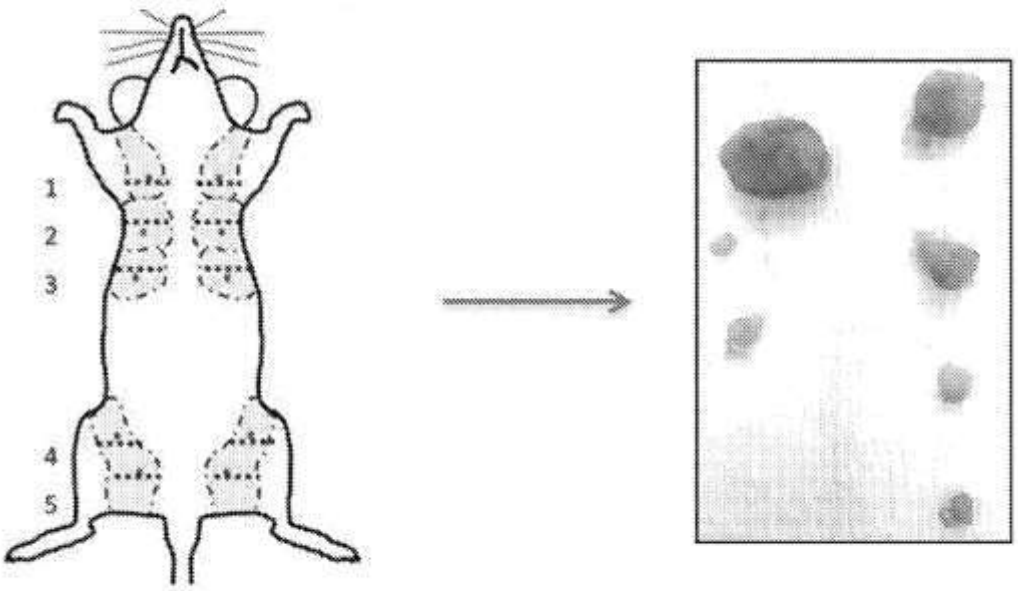
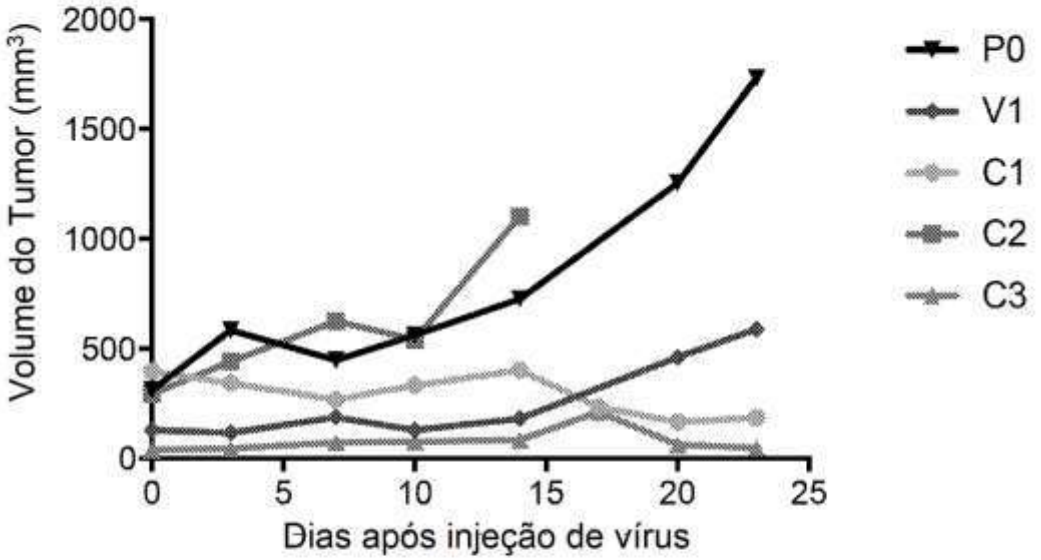


FIG. 37



P0: PBS

V1: MVAΔC7L-hFlt3L-muOX40L

C1, C2, C3: MVAΔC7L-hFlt3L-muOX40L + anti-PD-L1

FIG. 38

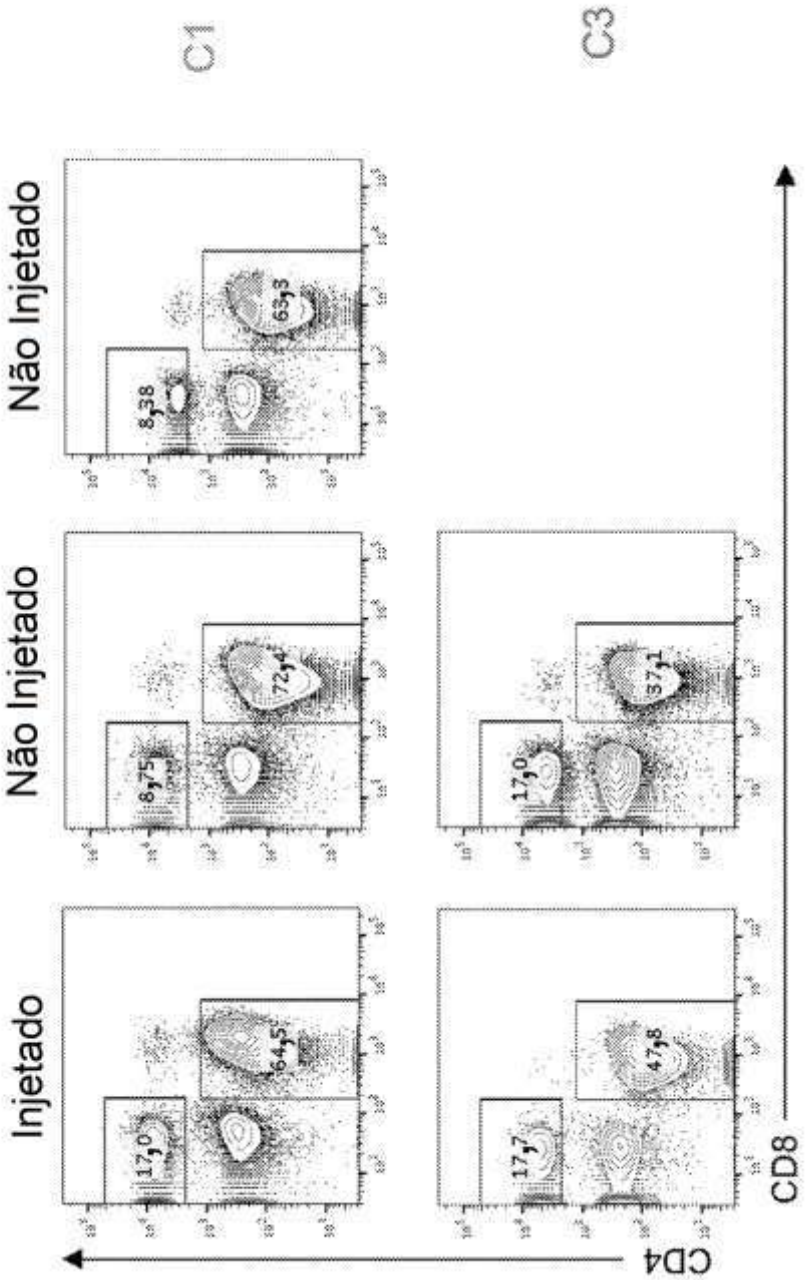

C1
C3
Não Injetado
Não Injetado
Injetado
8,38
63,3
8,75
72,4
17,0
64,5
17,0
37,1
17,7
47,8
CD4
CD8

FIG. 39

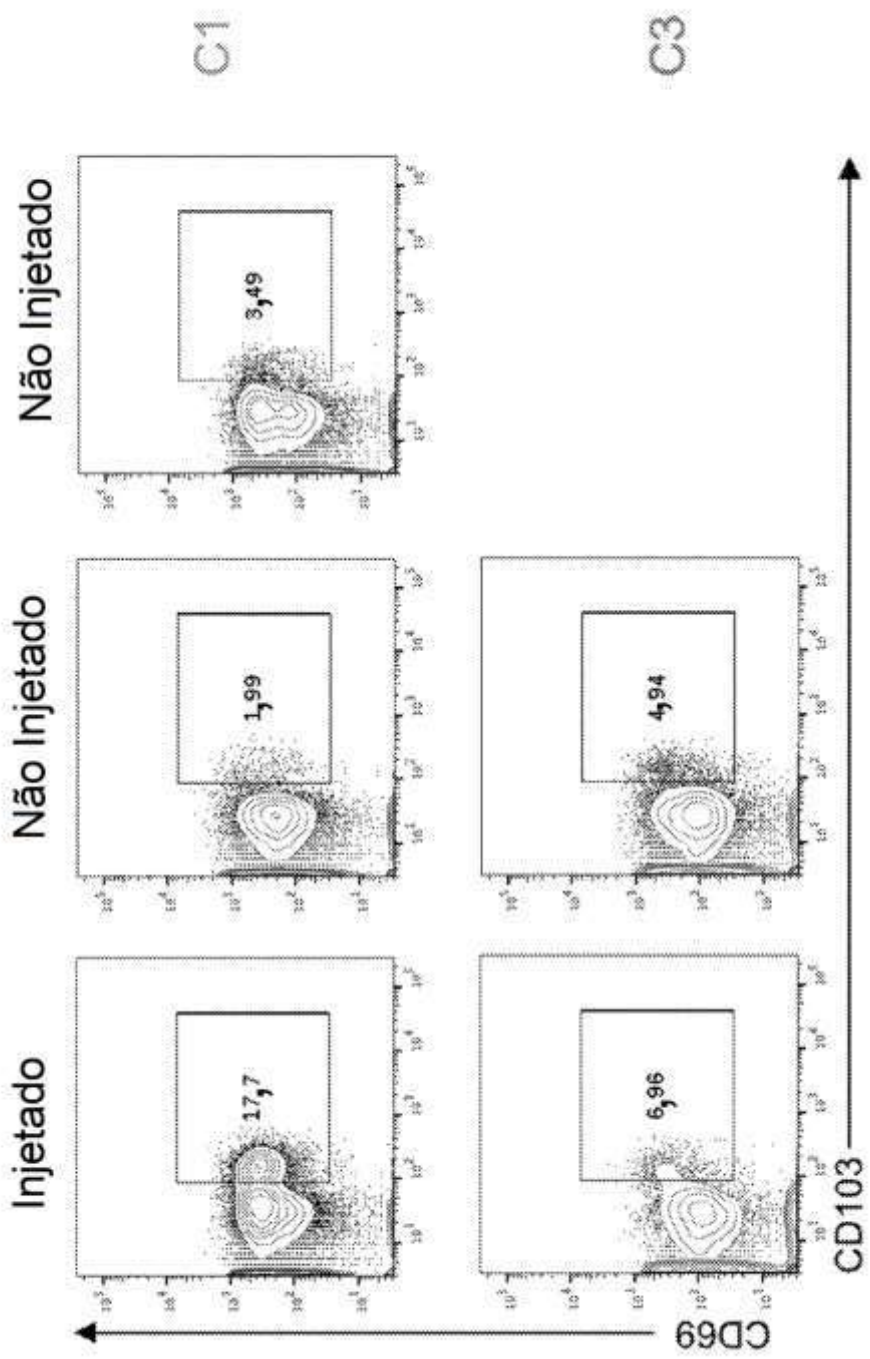
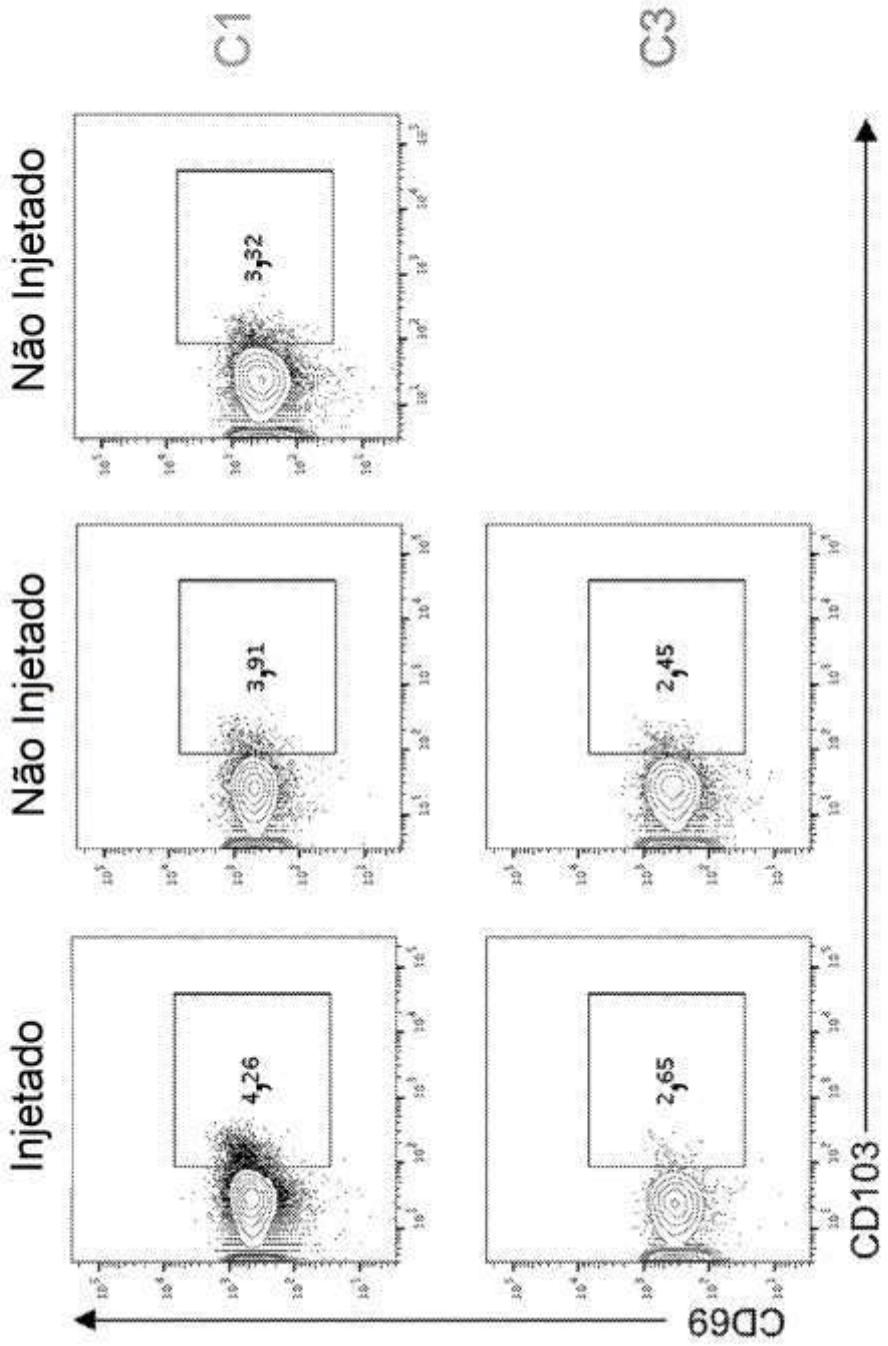
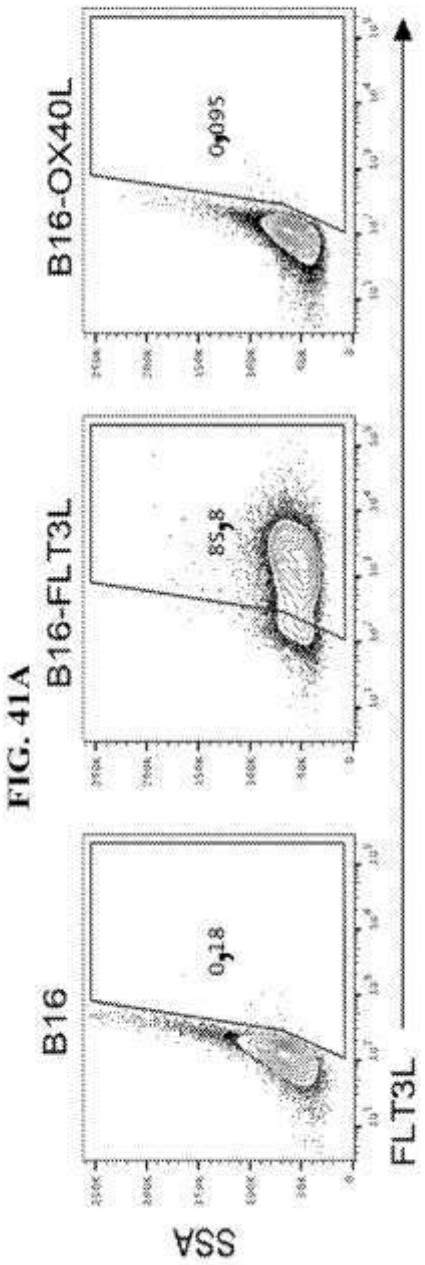

C1
C3
Não Injetado
Não Injetado
Injetado
3,49
1,99
4,94
17,7
6,96
CD69
CD103

FIG. 40


C1
C3
Não Injetado
Não Injetado
Injetado
3,32
3,91
2,45
4,26
2,65
CD69
CD103


FIG. 41A
B16
B16-FLT3L
B16-OX40L
0,18
85,8
0,095
SSA
FLT3L

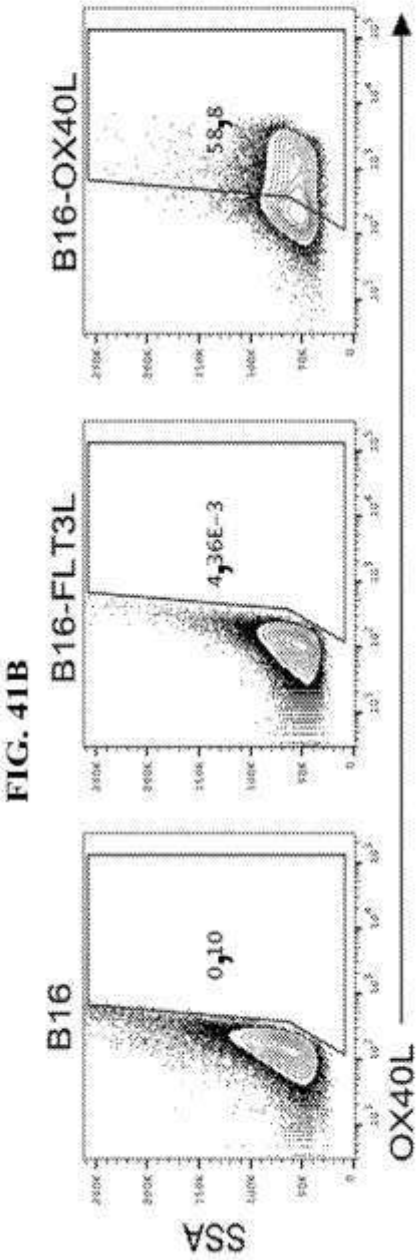

FIG. 41B
B16
B16-FLT3L
B16-OX40L
0,10
4,36E-3
58,8
SSA
OX40L

FIG. 42

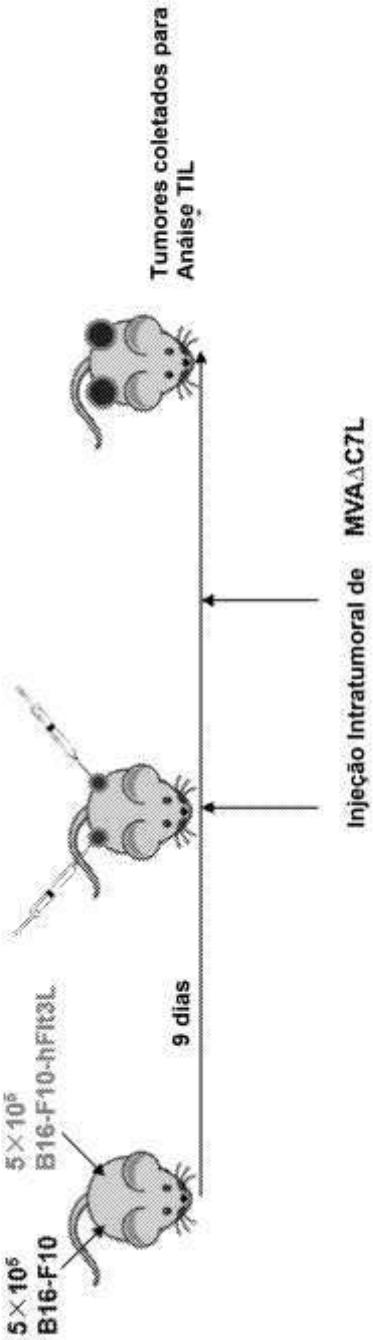

Tumores coletados para Análise TIL
Injeção Intratumoral de MVAΔC7L
9 dias
5×10^5 B16-F10
5×10^5 B16-F10-hFlt3L

FIG. 43A

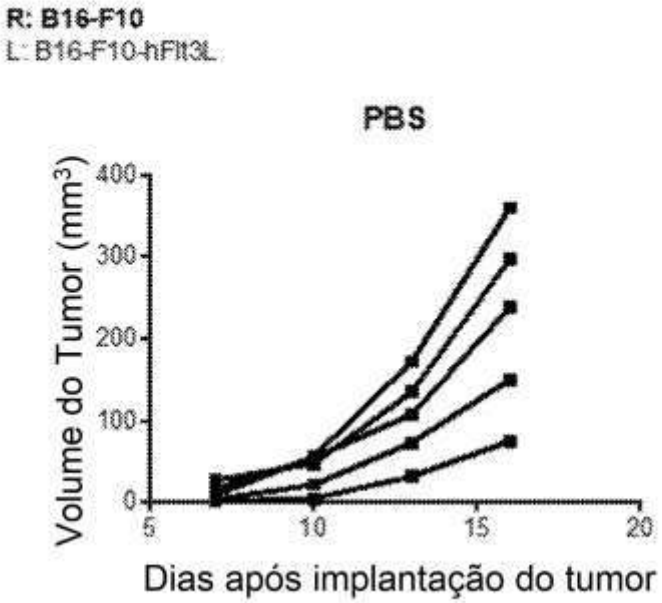


FIG.43B

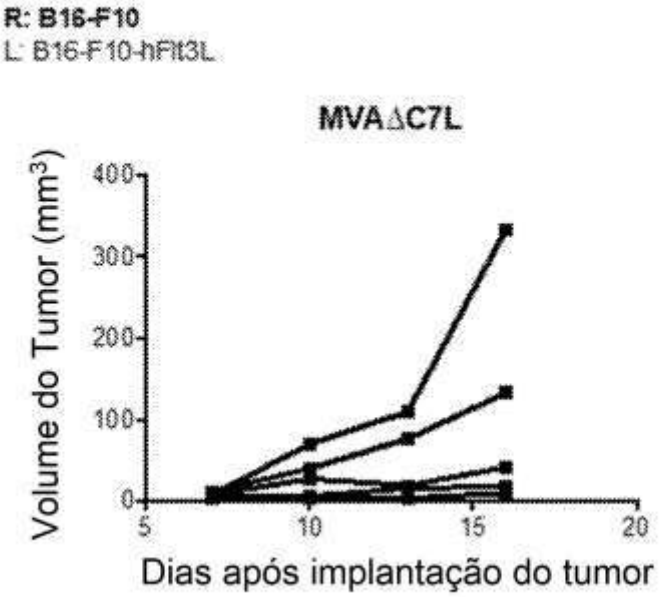


FIG. 43C

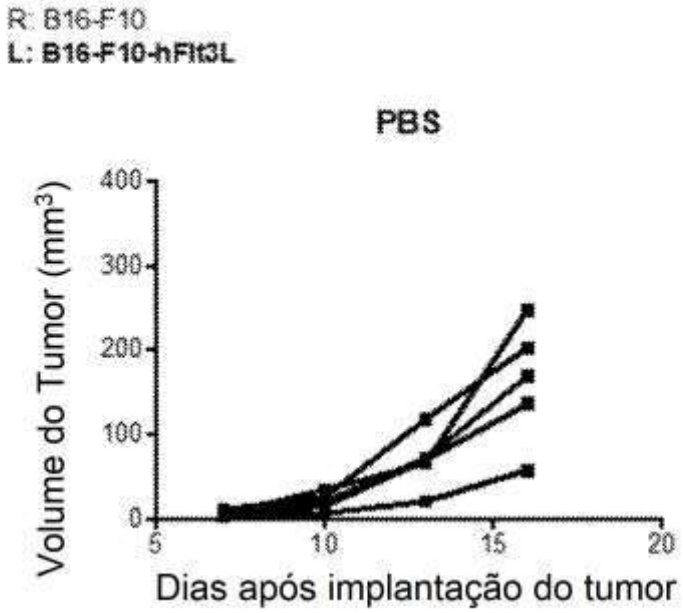


FIG. 43D

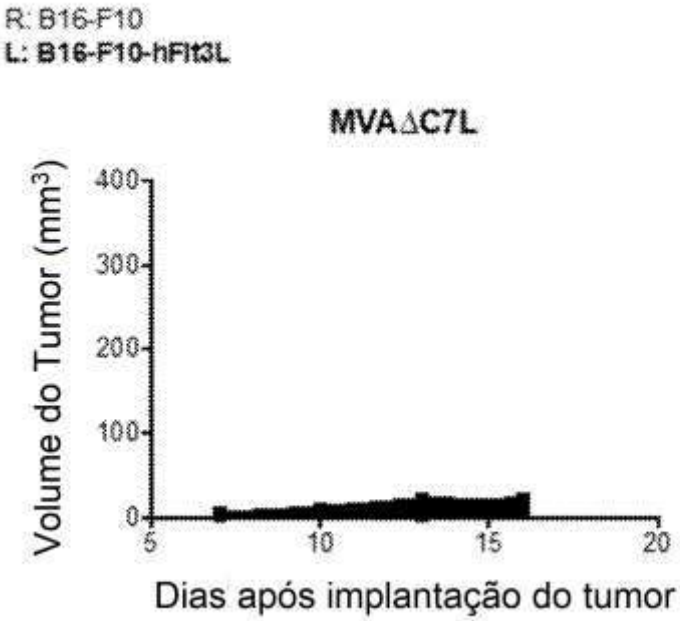


FIG. 44A

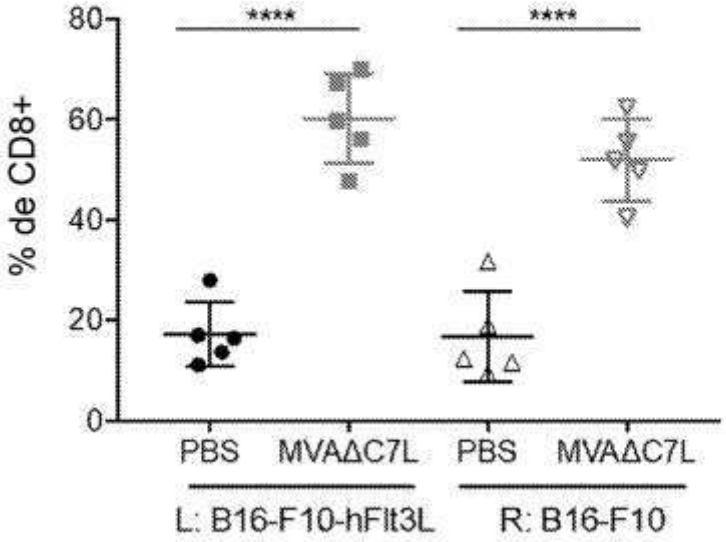


FIG. 44B

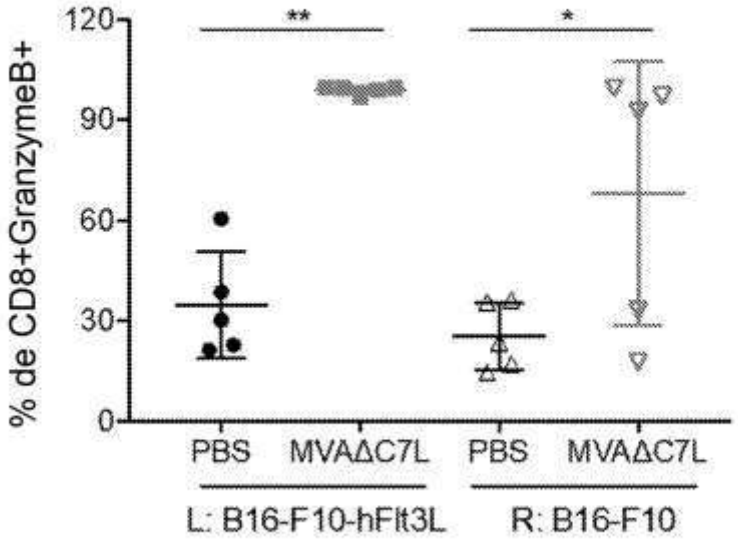


FIG. 44C

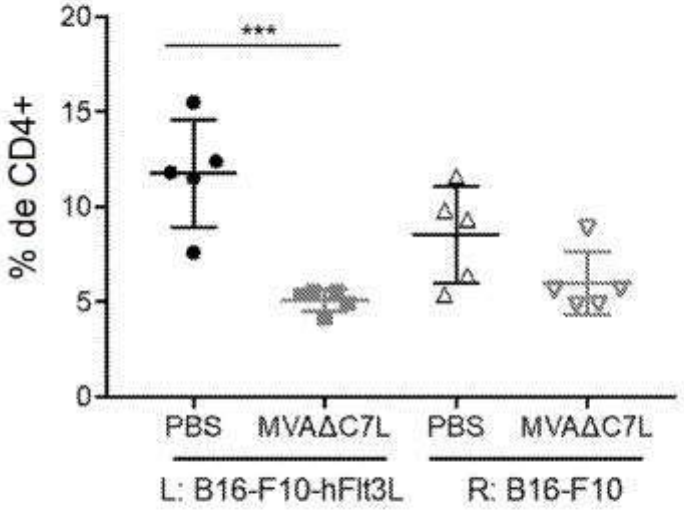


FIG. 44D

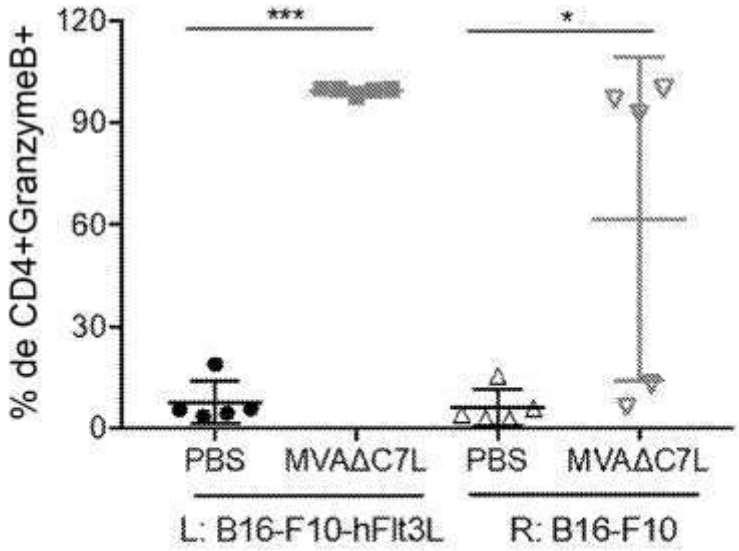


FIG. 44E

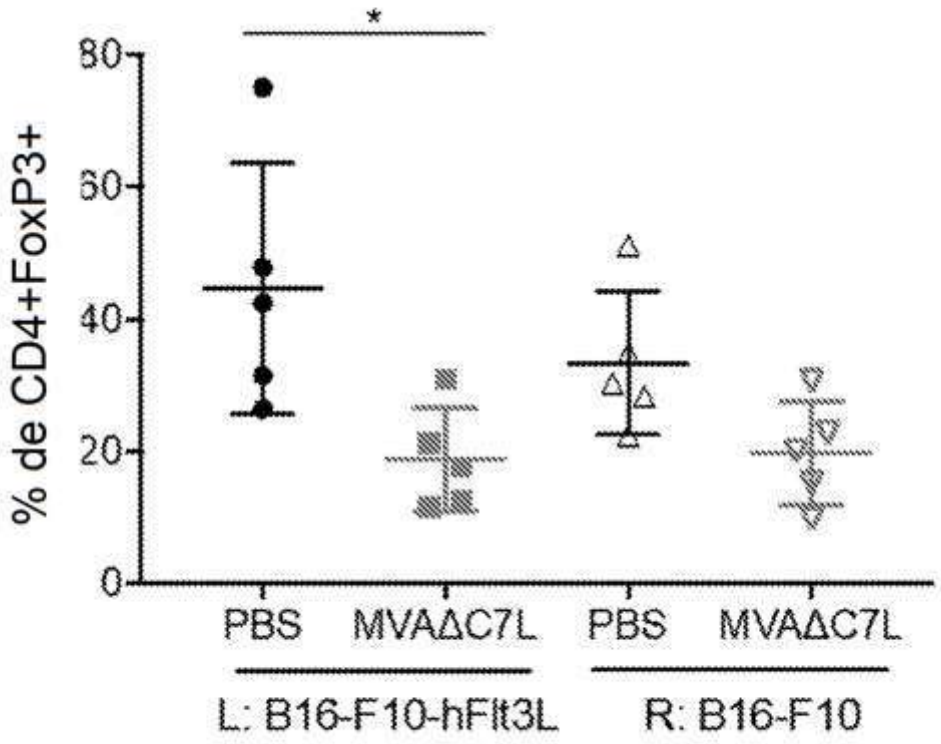

*
80
60
40
20
0
% de CD4+FoxP3+
PBS
MVAΔC7L
PBS
MVAΔC7L
L: B16-F10-hFlt3L
R: B16-F10

FIG. 45A

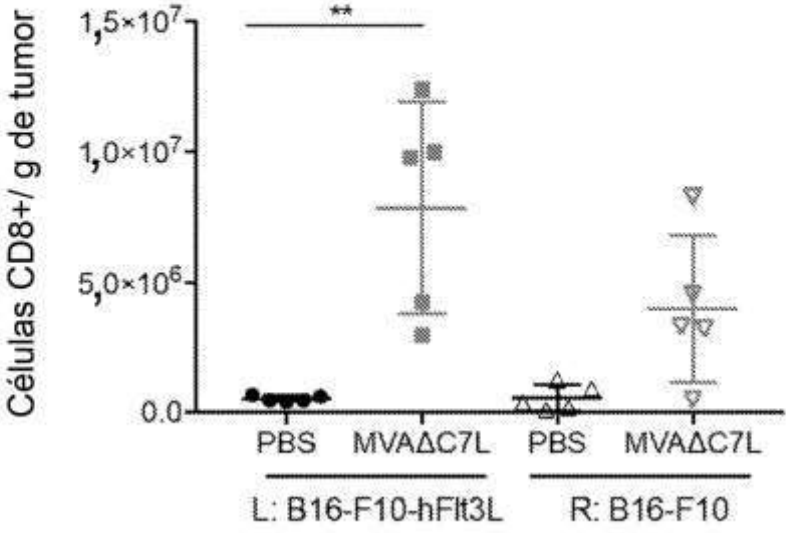


FIG. 45B

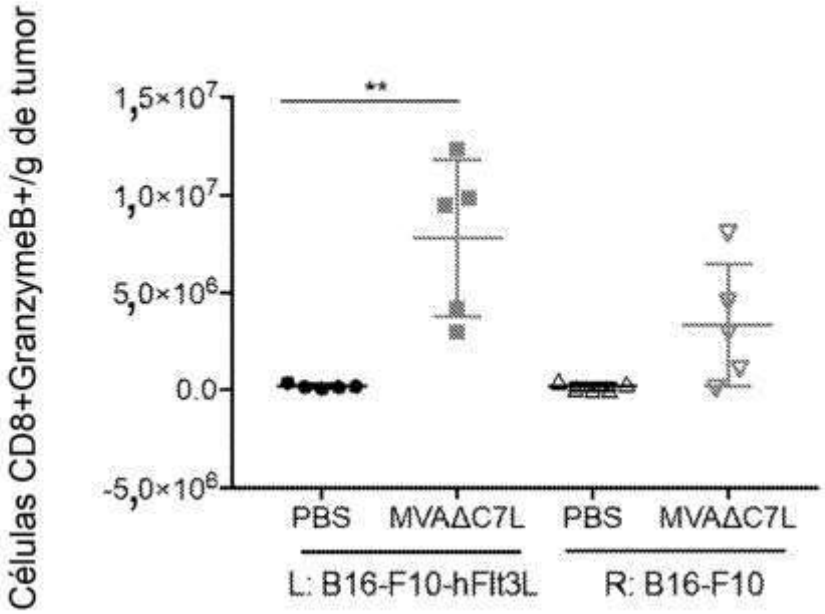


FIG. 45C

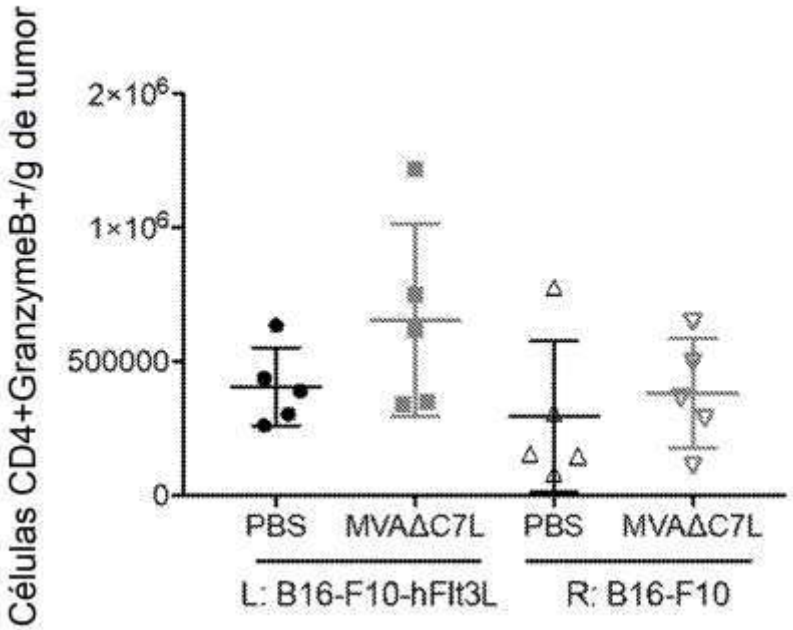


FIG. 45D

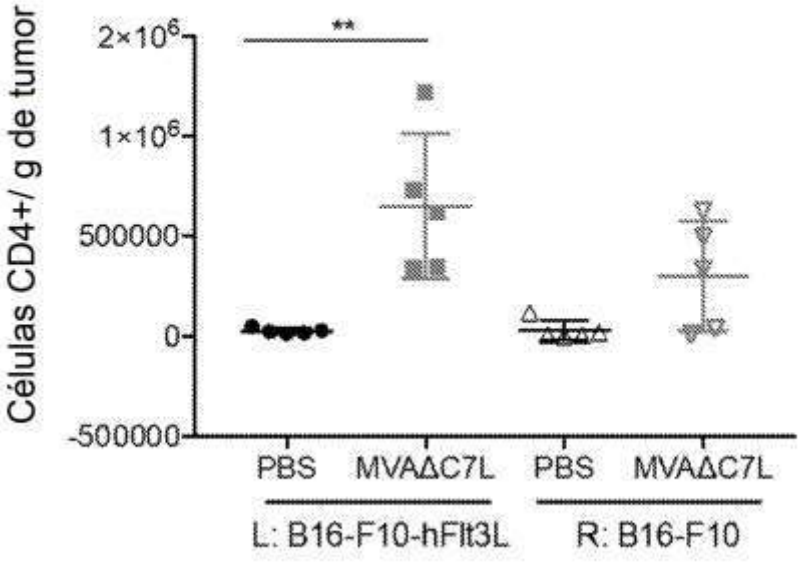


FIG. 45E

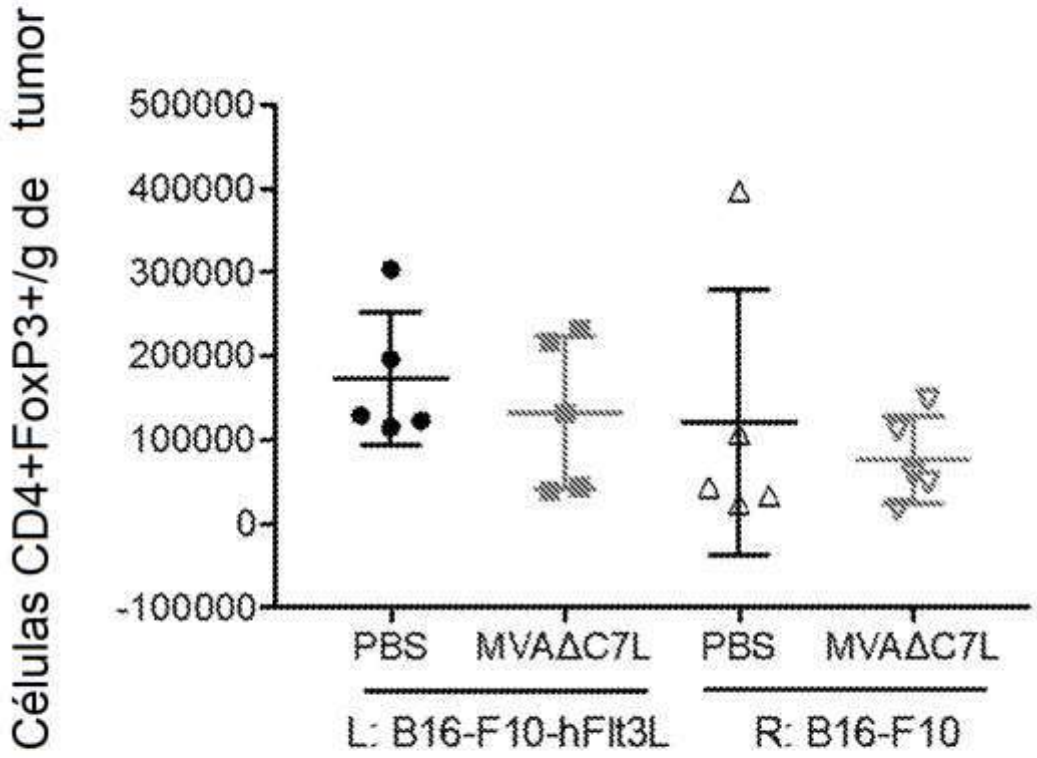

Células CD4+FoxP3+/g de tumor
500000
400000
300000
200000
100000
0
-100000
PBS
MVAΔC7L
PBS
MVAΔC7L
L: B16-F10-hFlt3L
R: B16-F10

FIG. 46

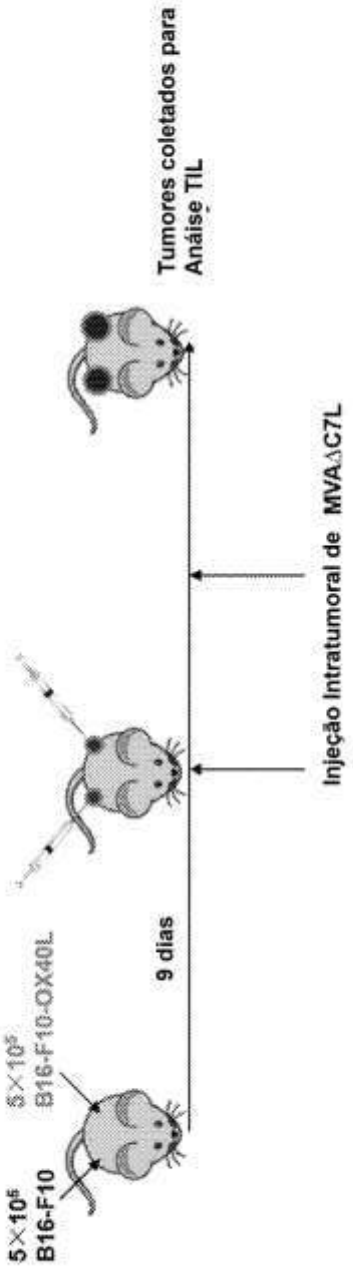

Tumores coletados para Análise TIL
Injeção Intratumoral de MVAΔC7L
9 dias
5×10⁵ B16-F10
5×10⁵ B16-F10-OX40L

FIG. 47A

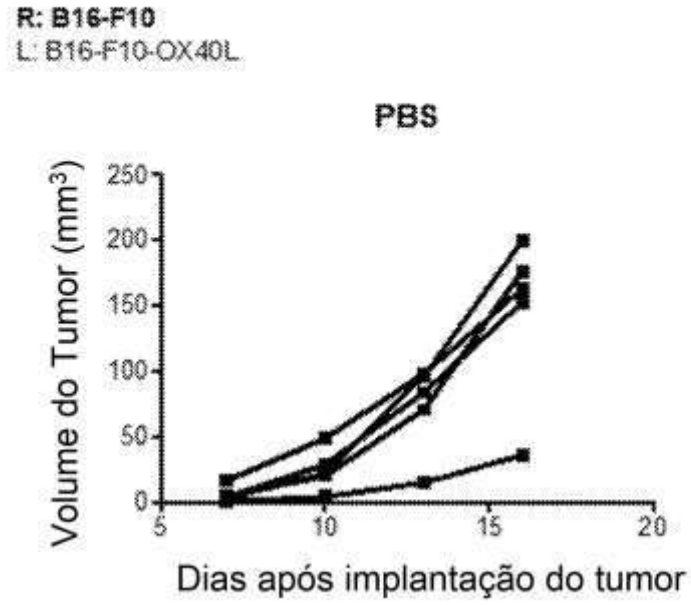


FIG 47B

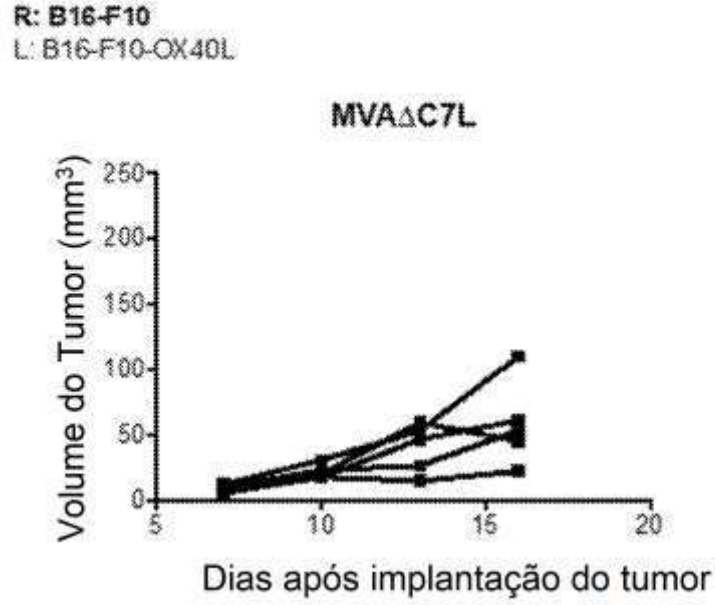


FIG. 47C

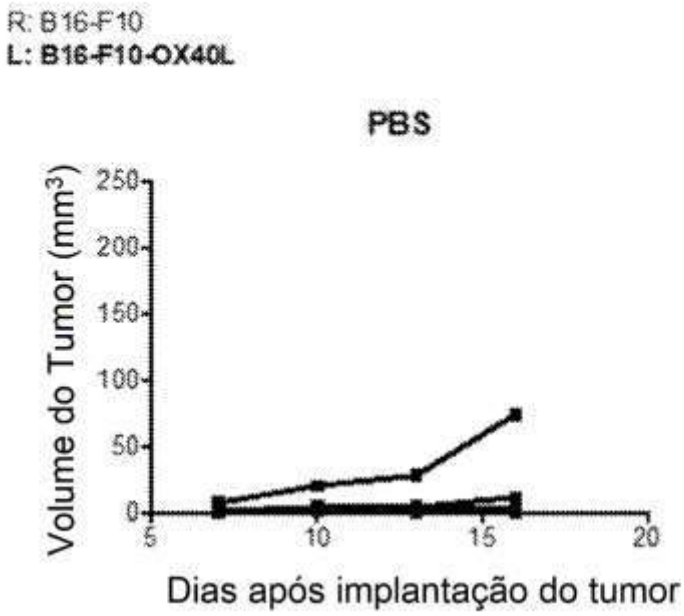


FIG. 47D

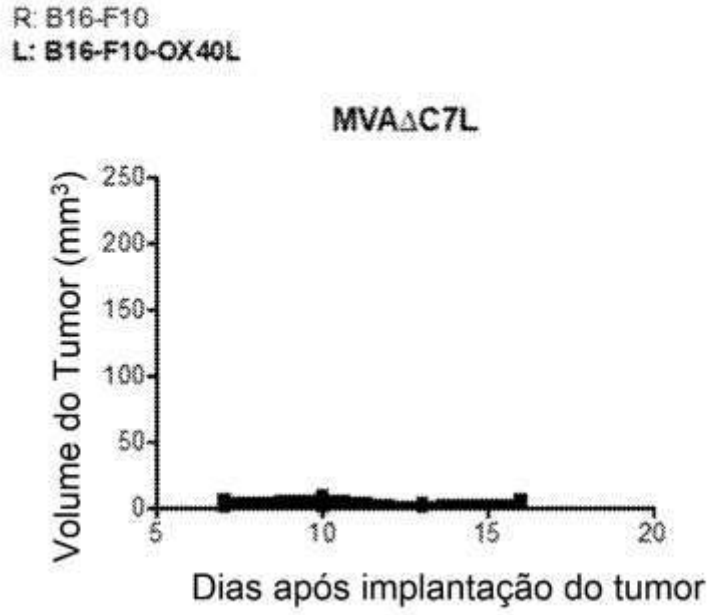


FIG. 48A

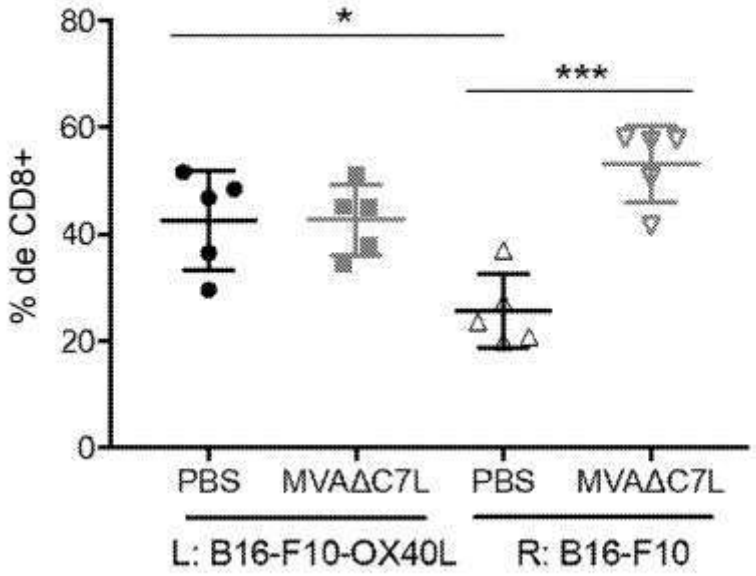


FIG 48B

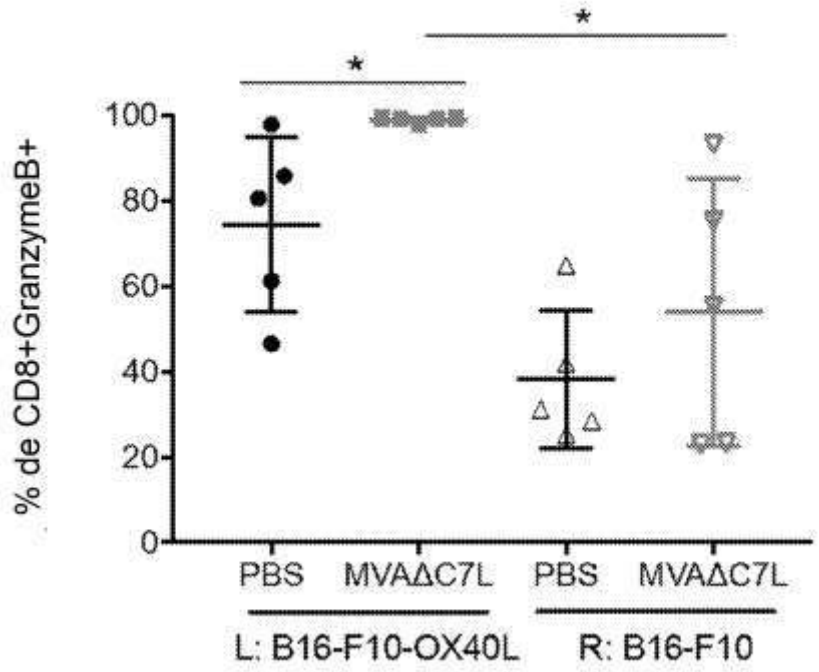


FIG. 48C

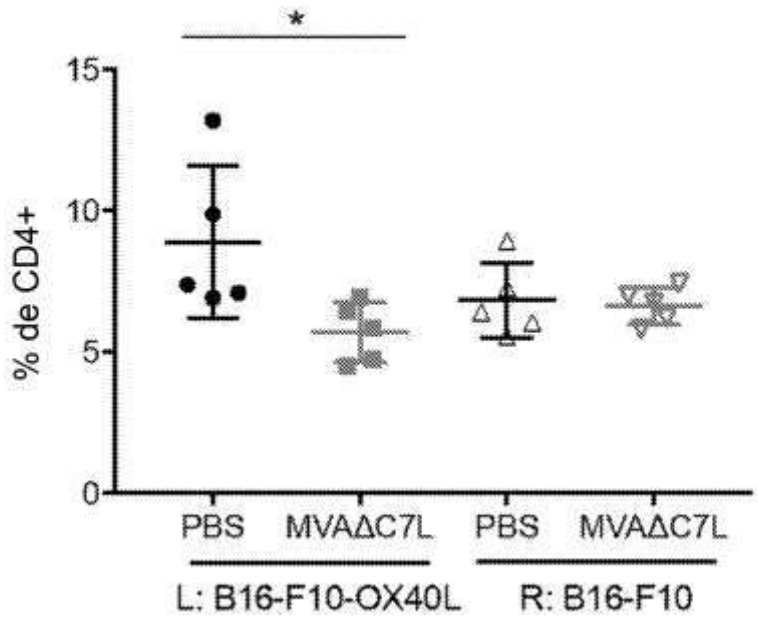


FIG. 48D

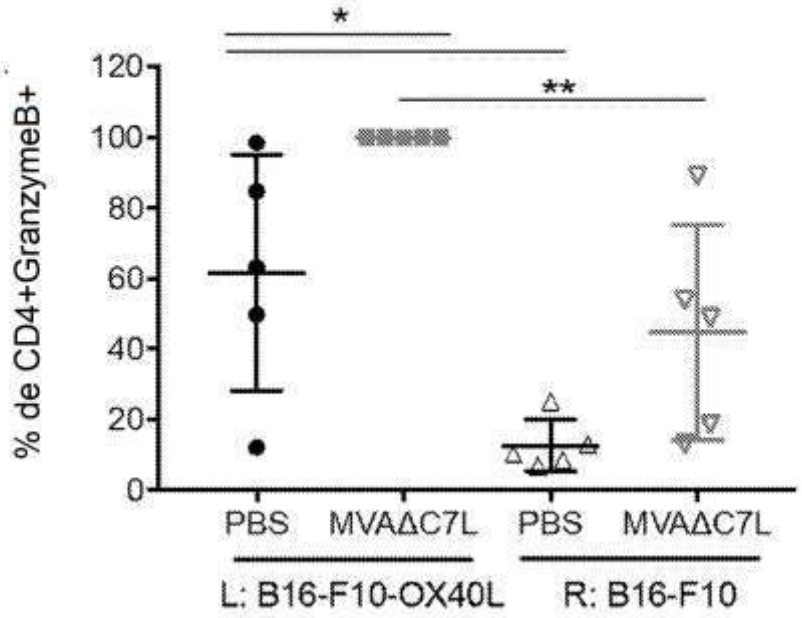


FIG. 48E

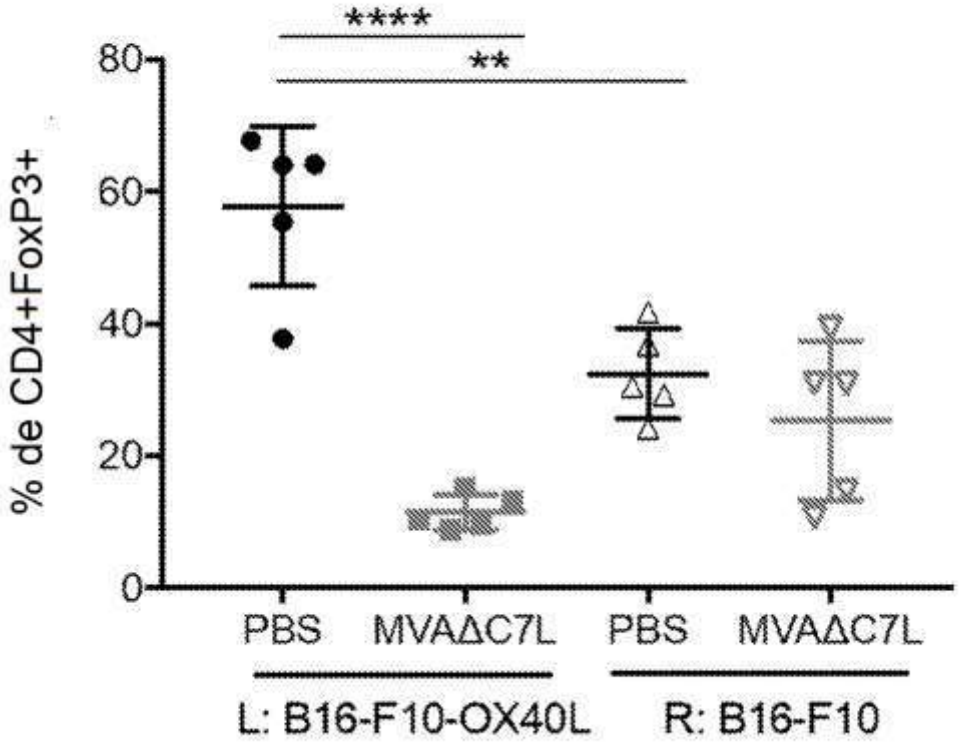

****
**
80
60
40
20
0
% de CD4+FoxP3+
PBS
MVAΔC7L
PBS
MVAΔC7L
L: B16-F10-OX40L
R: B16-F10

FIG. 49A

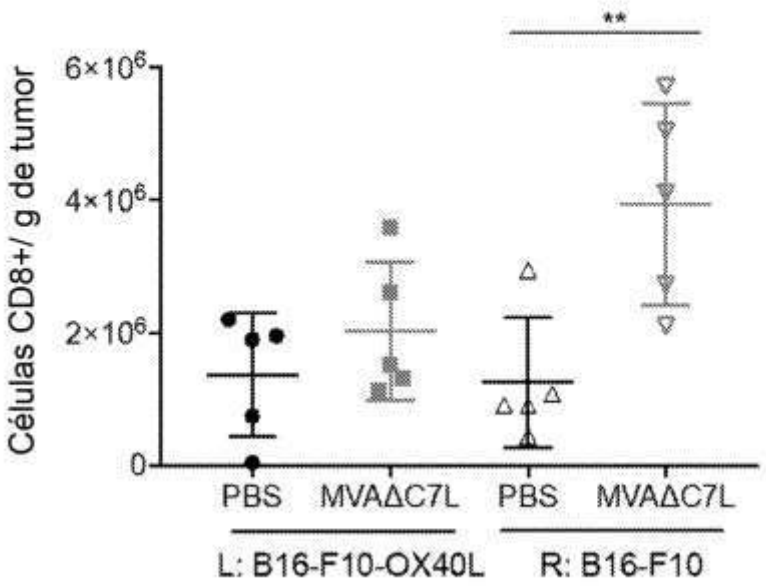


FIG. 49B

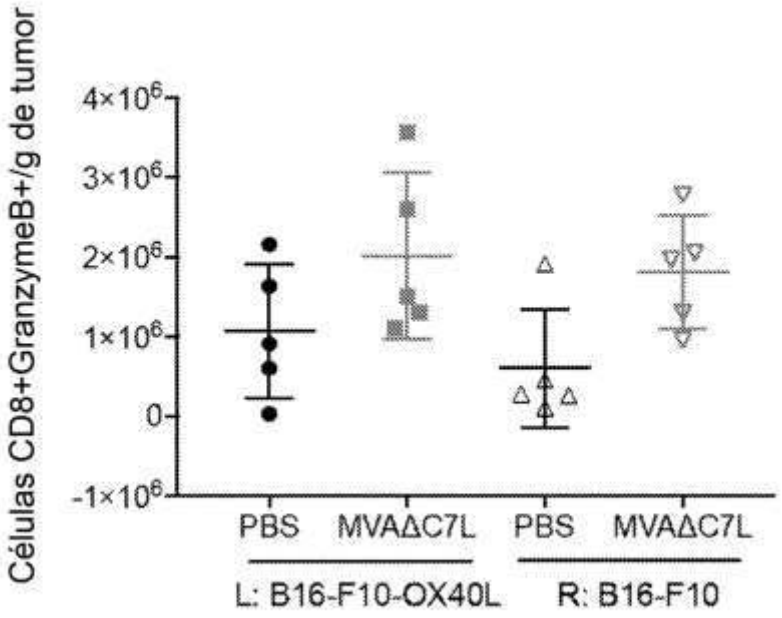


FIG. 49C

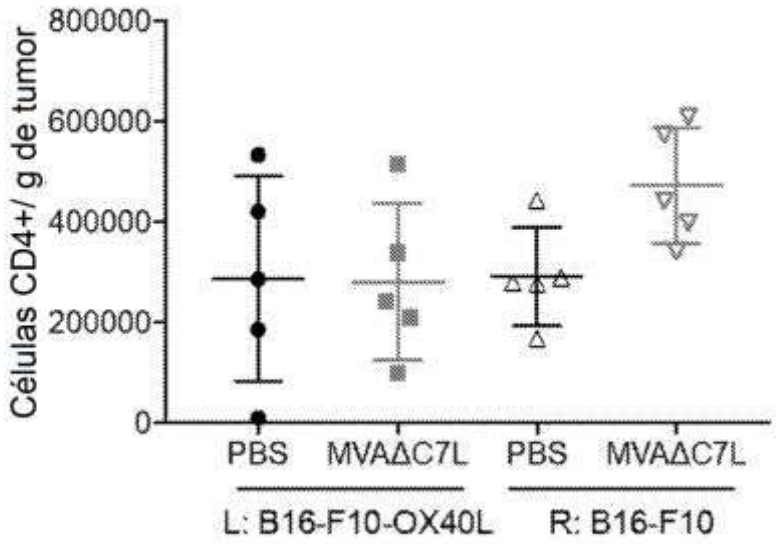


FIG. 49D

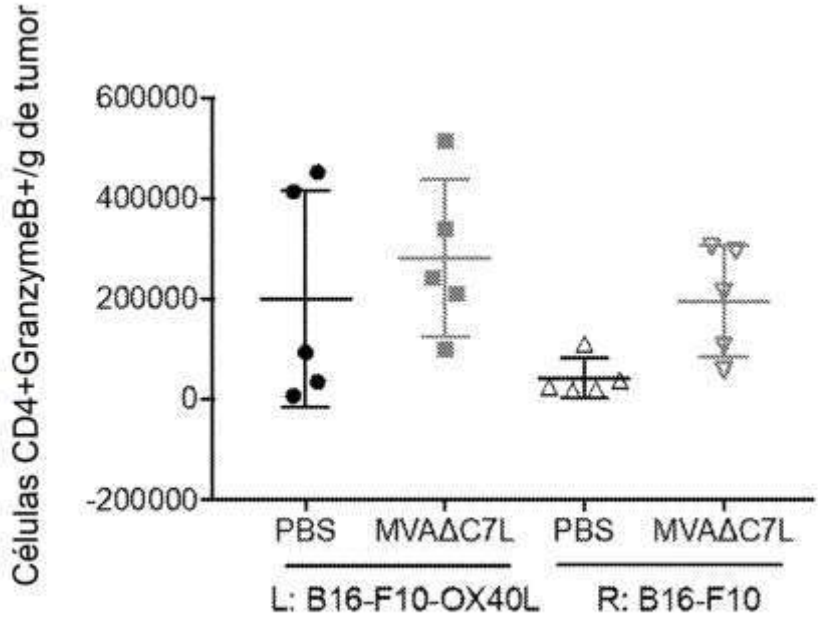


FIG. 49E

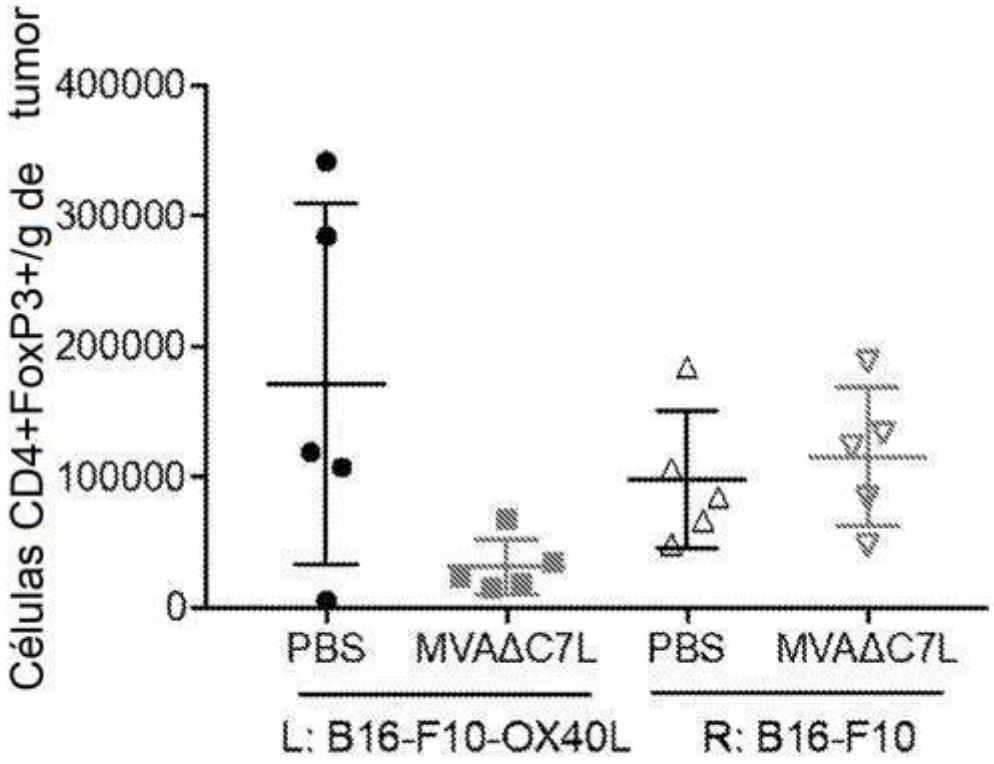

Células CD4+FoxP3+/g de tumor
400000
300000
200000
100000
0
PBS
MVAΔC7L
PBS
MVAΔC7L
L: B16-F10-OX40L
R: B16-F10

FIG. 50A

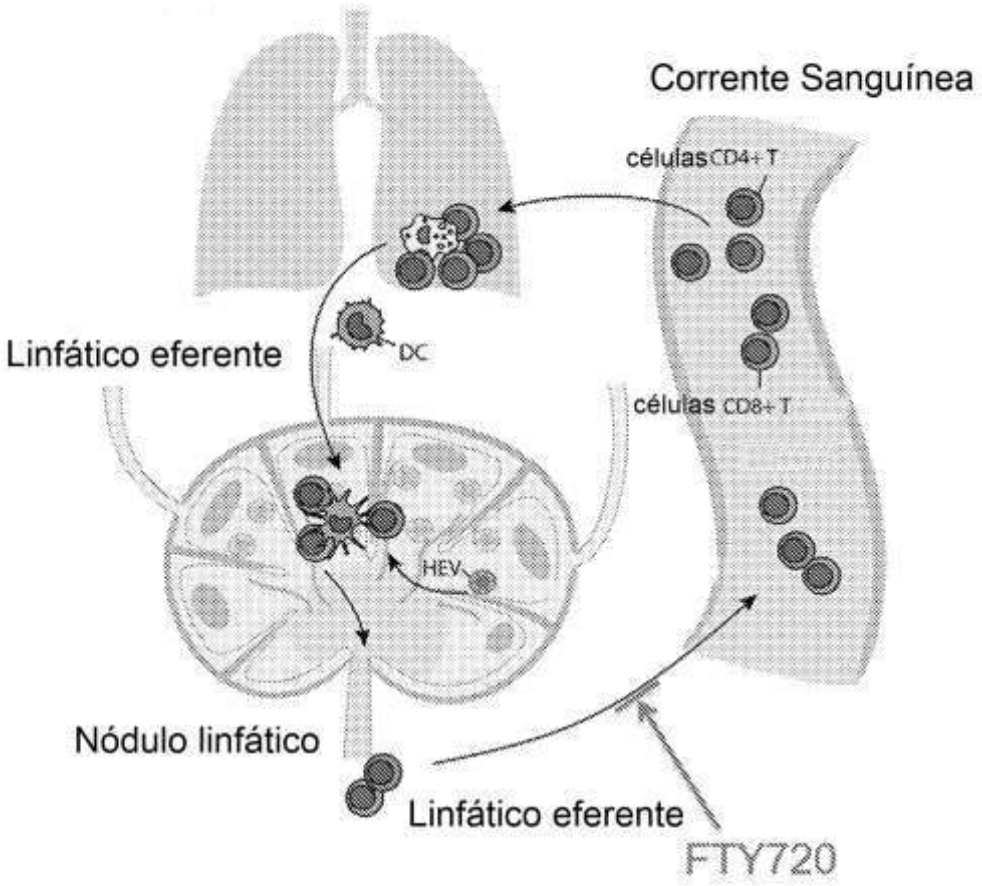


FIG. 50B

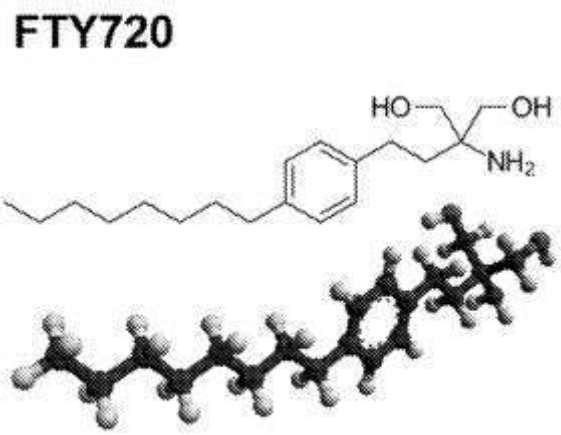


FIG. 51

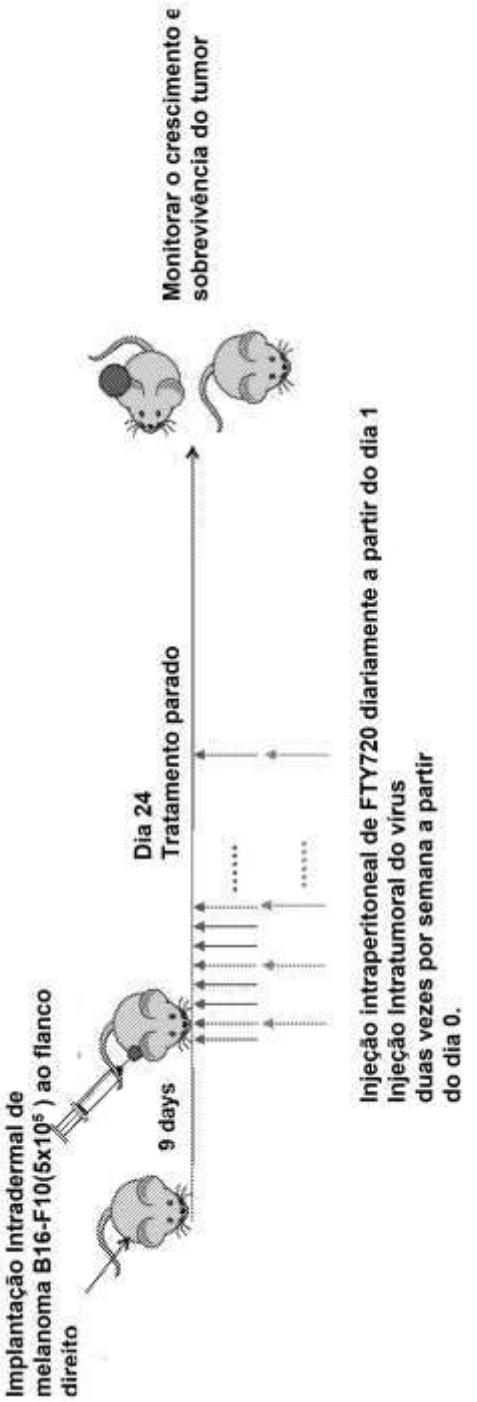

Implantação Intradermal de melanoma B16-F10(5x10^5) ao flanco direito
9 days
Dia 24
Tratamento parado
Monitorar o crescimento e sobrevivência do tumor
Injeção intraperitoneal de FTY720 diariamente a partir do dia 1
Injeção intratumoral do vírus
duas vezes por semana a partir
do dia 0.

FIG. 52A

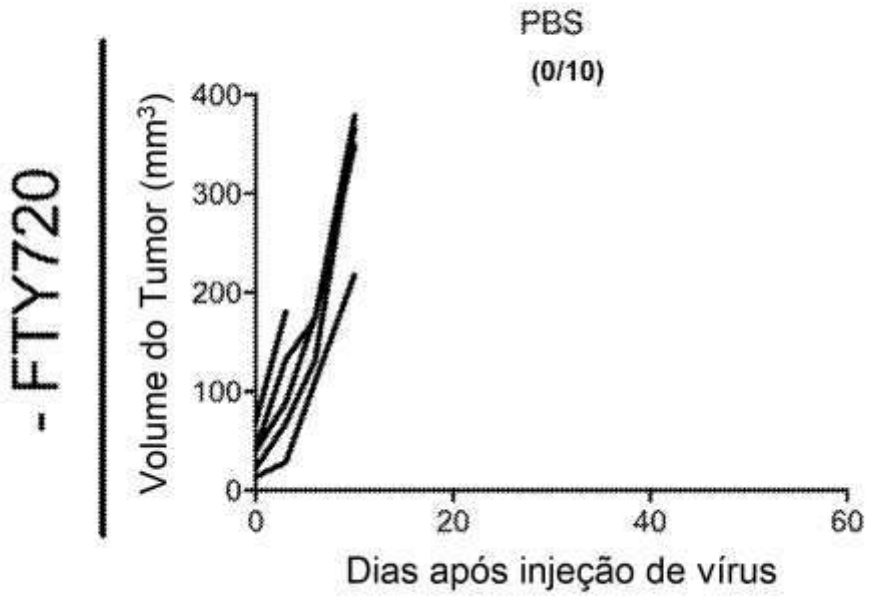


FIG. 52B

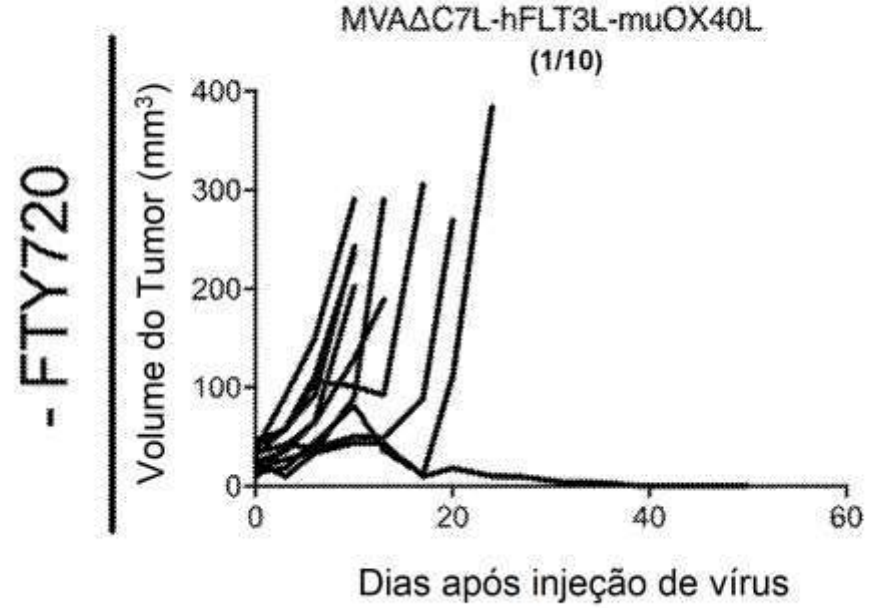


FIG. 52C

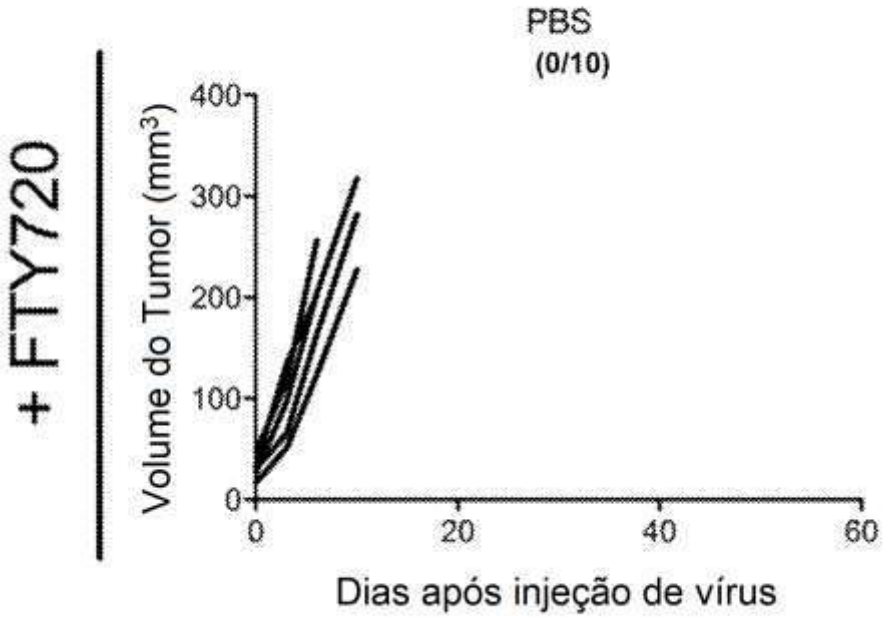


FIG. 52D

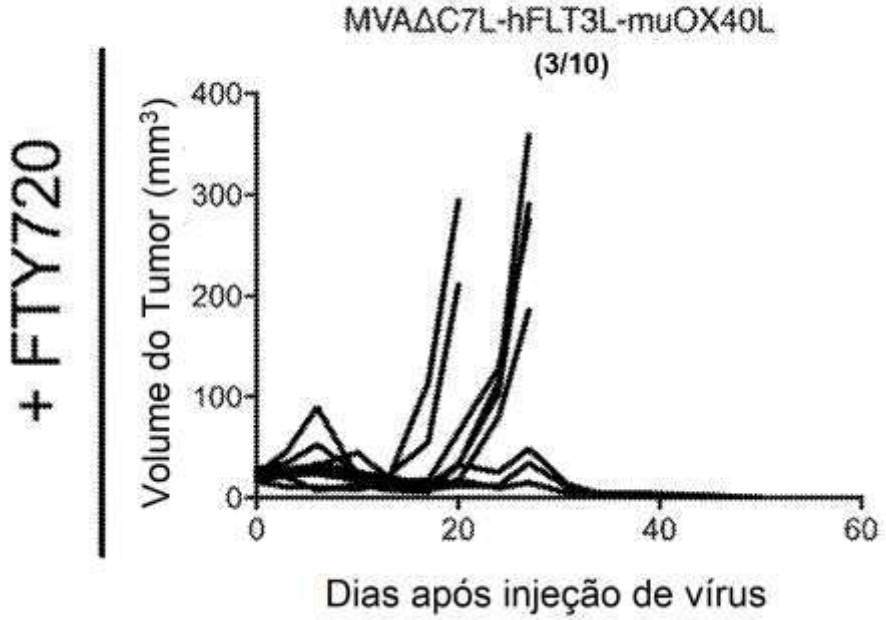


FIG. 53A

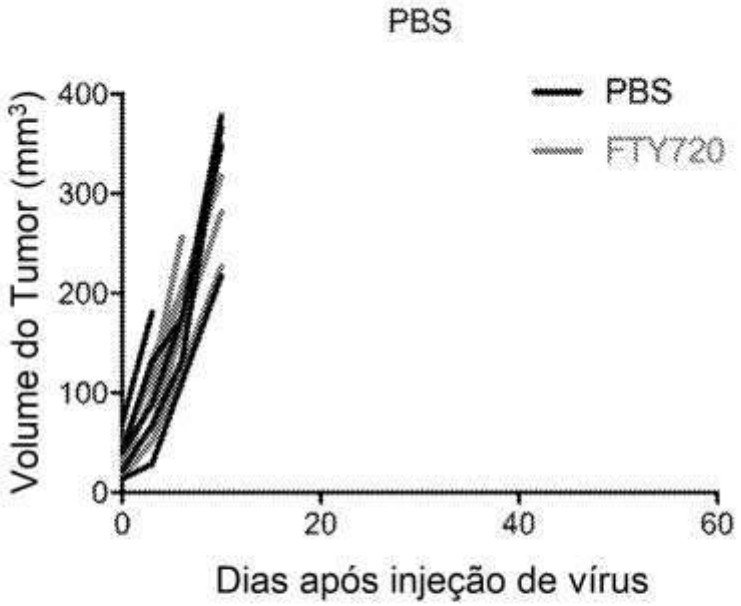


FIG. 53B

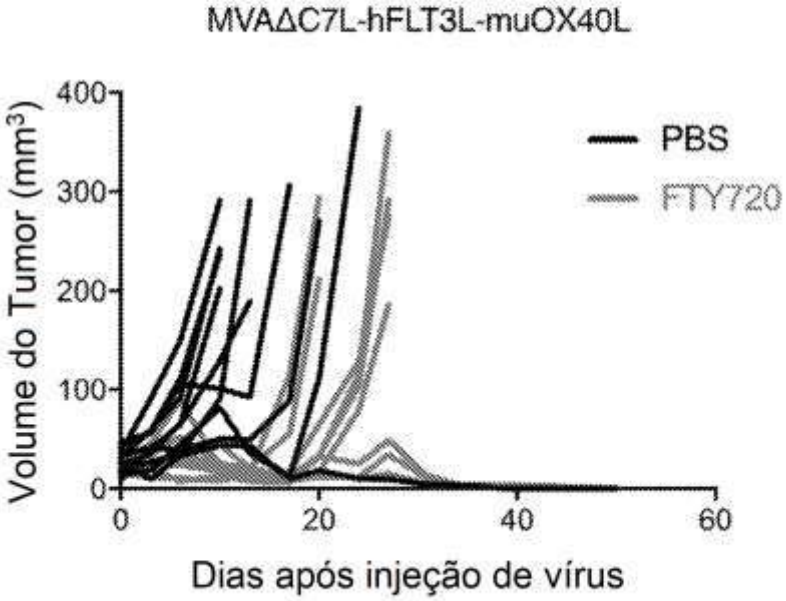


FIG. 53C

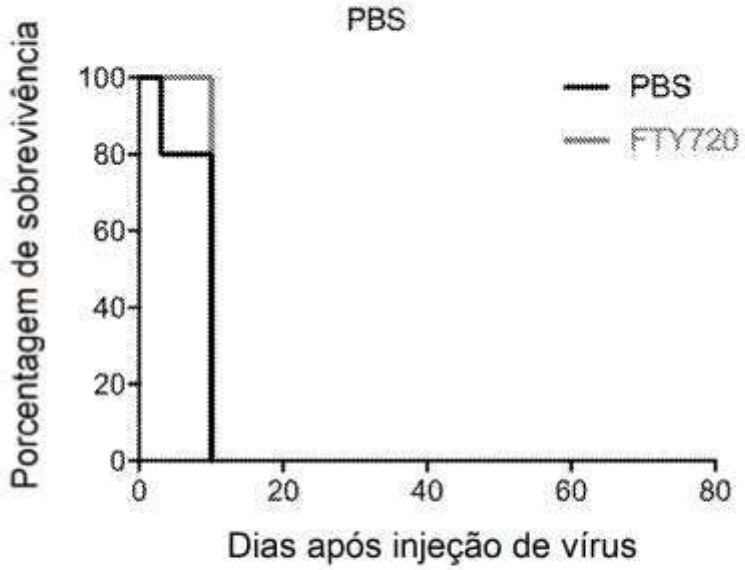


FIG. 53D

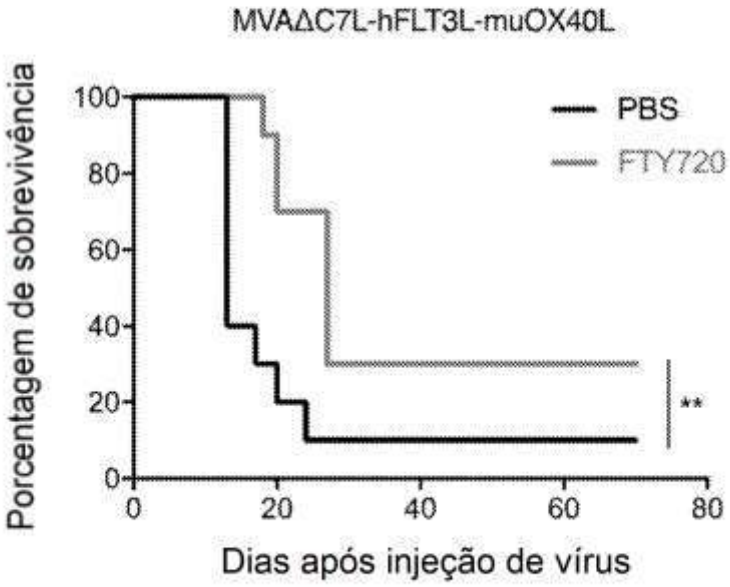


FIG. 54A

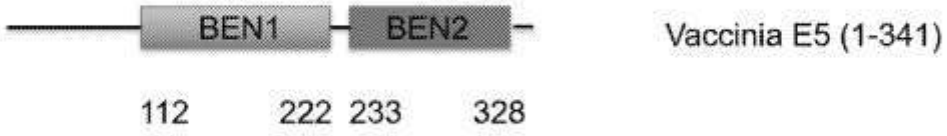


FIG. 54B

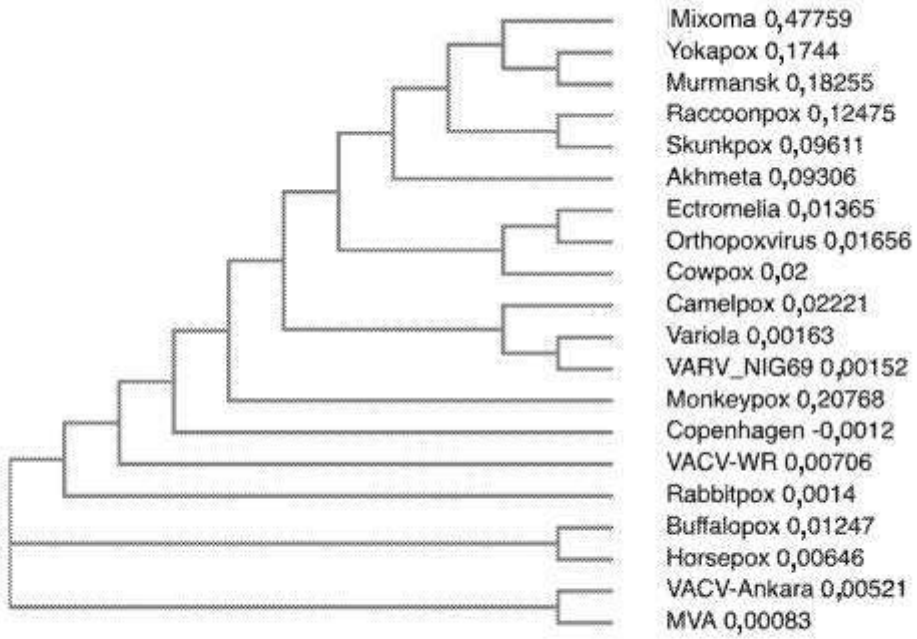


FIG. 55A

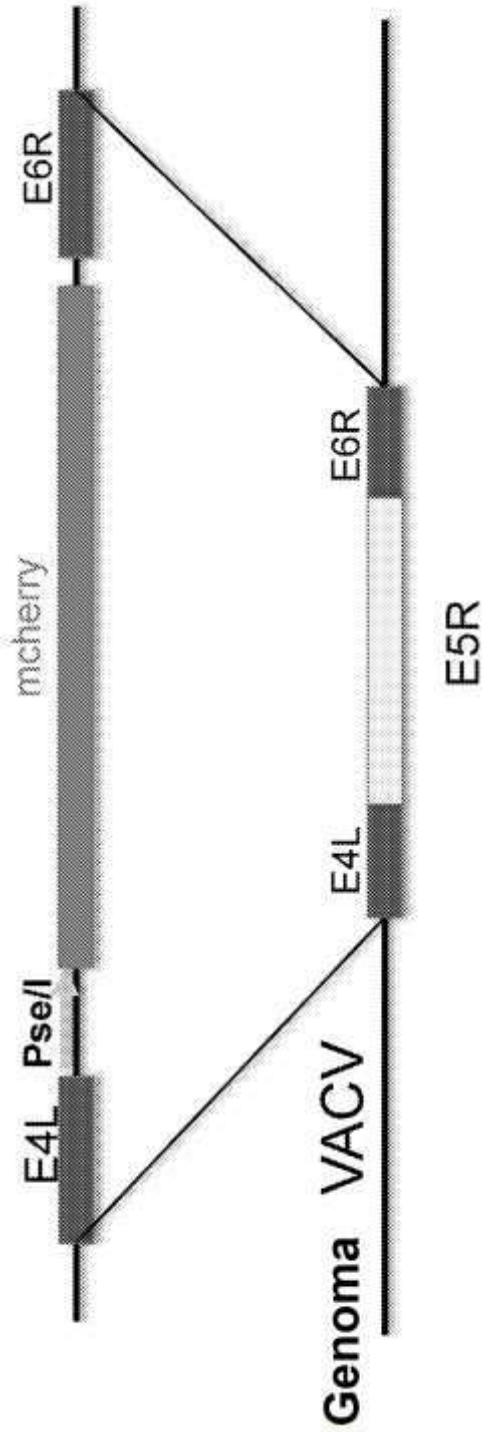


FIG. 55B

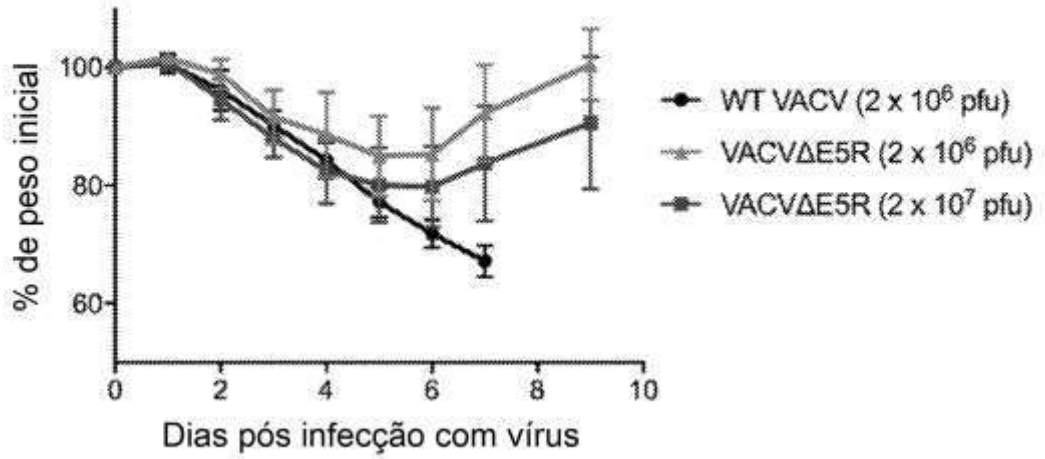


FIG 55C

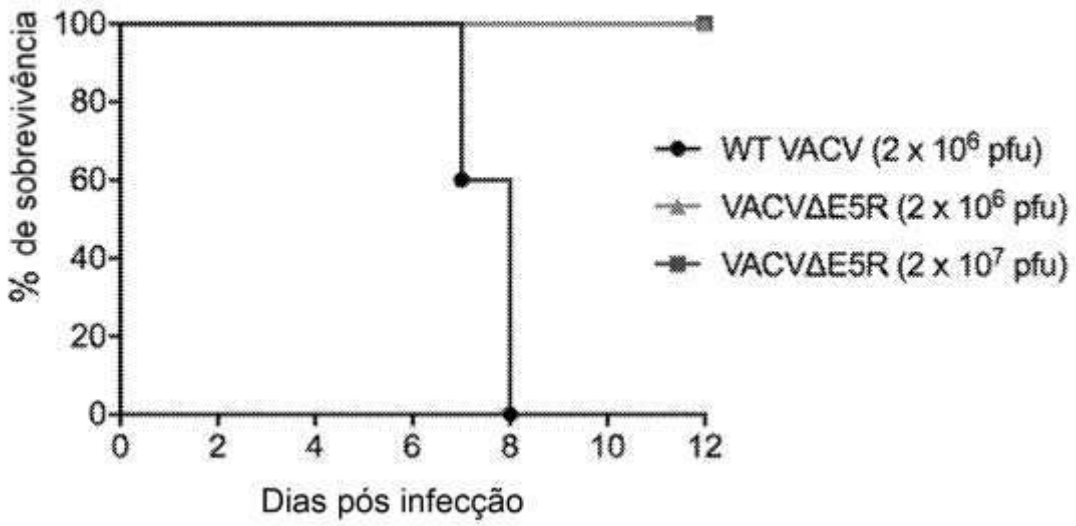


FIG. 56A

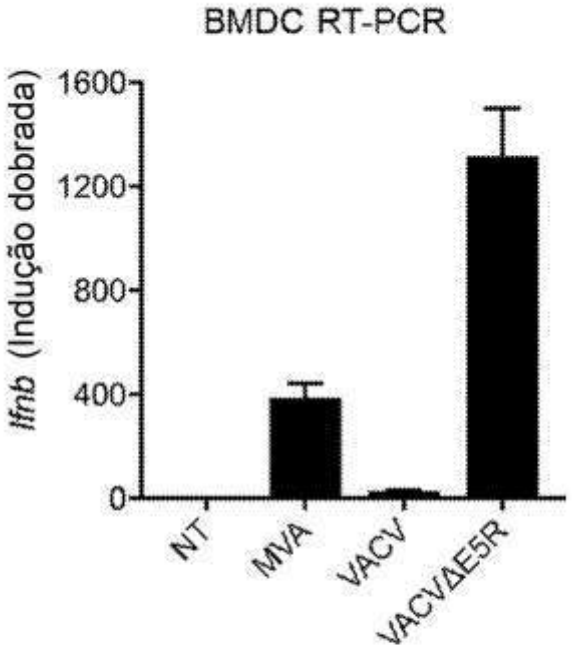


FIG. 56B

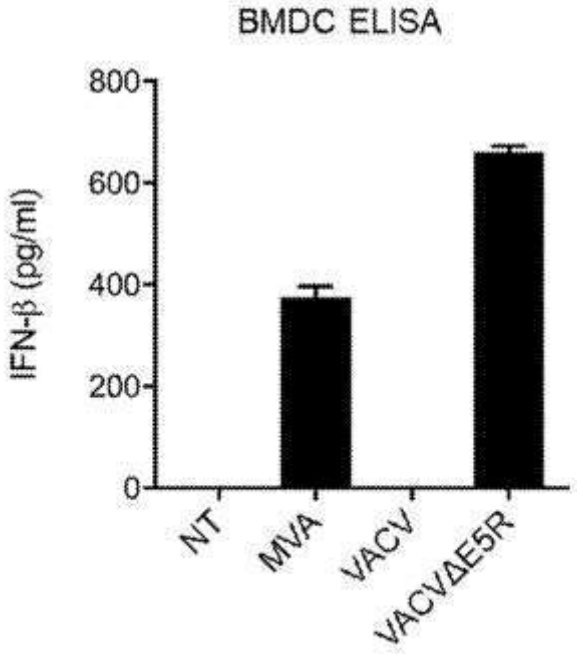


FIG. 57A

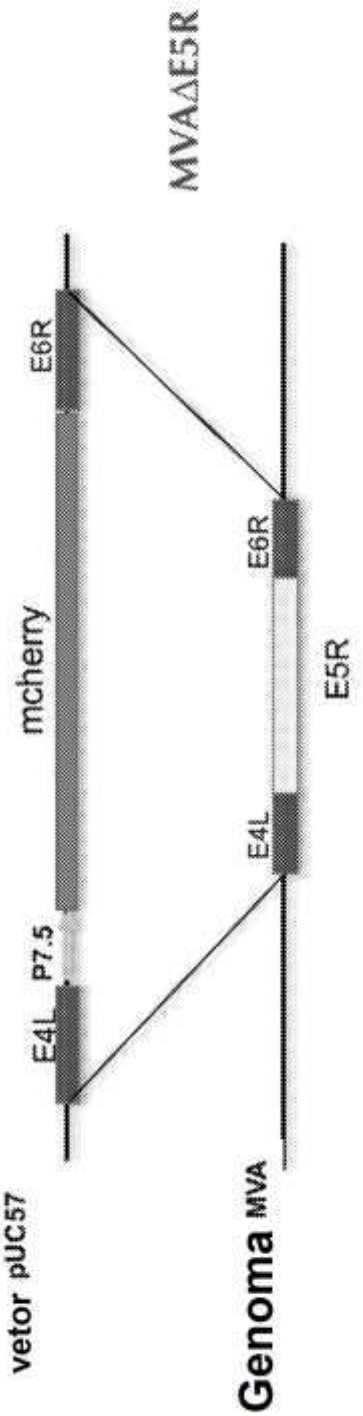

MVAΔE5R
E6R
mcherry
P7.5
E4L
vetor pUC57
E6R
E5R
E4L
Genoma MVA

FIG. 57B

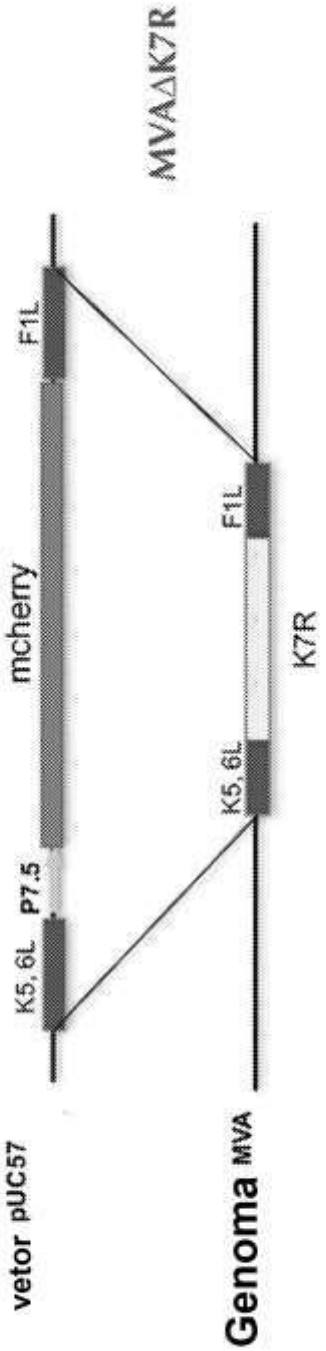

MVAΔK7R
F1L
mcherry
P7.5
K5, 6L
vetor pUC57
F1L
K7R
K5, 6L
Genoma MVA

FIG. 57C

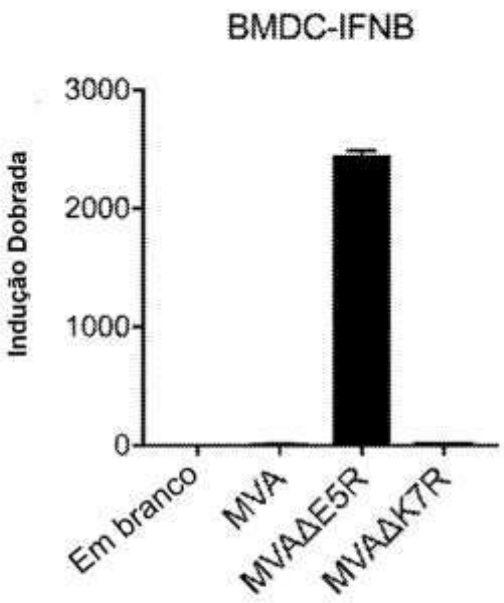


FIG. 57D

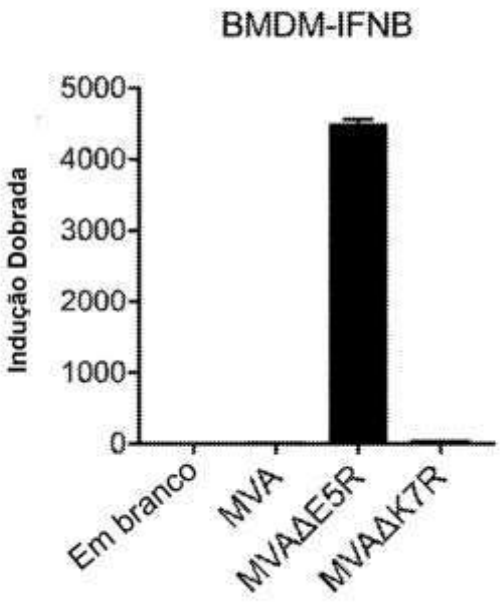


FIG. 58A

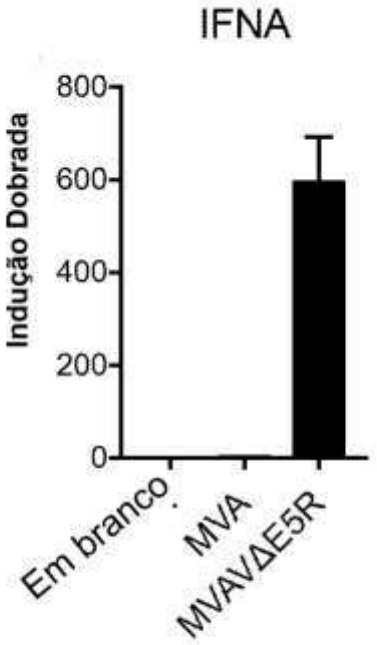


FIG. 58B

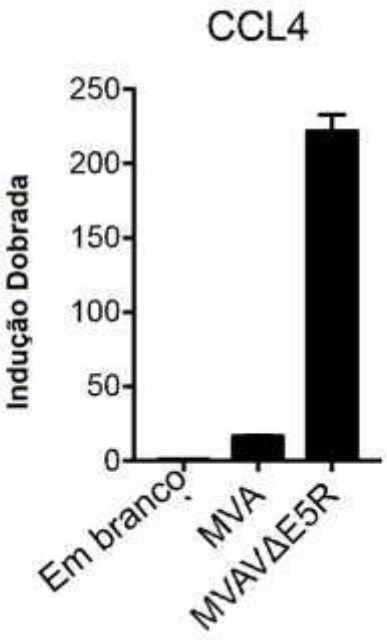


FIG. 58C

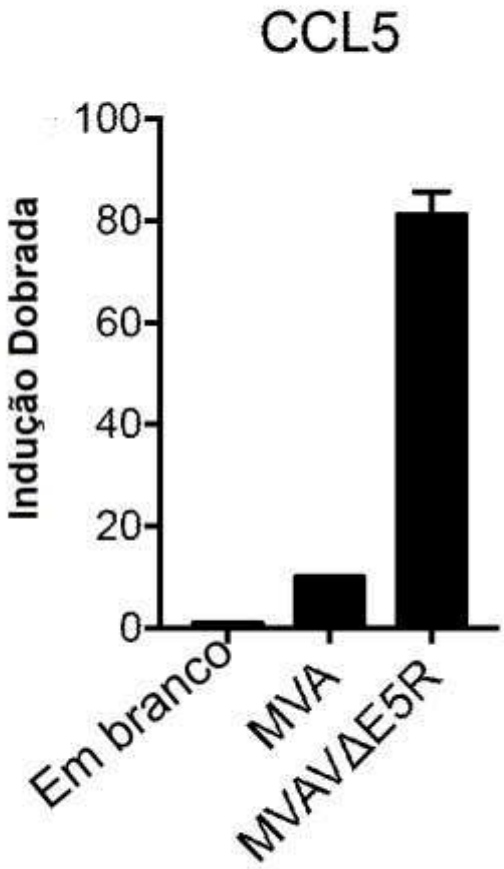


FIG. 59A

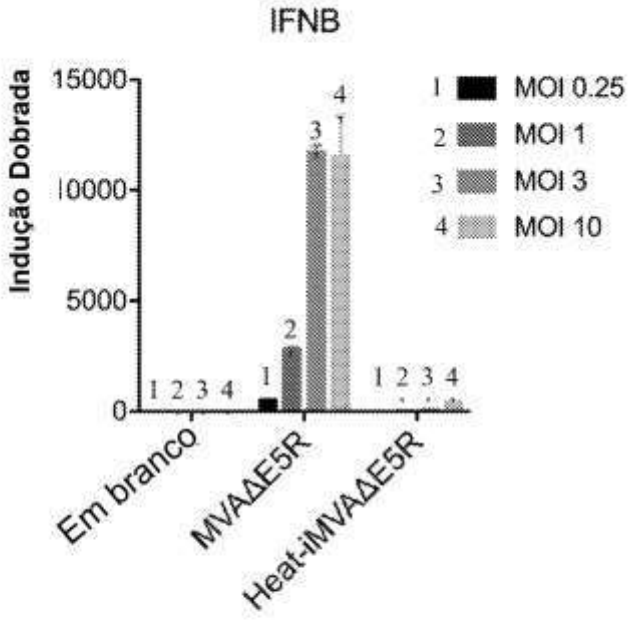


FIG. 59B

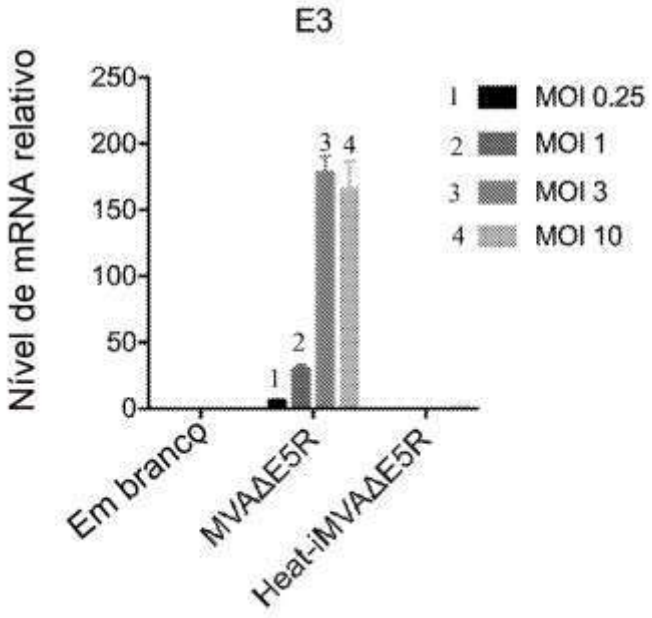


FIG. 59C

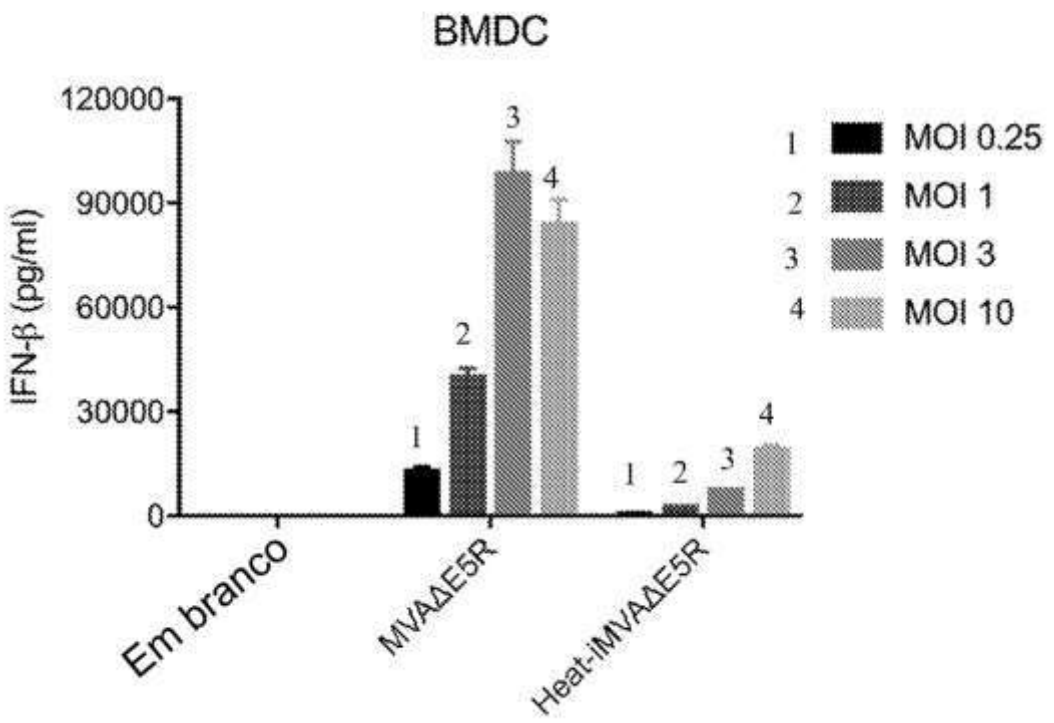

BMDC
IFN-β (pg/ml)
120000
90000
60000
30000
0
1
2
3
4
MOI 0.25
MOI 1
MOI 3
MOI 10
Em branco
MVAΔE5R
Heat-iMVAΔE5R

FIG. 60A

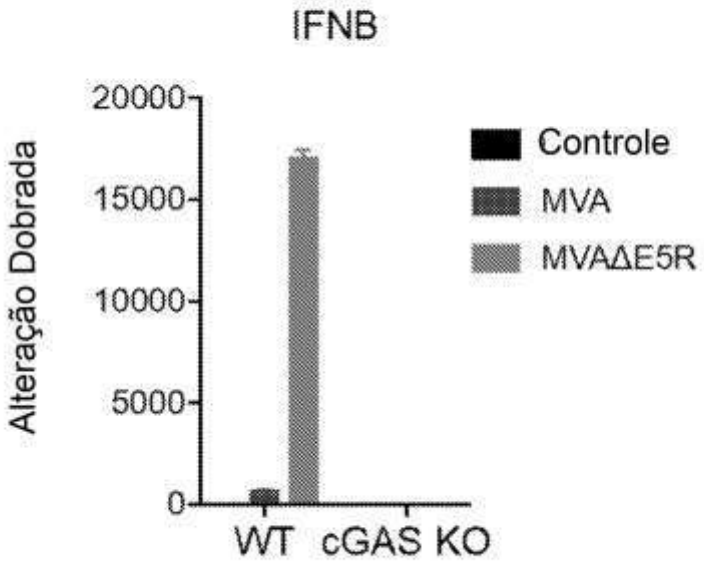


FIG. 60B

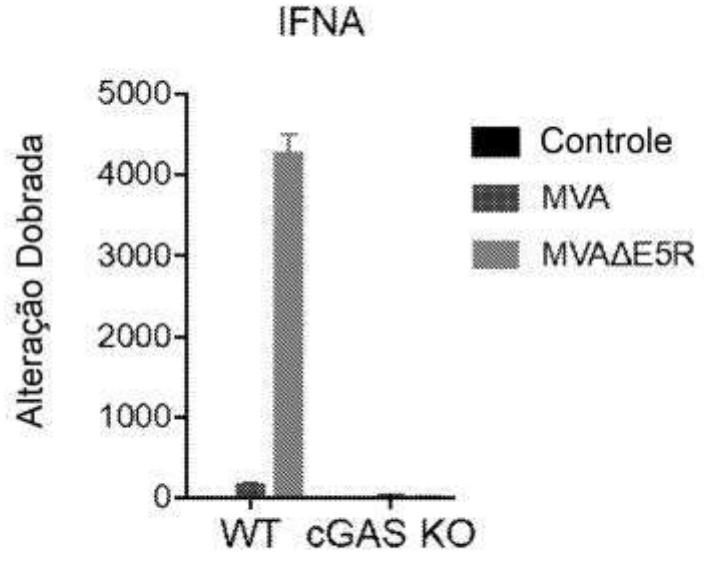


FIG. 60C

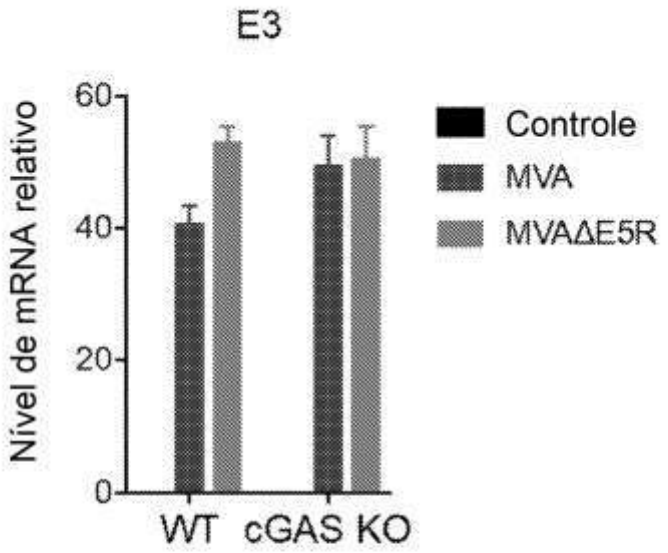


FIG. 60D

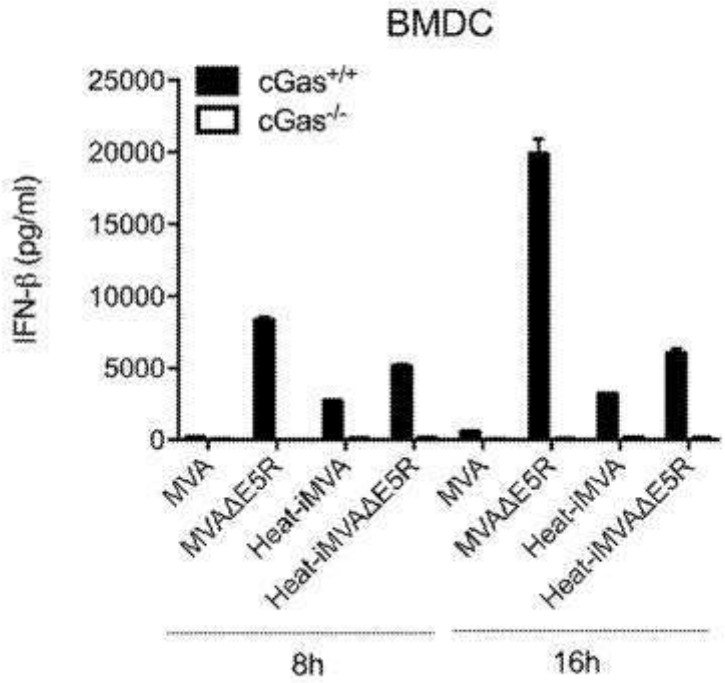


FIG. 61A

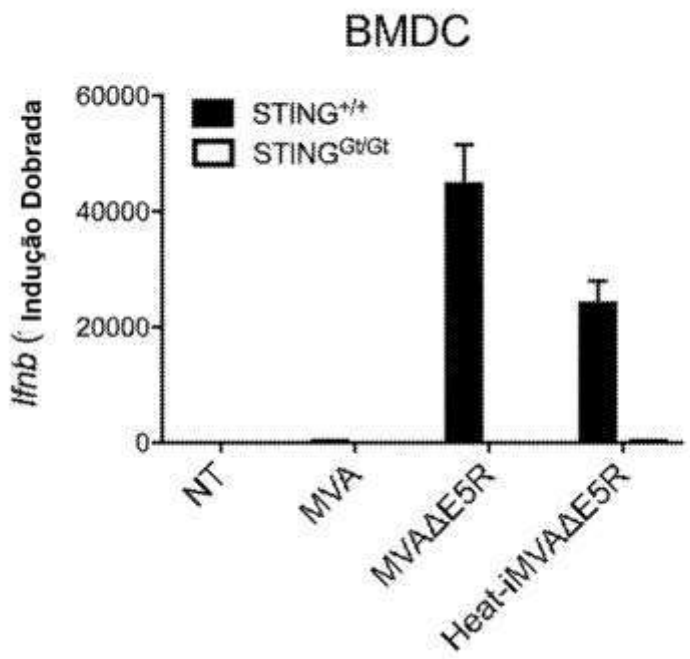


FIG. 61B

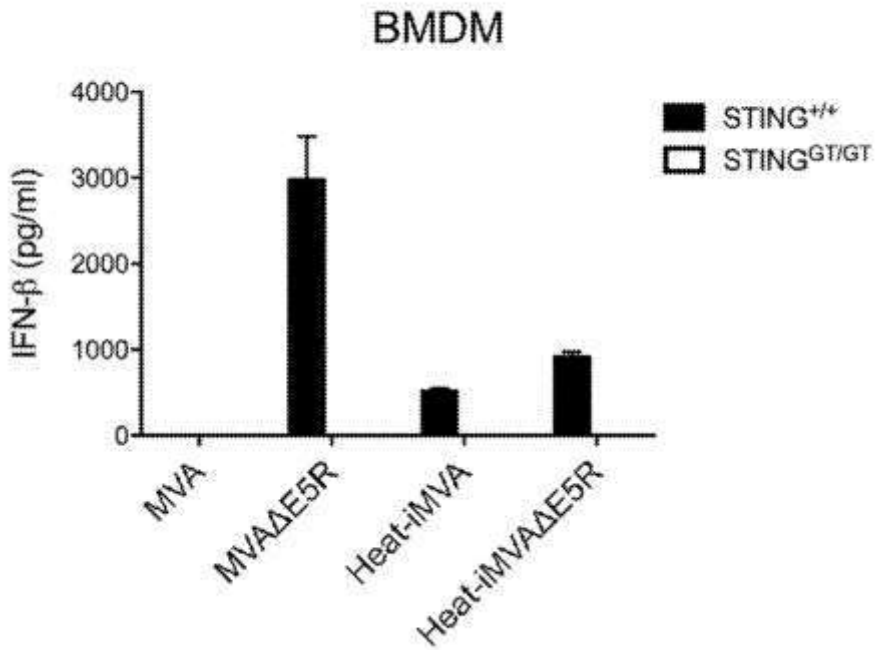


FIG. 62A

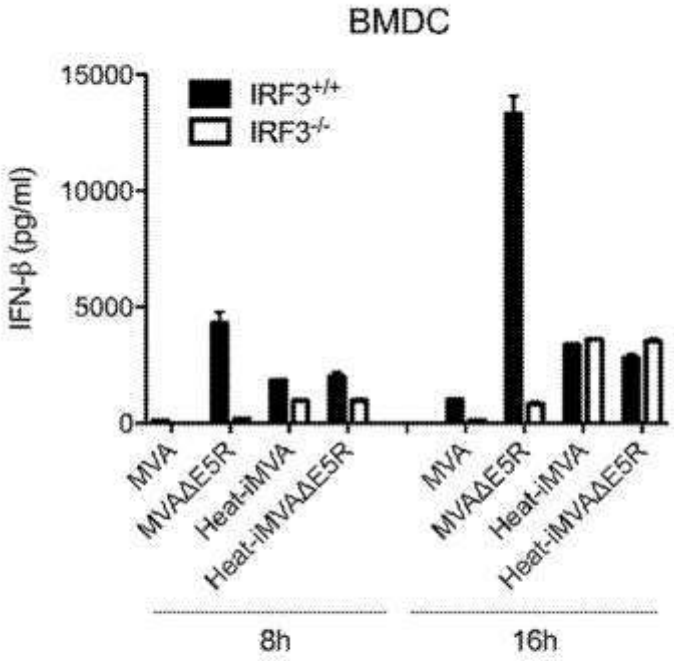


FIG. 62B

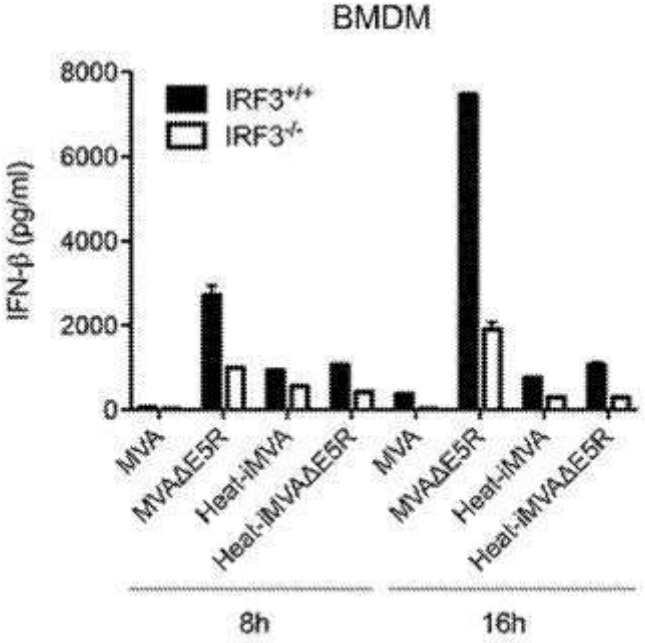


FIG. 62C

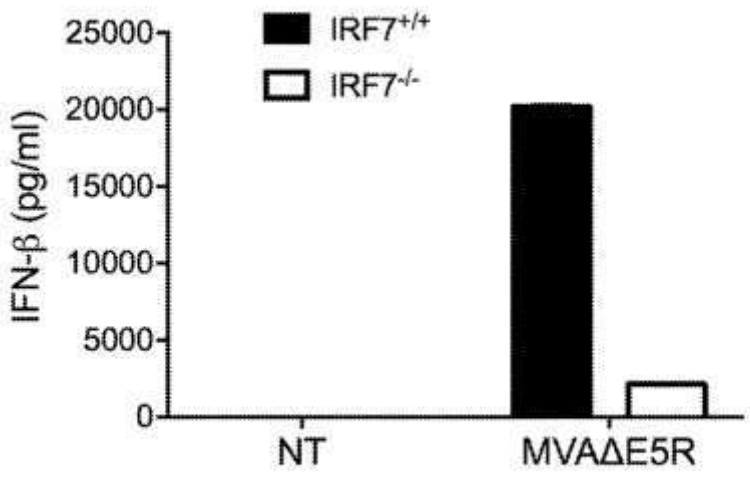


FIG. 62D

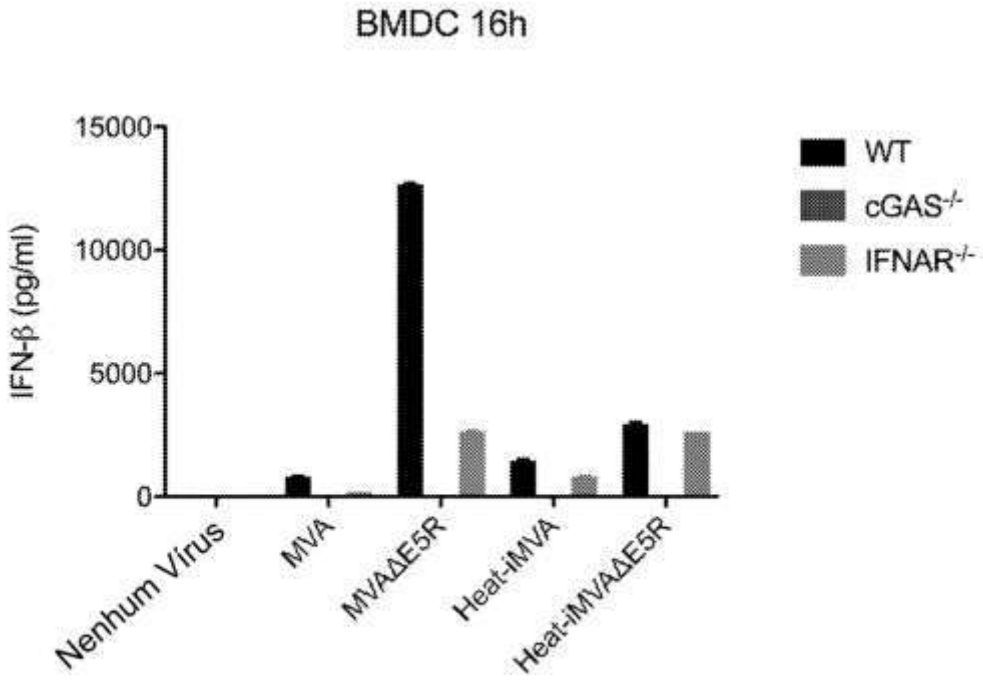


FIG. 63A

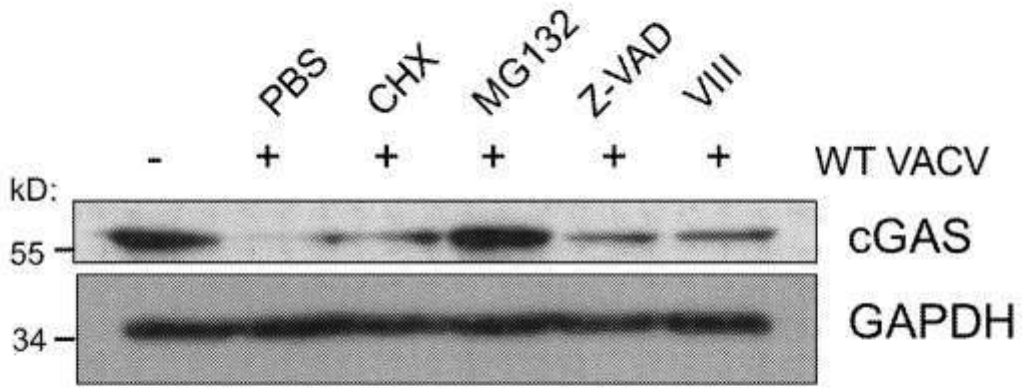


FIG. 63B

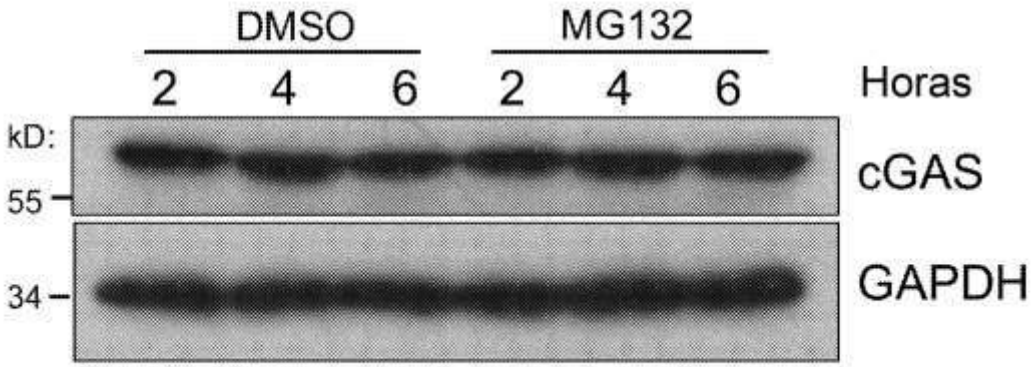


FIG. 63C

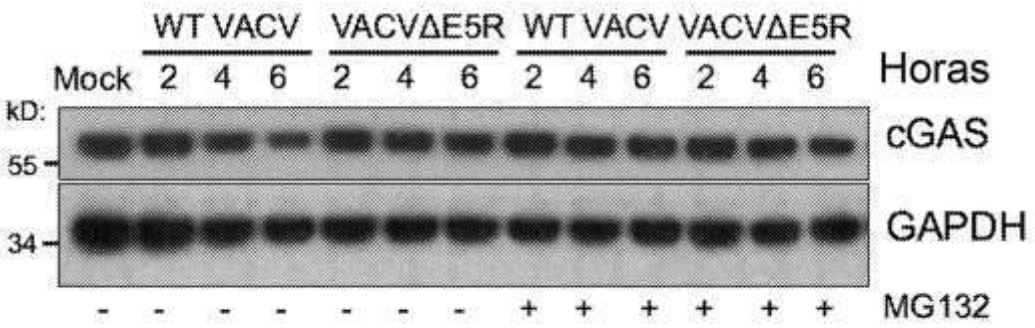

WT VACV
VACVΔE5R
WT VACV
VACVΔE5R
Mock
2 4 6 2 4 6 2 4 6 2 4 6
Horas
kD:
55
34
cGAS
GAPDH
- - - - - - - + + + + + +
MG132

FIG. 64

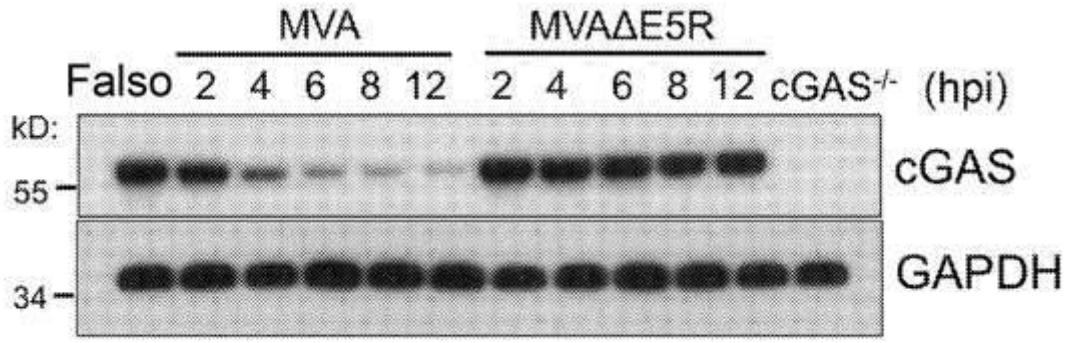


FIG. 65

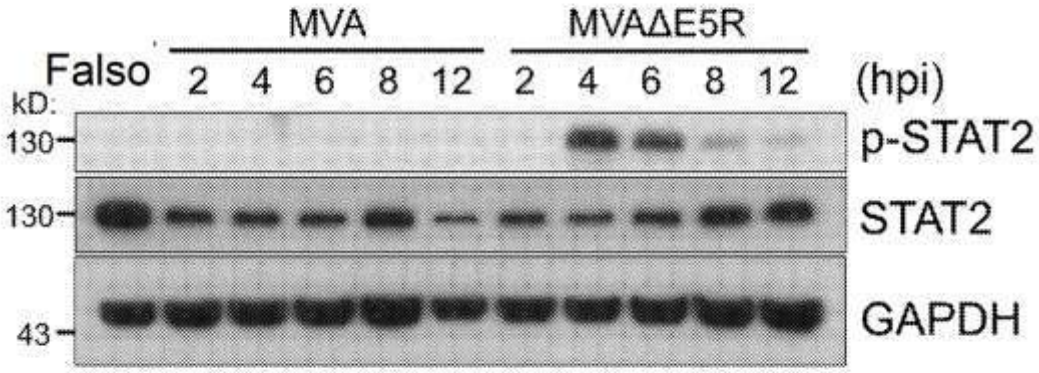

MVA
MVAΔE5R
Falso
2 4 6 8 12 2 4 6 8 12 (hpi)
kD:
130
p-STAT2
130
STAT2
43
GAPDH

FIG. 66

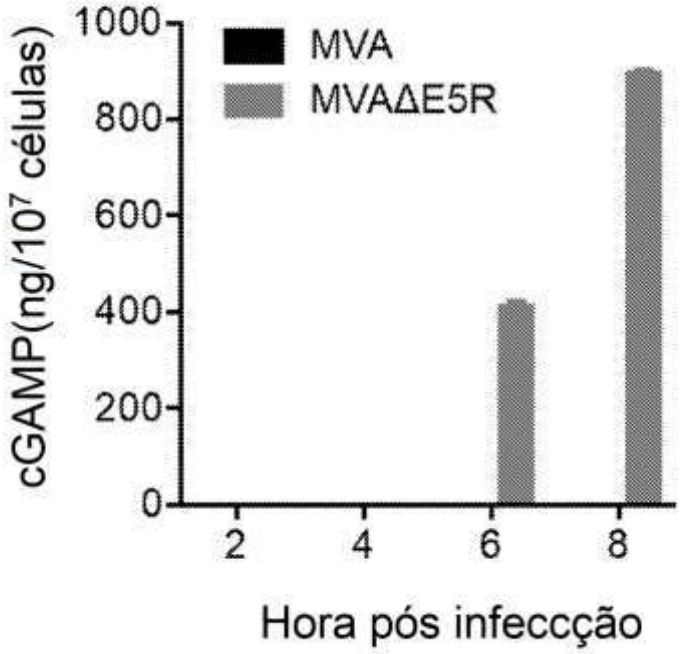

1000
800
600
400
200
0
cGAMP(ng/10⁷ células)
MVA
MVAΔE5R
2
4
6
8
Hora pós infeccção

FIG. 67A

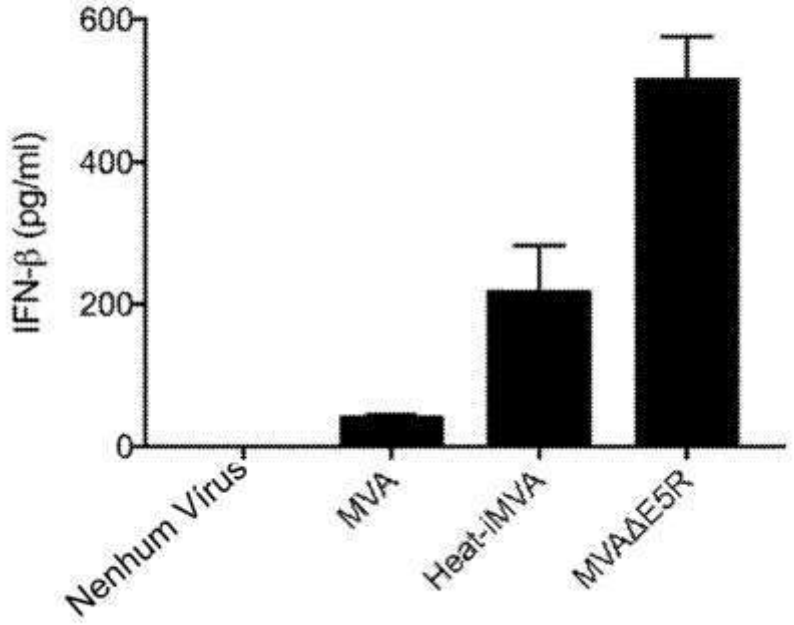


FIG. 67B

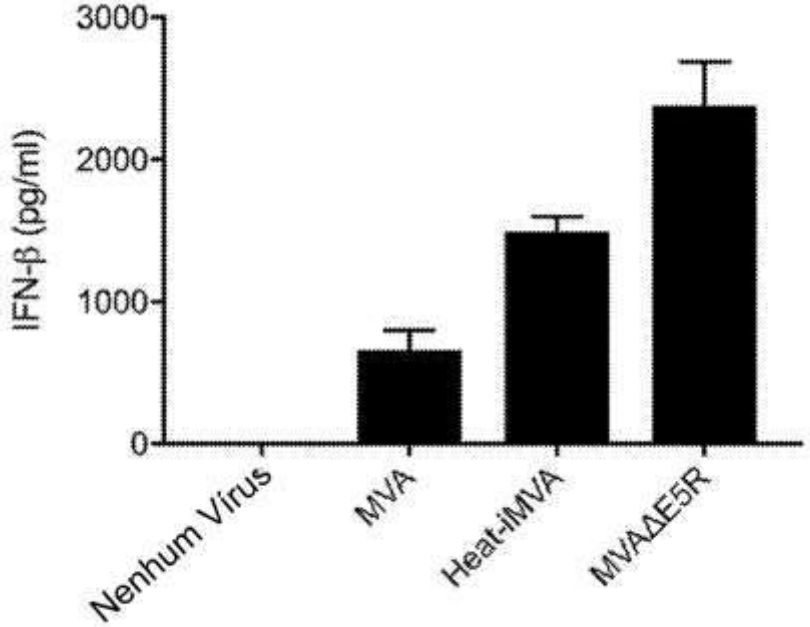


FIG. 68

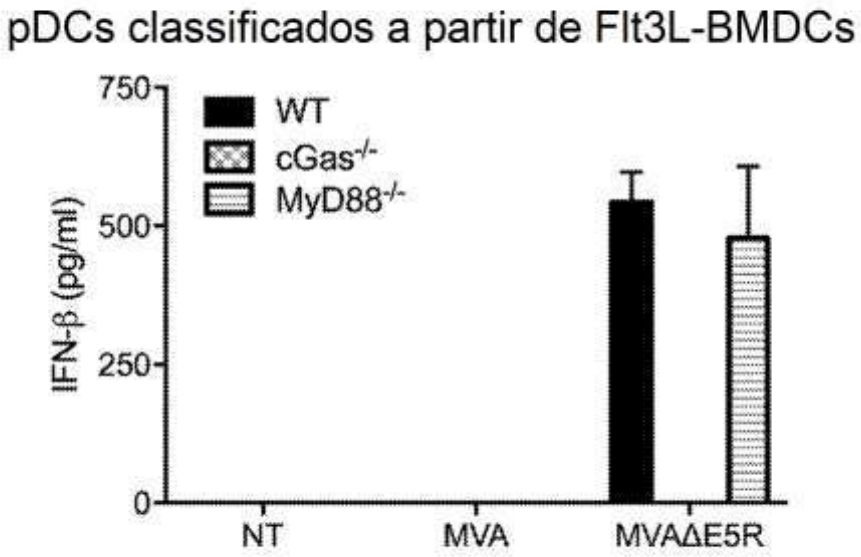

pDCs classificados a partir de Flt3L-BMDCs
750
500
250
0
IFN-β (pg/ml)
WT
cGas-/-
MyD88-/-
NT
MVA
MVAΔE5R

FIG. 69

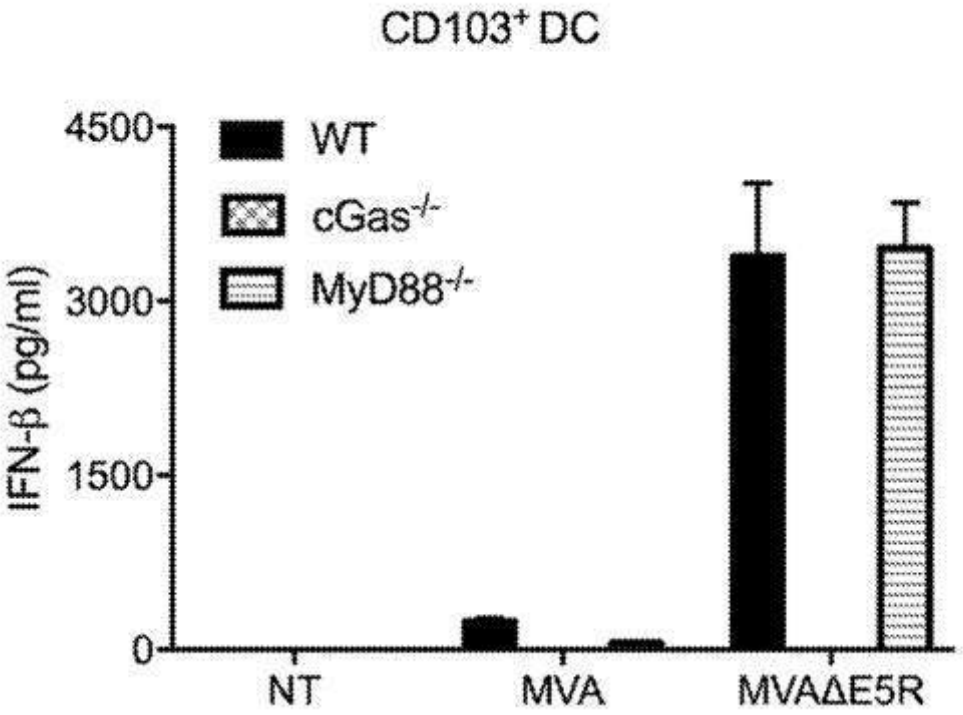

CD103+ DC
4500
3000
1500
0
IFN-β (pg/ml)
WT
cGas-/-
MyD88-/-
NT
MVA
MVAΔE5R

FIG. 70

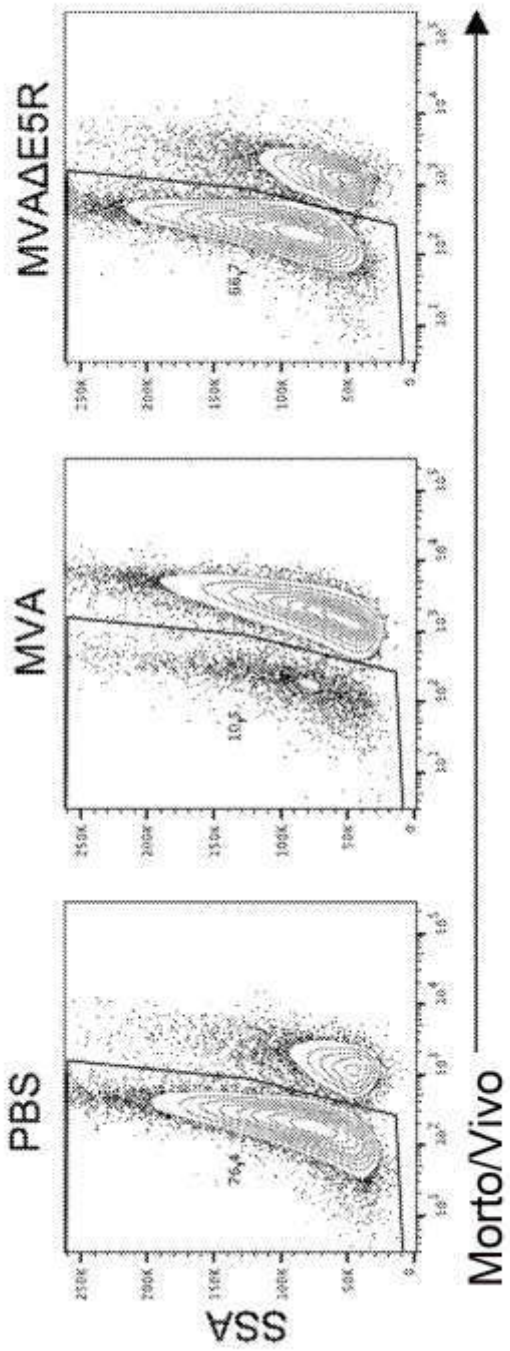


FIG. 71A

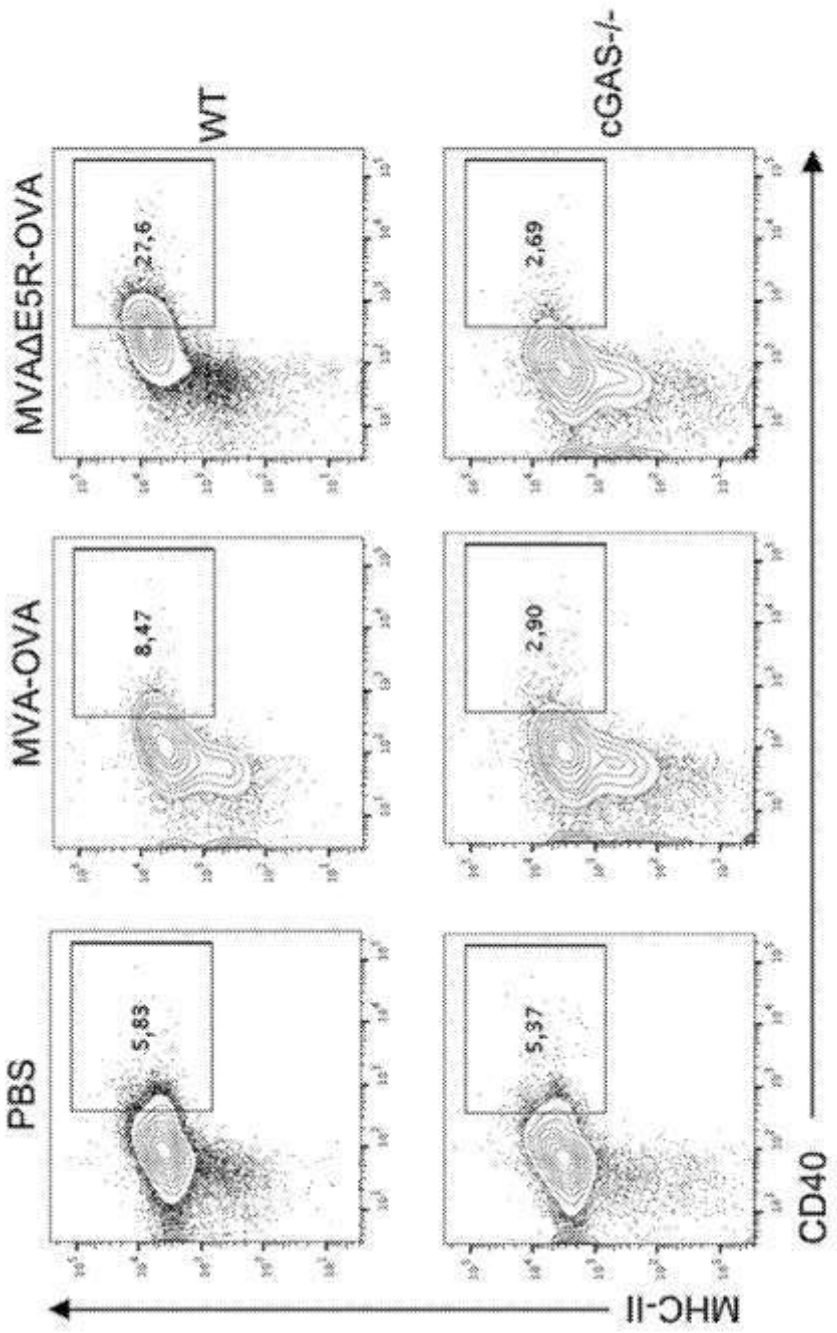

WT
cGAS-/-
MVAΔE5R-OVA
MVA-OVA
PBS
27,6
8,47
5,83
2,69
2,90
5,37
MHC-II
CD40

FIG. 71B

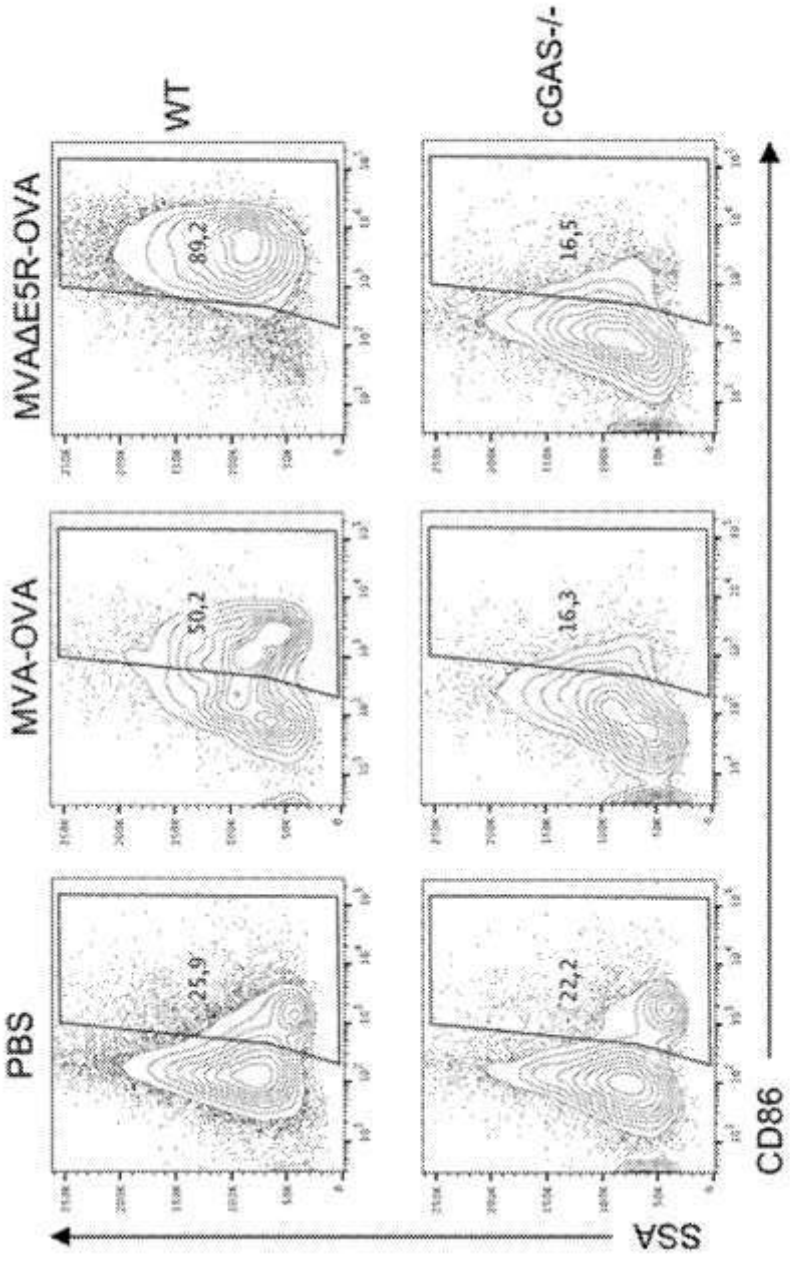

WT
cGAS-/-
MVAΔE5R-OVA
MVA-OVA
PBS
89,2
16,5
50,2
16,3
25,9
22,2
SSA
CD86

FIG. 72A

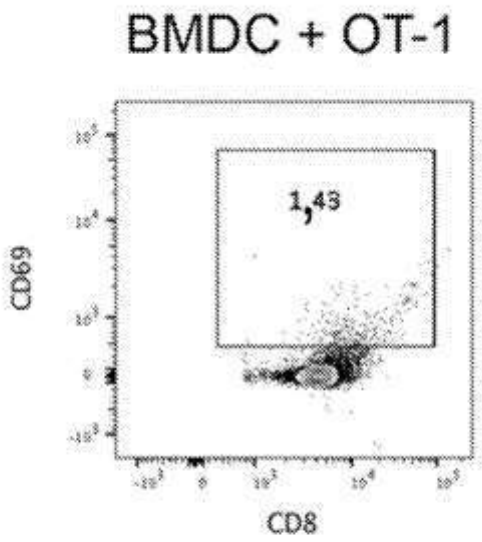


FIG. 72B

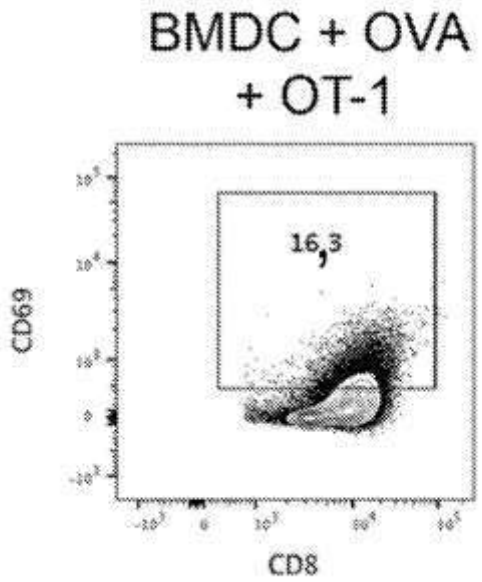


FIG. 72C

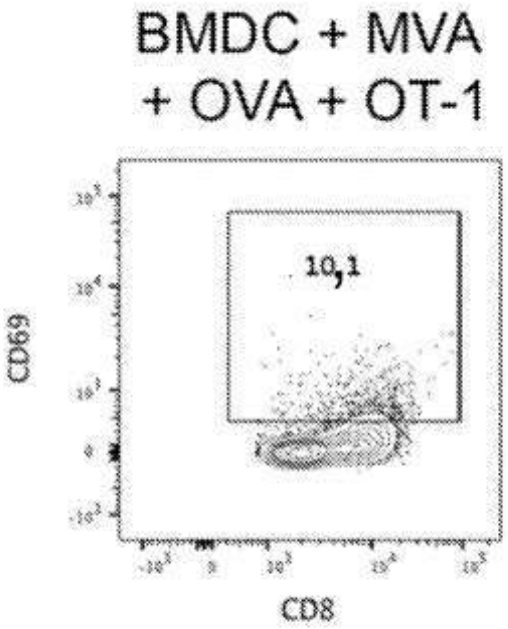


FIG. 72D

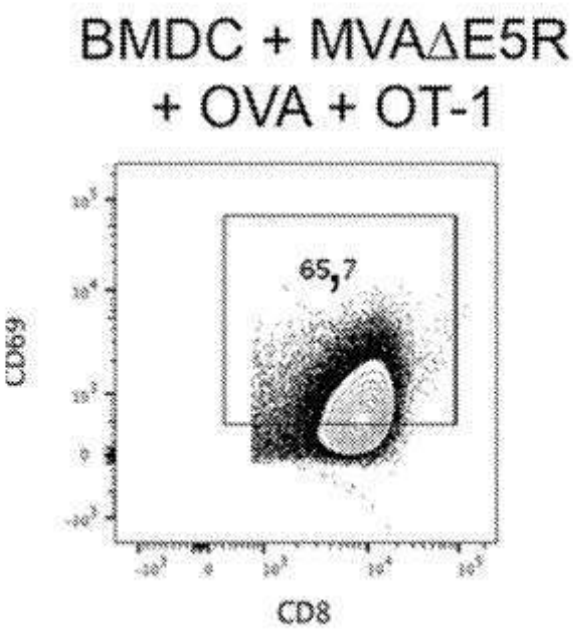


FIG. 72E

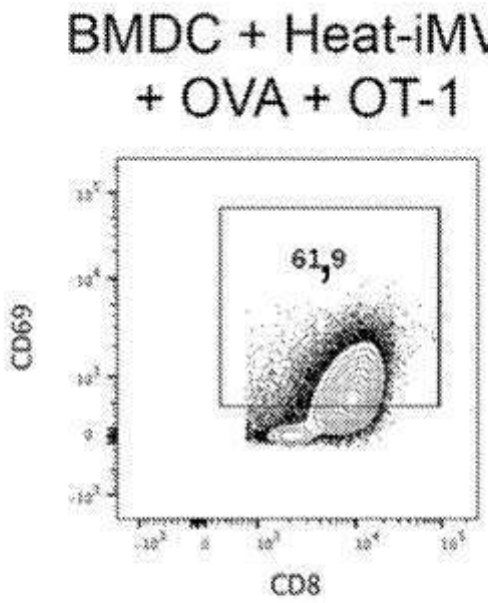


FIG. 72F

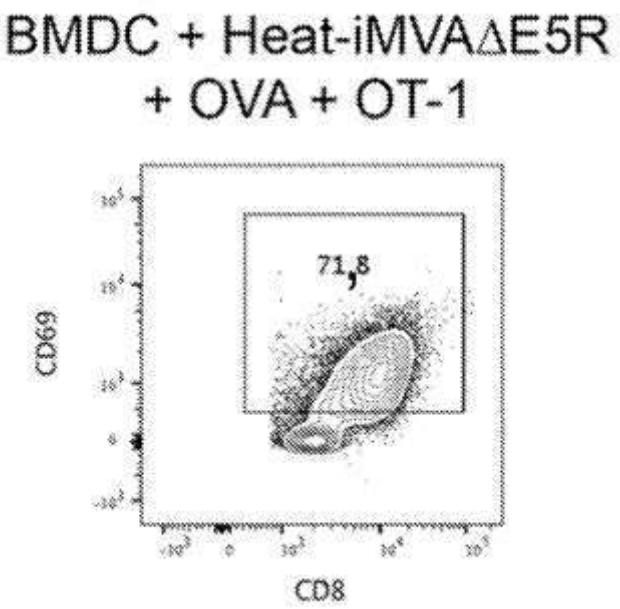


FIG. 72G

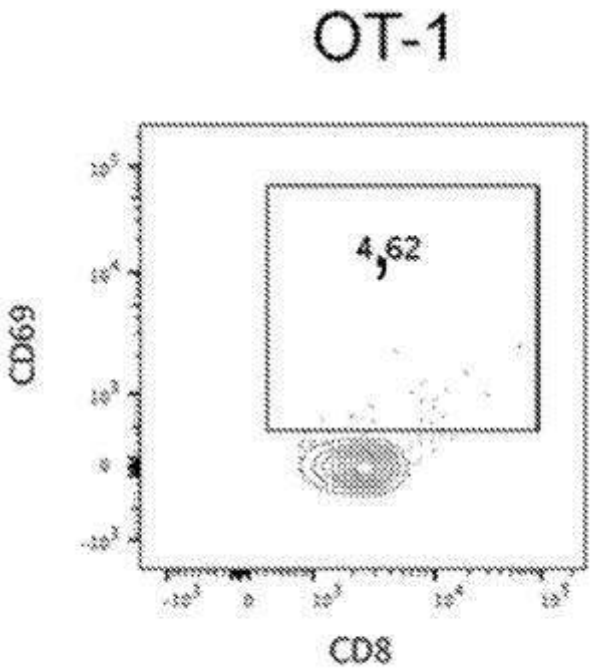


FIG. 73

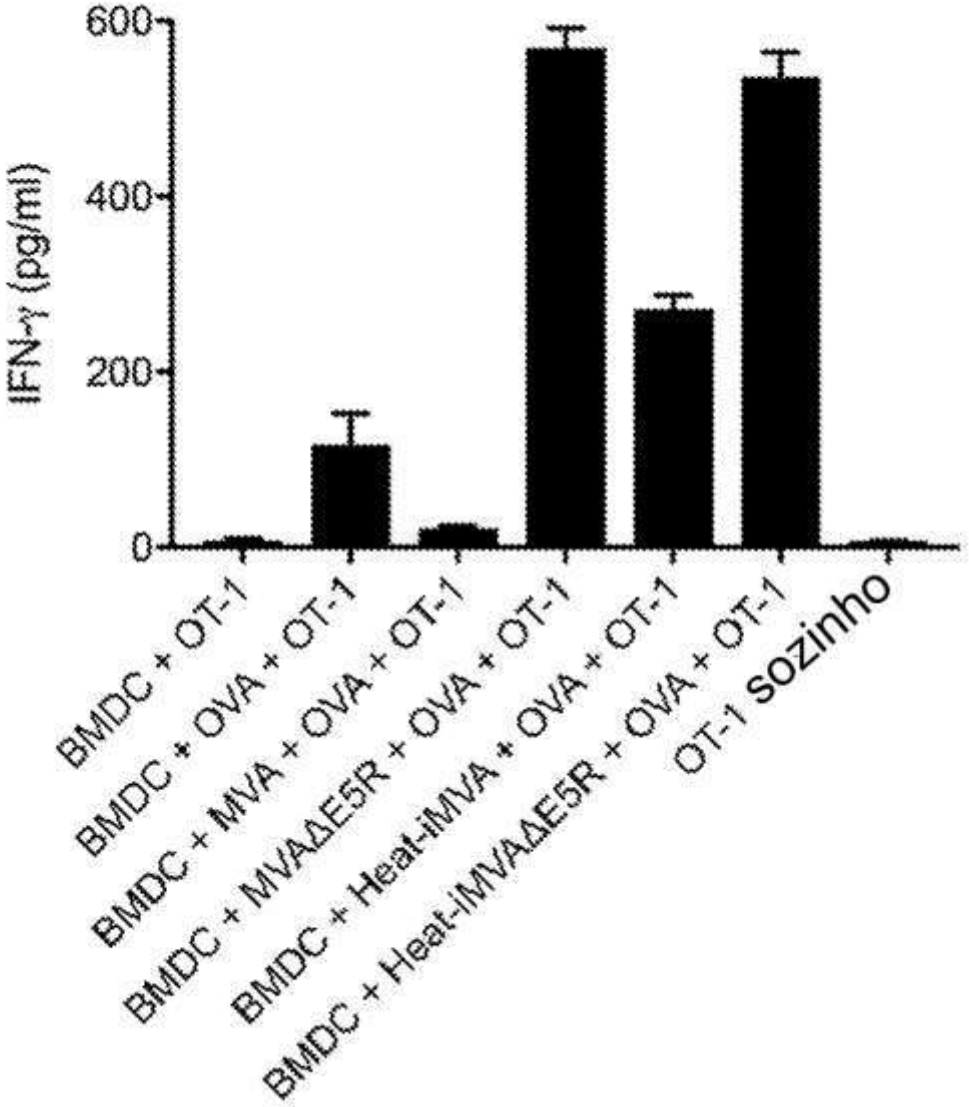

600
400
200
0
IFN-γ (pg/ml)
BMDC + OT-1
BMDC + OVA + OT-1
BMDC + MVA + OVA + OT-1
BMDC + MVAΔE5R + OVA + OT-1
BMDC + Heat-iMVA + OVA + OT-1
BMDC + Heat-iMVAΔE5R + OVA + OT-1
OT-1 sozinho

FIG. 74

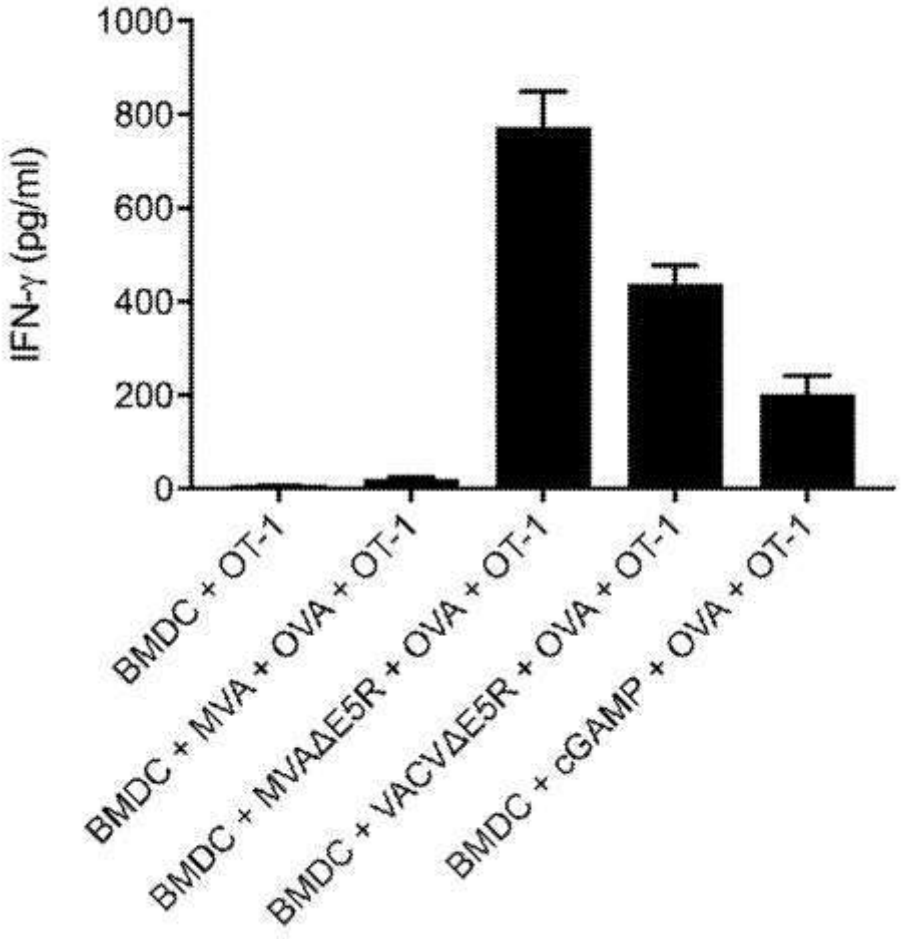

1000
800
600
400
200
0
IFN-γ (pg/ml)
BMDC + OT-1
BMDC + MVA + OVA + OT-1
BMDC + MVAΔE5R + OVA + OT-1
BMDC + VACVΔE5R + OVA + OT-1
BMDC + cGAMP + OVA + OT-1

FIG. 75A

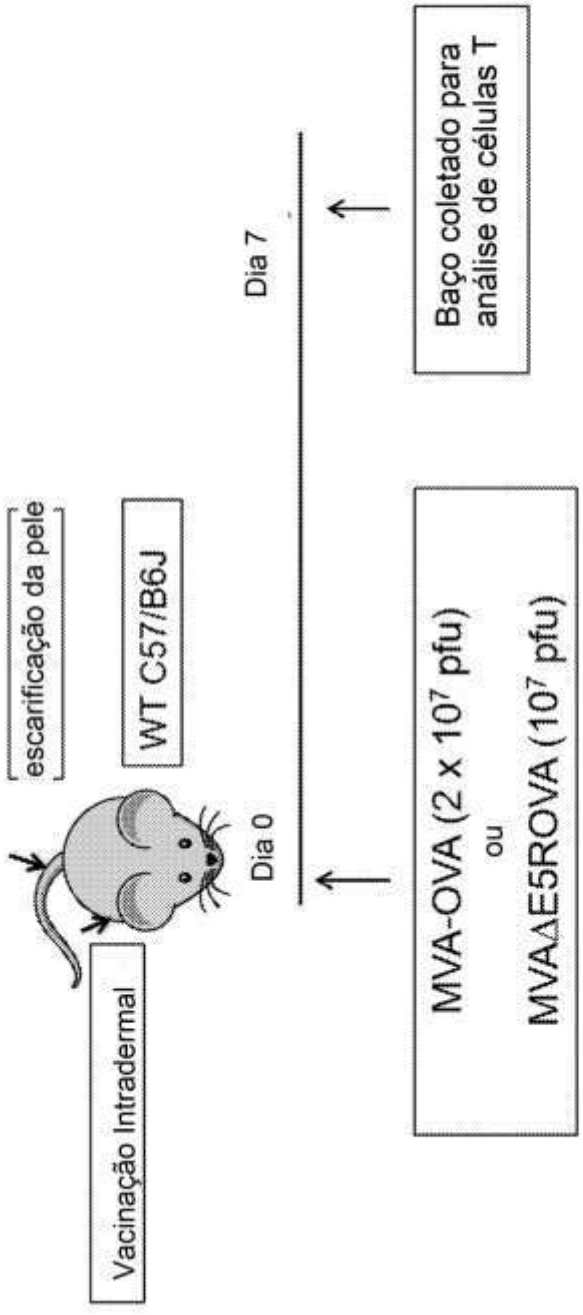

escarificação da pele
WT C57/B6J
Vacinação Intradermal
Dia 0
Dia 7
MVA-OVA (2 x 10^7 pfu)
ou
MVAΔE5ROVA (10^7 pfu)
Baço coletado para análise de células T

FIG. 75B

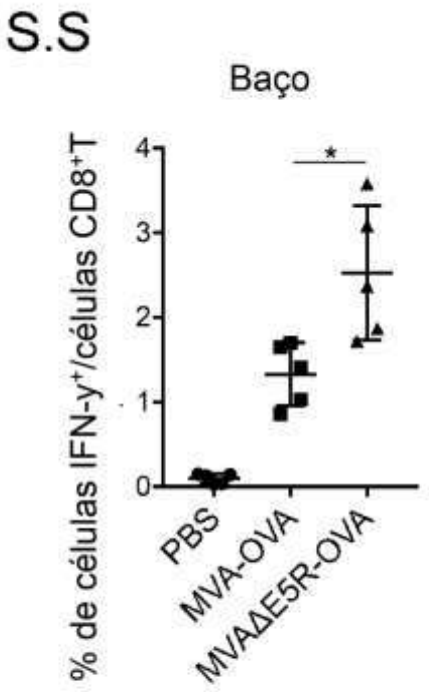


FIG. 75C

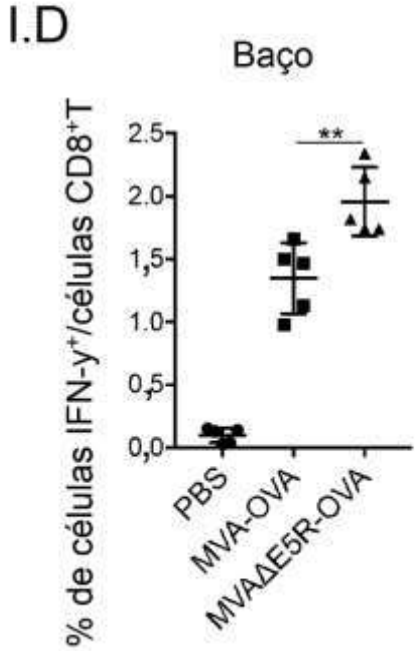


FIG. 76A

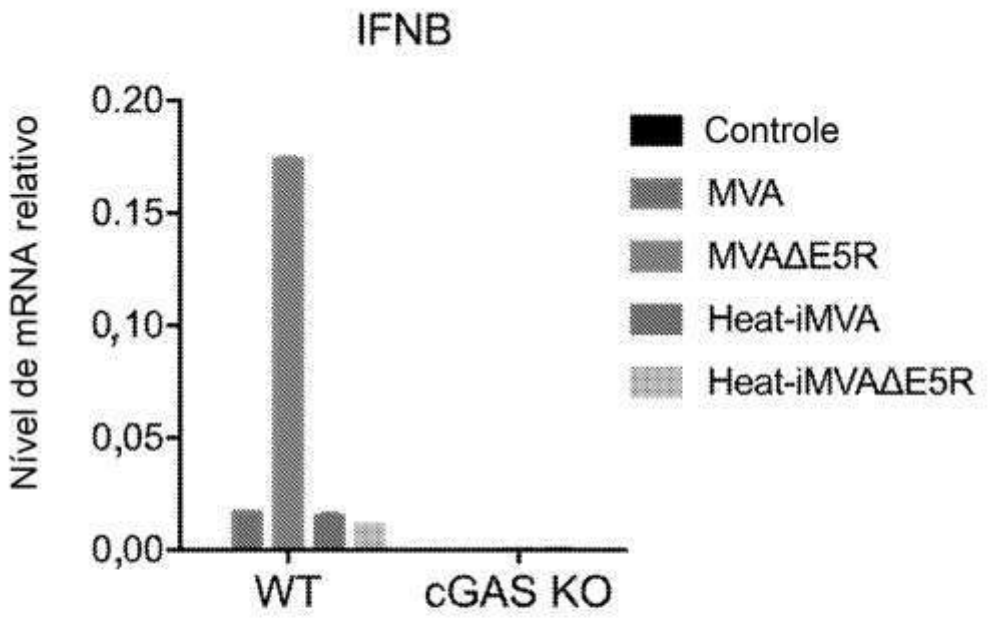


FIG. 76B

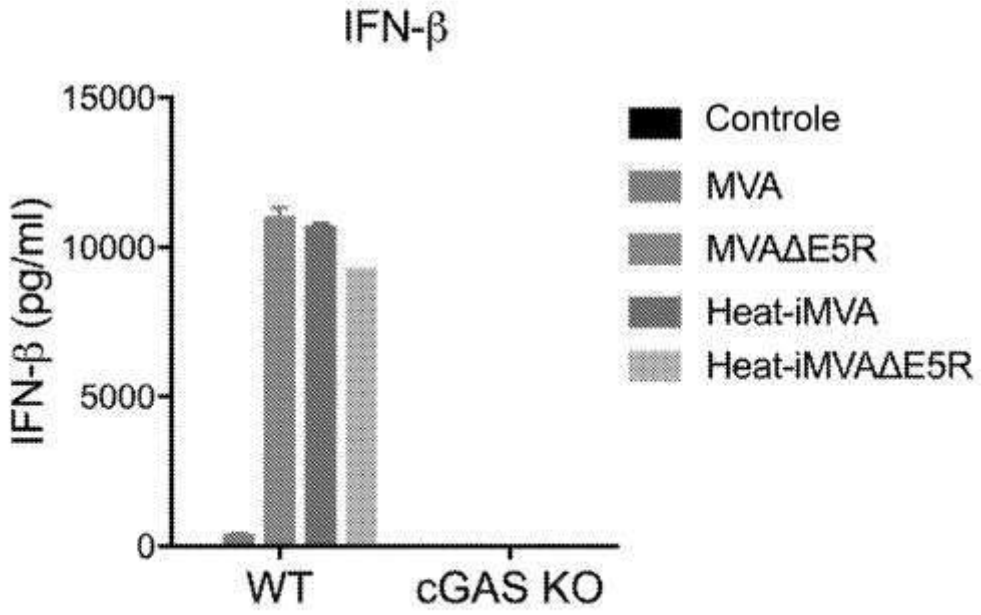


FIG. 77A

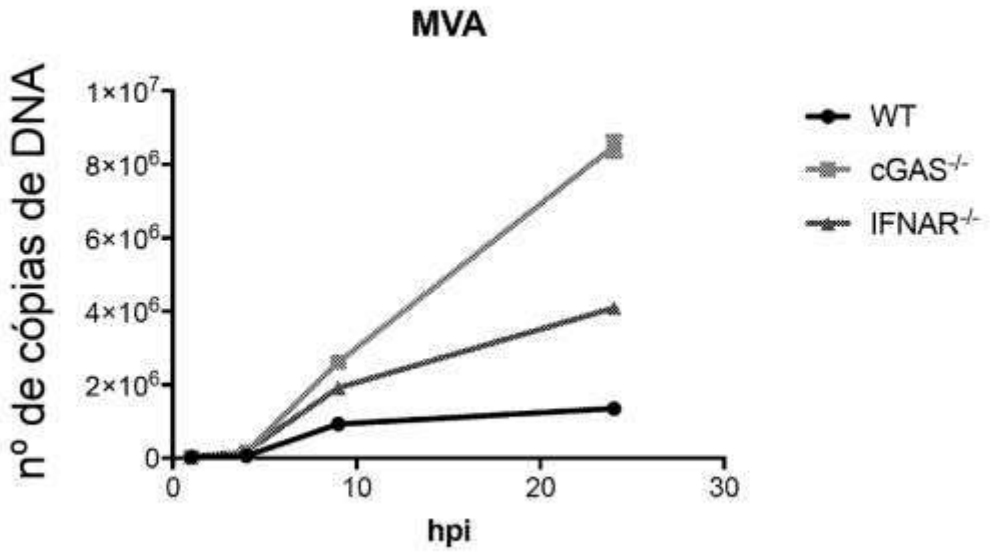


FIG. 77B

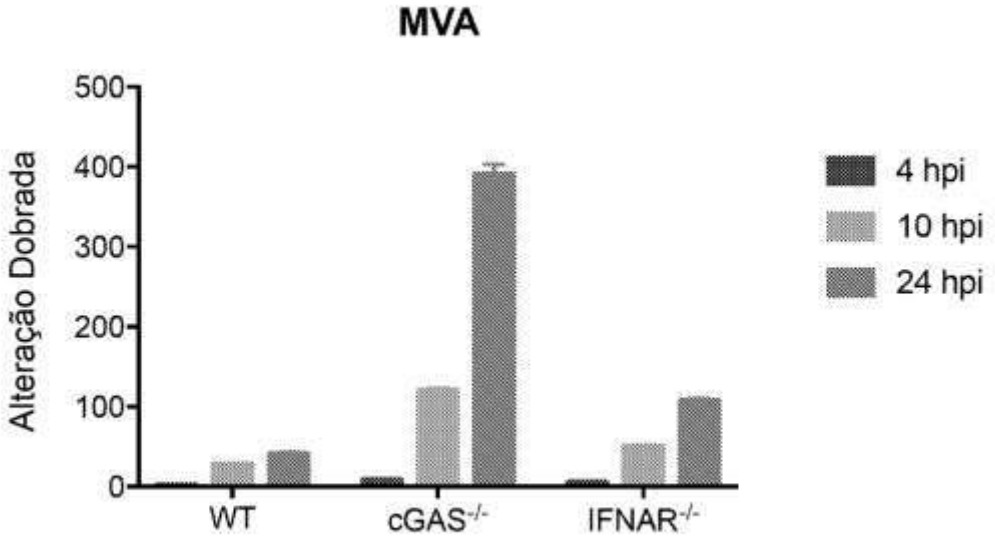


FIG. 77C

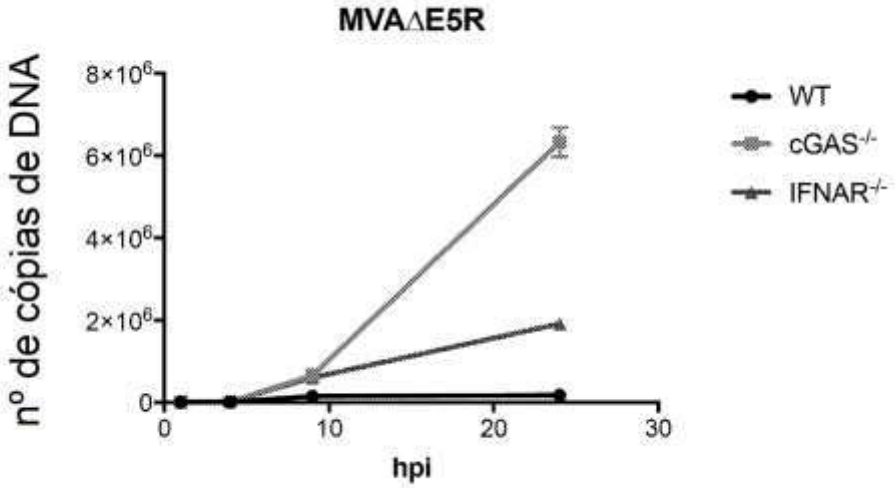


FIG. 77D

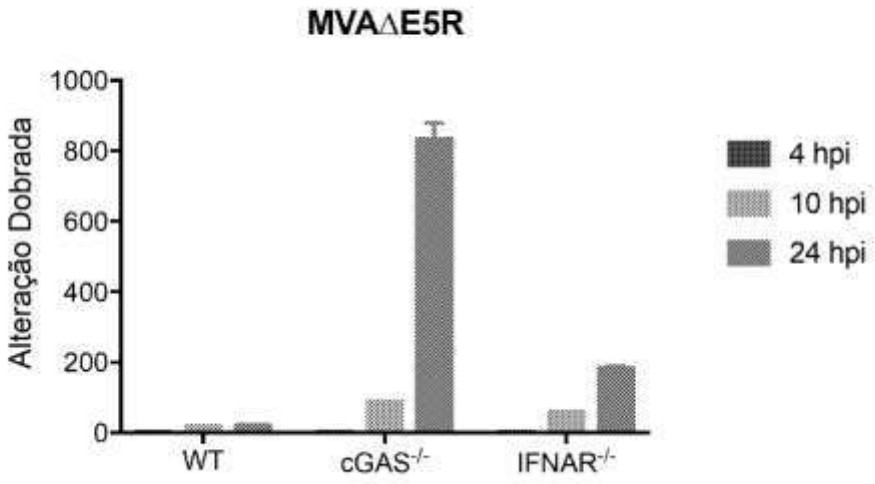


FIG. 78C

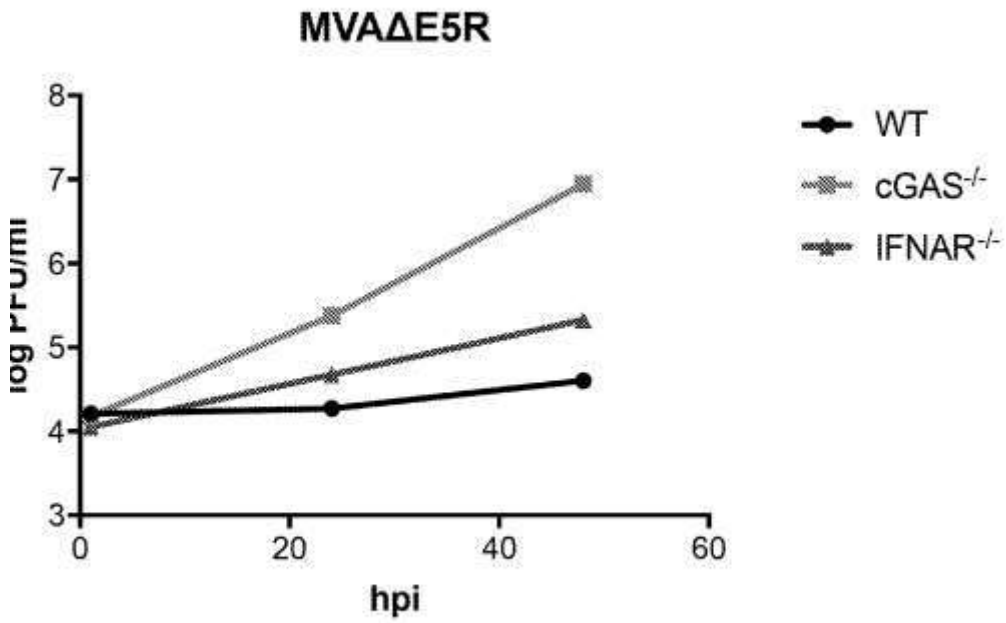


FIG. 78D

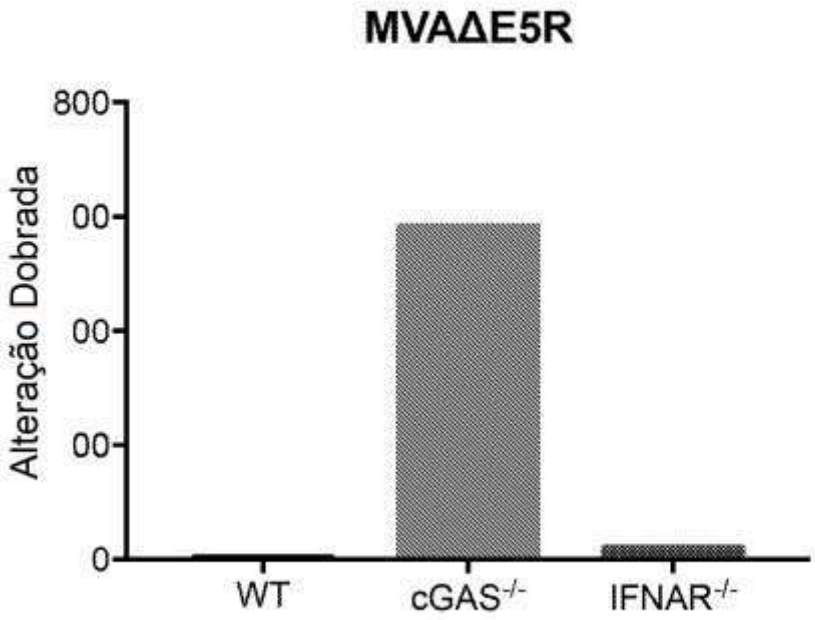


FIG. 78A

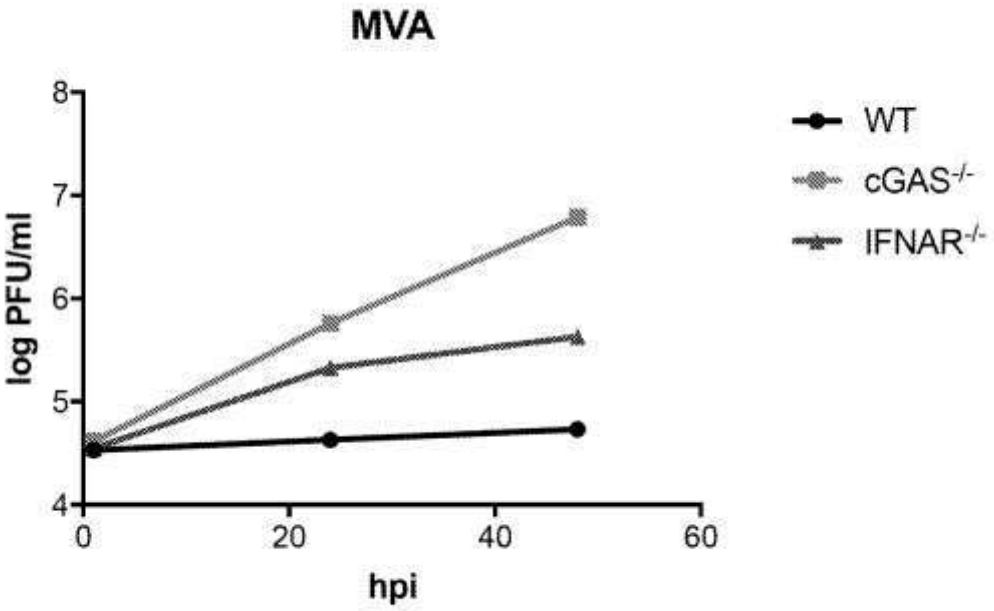


FIG. 78B

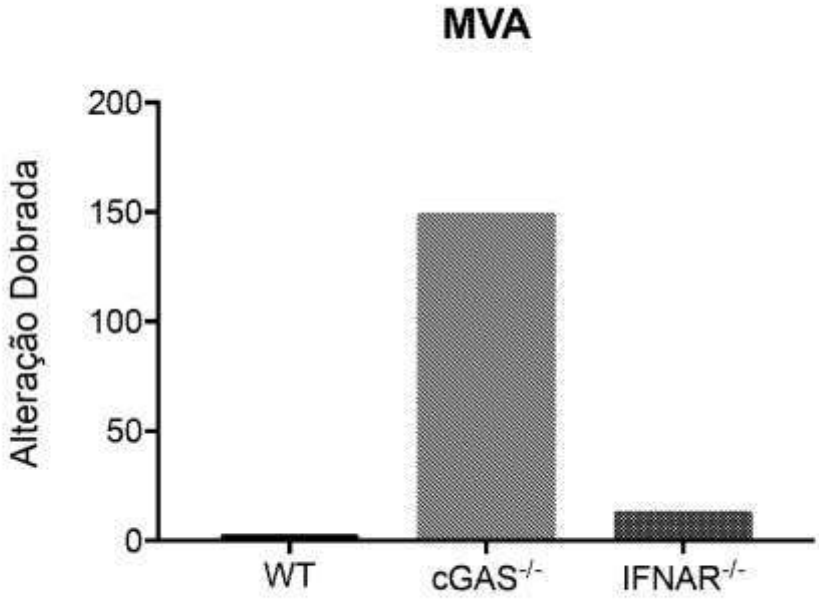


FIG. 79A

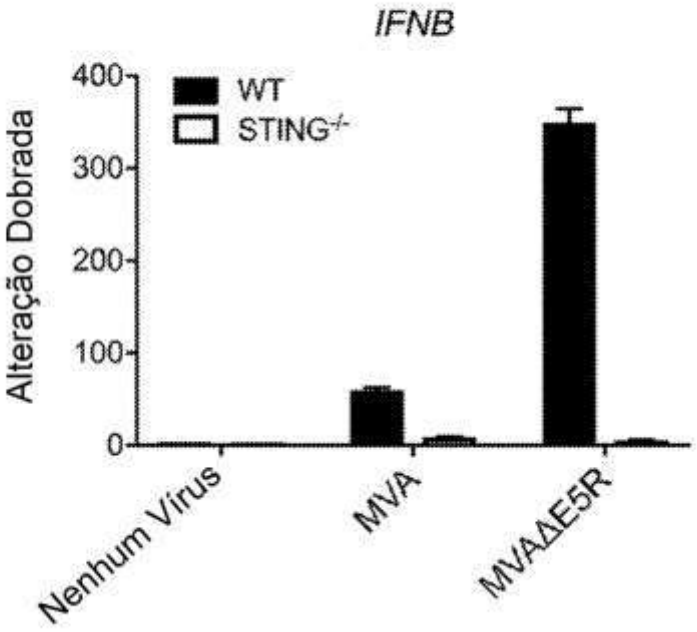


FIG. 79B

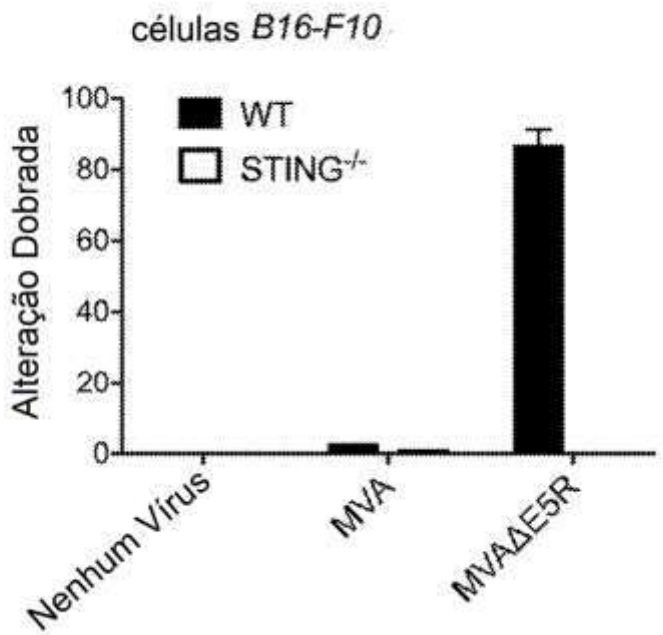


FIG. 80

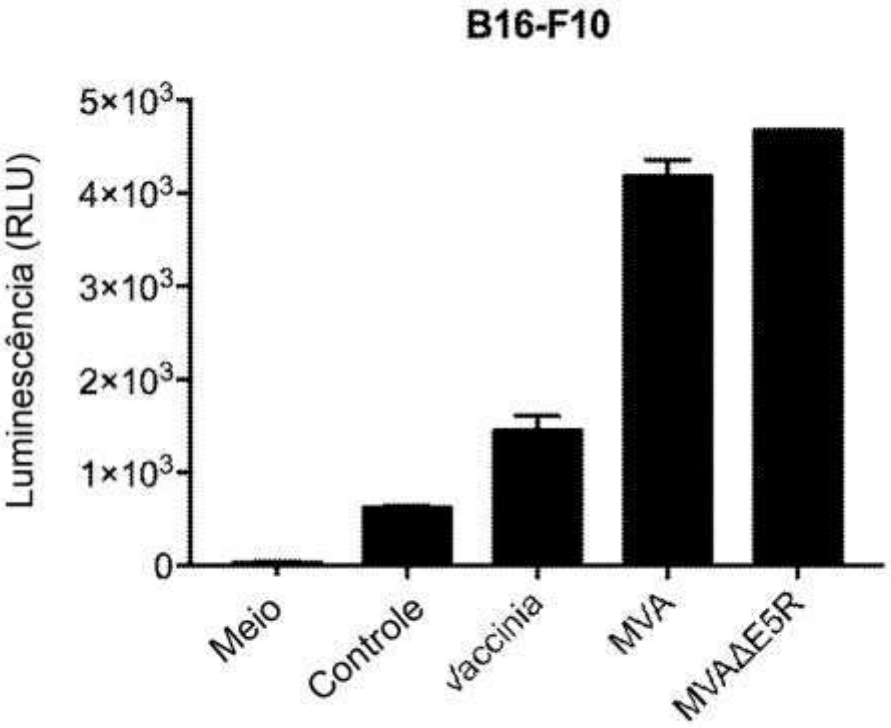

B16-F10
Luminescência (RLU)
5×10³
4×10³
3×10³
2×10³
1×10³
0
Meio
Controle
vaccinia
MVA
MVAΔE5R

FIG. 81

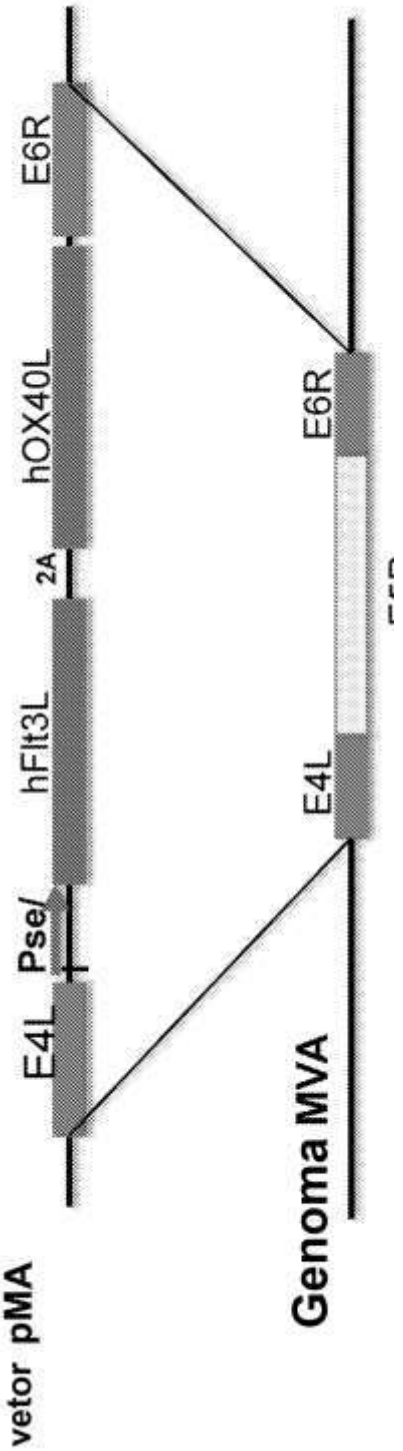


FIG. 82A

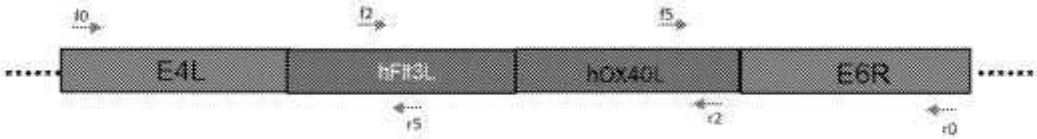
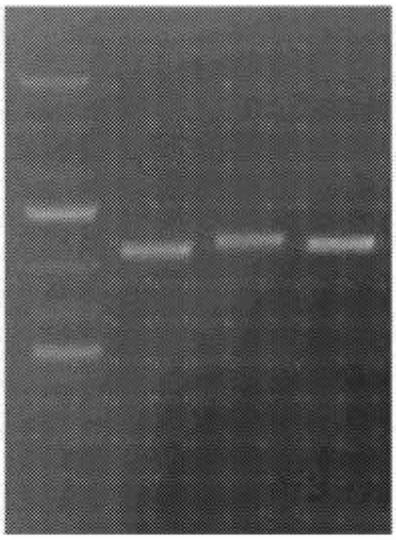


FIG. 82B



Linha	Marcador or par de iniciador de PCT	Tamanho de banda prevista (bp)
1	Fermentas 1kb Plus ladder	20k, 10k, 7k, 5k, 4k, 3k, 2k,1.5k, 1k, 700, 500, 400, 300, 200, 100, 75
2	f0/r5	1120
3	f2/r2	1166
4	f5/r0	1136

FIG. 83A

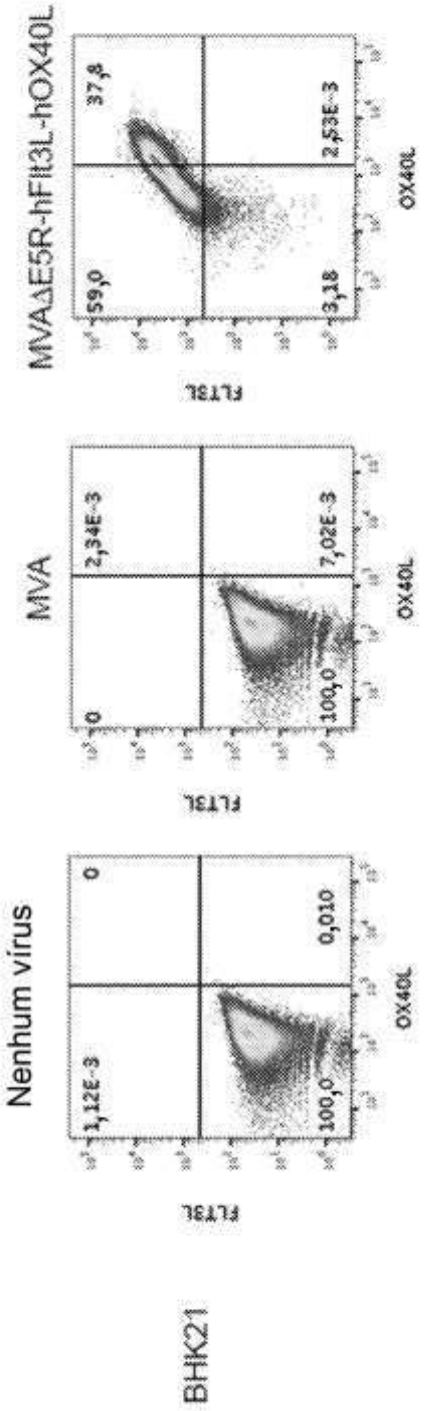

BHK21
Nenhum vírus
MVA
MVAΔE5R-hFlt3L-hOX40L
FLT3L
OX40L
1,12E-3
0
0,010
100,0
2,34E-3
7,02E-3
59,0
3,18
37,8
2,53E-3

FIG. 83B

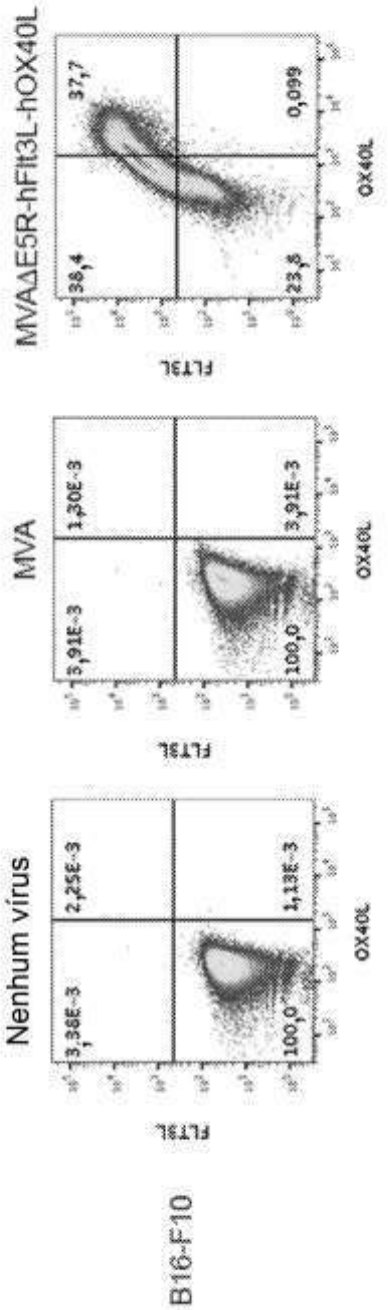

B16-F10
Nenhum vírus
MVA
MVAΔE5R-hFlt3L-hOX40L
FLT3L
OX40L
3,36E-3
2,25E-3
100,0
1,13E-3
5,91E-3
1,30E-3
100,0
3,91E-3
38,4
37,7
23,8
0,099

FIG. 83C

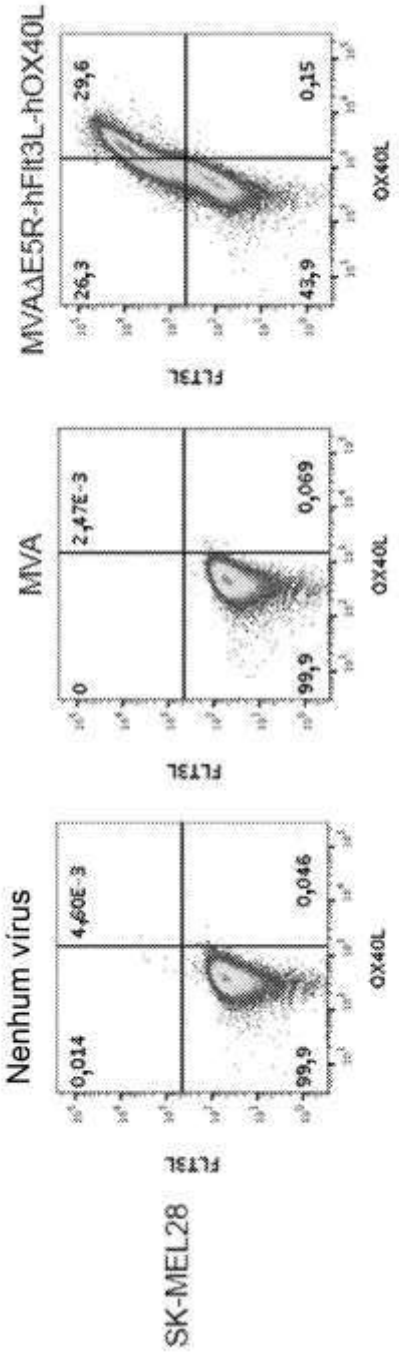
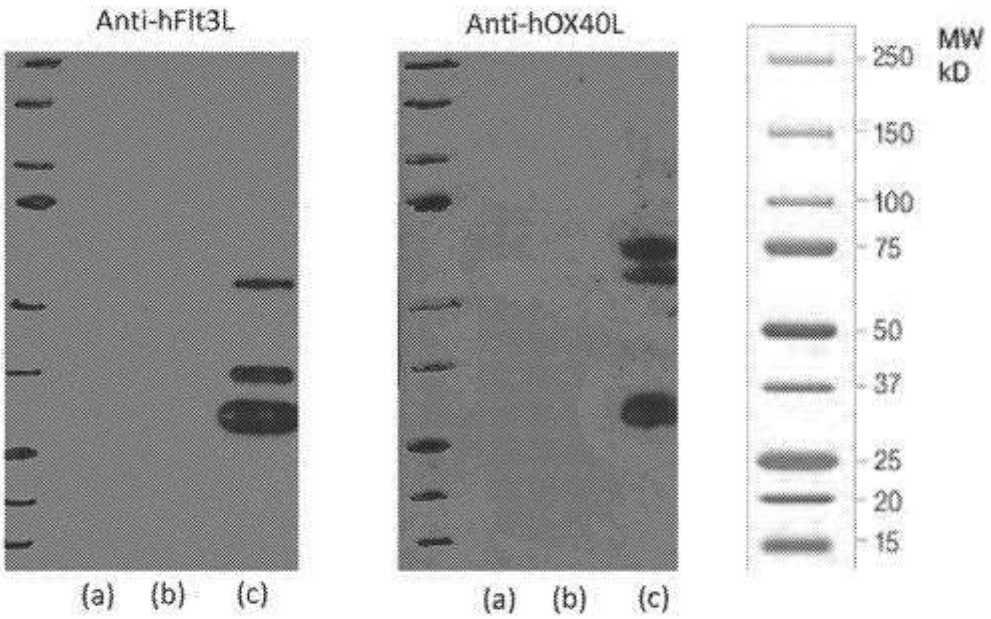

SK-MEL28
Nenhum vírus
MVA
MVAΔE5R-hFlt3L-hOX40L
FLT3L
OX40L
0,014
4,60E-3
99,9
0,046
0
2,47E-3
99,9
0,069
26,3
29,6
43,9
0,15

FIG. 84



Células BHK falsamente infectadas (a) infectadas por MVA (b) ou infectadas por MVAΔE5R-hFlt3L-hOx40L

FIG. 85A

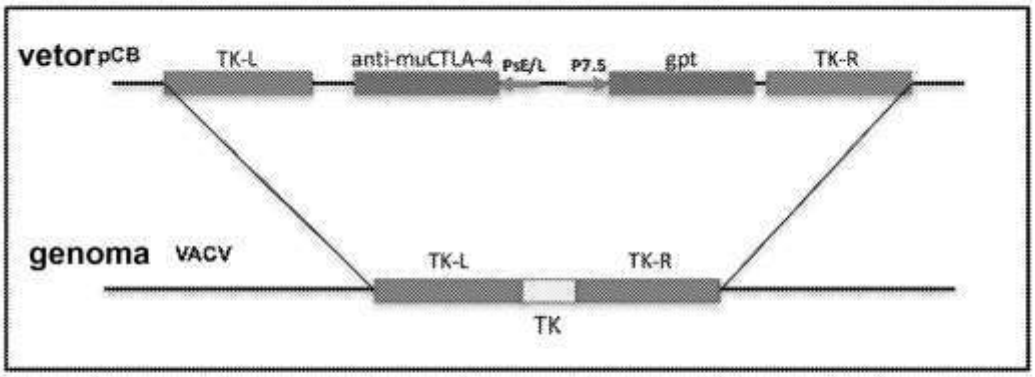


FIG. 85B

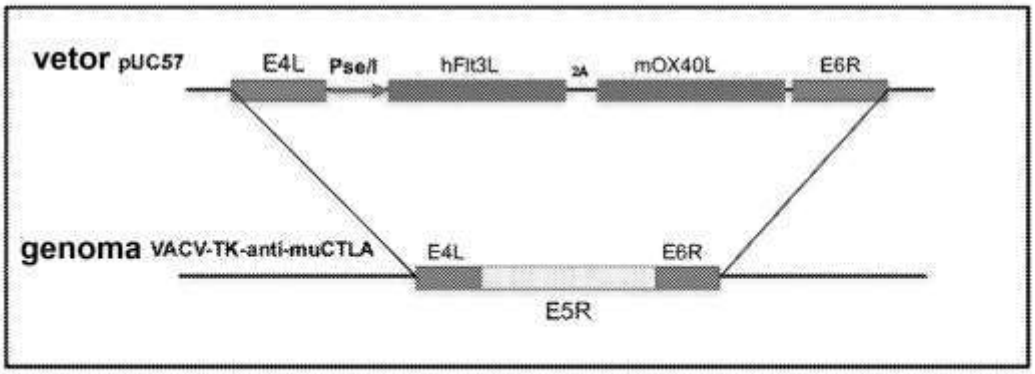


FIG. 86A

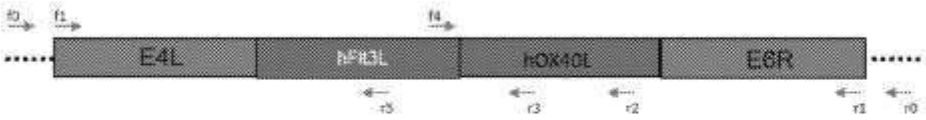
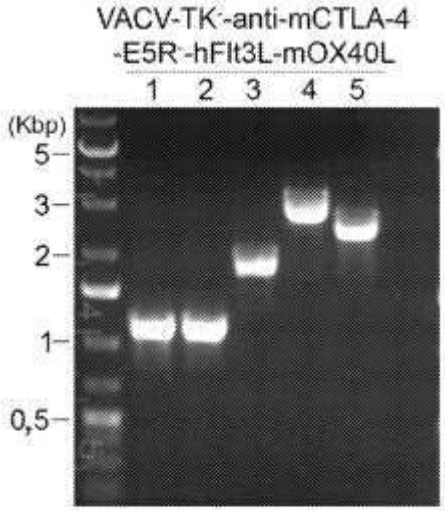
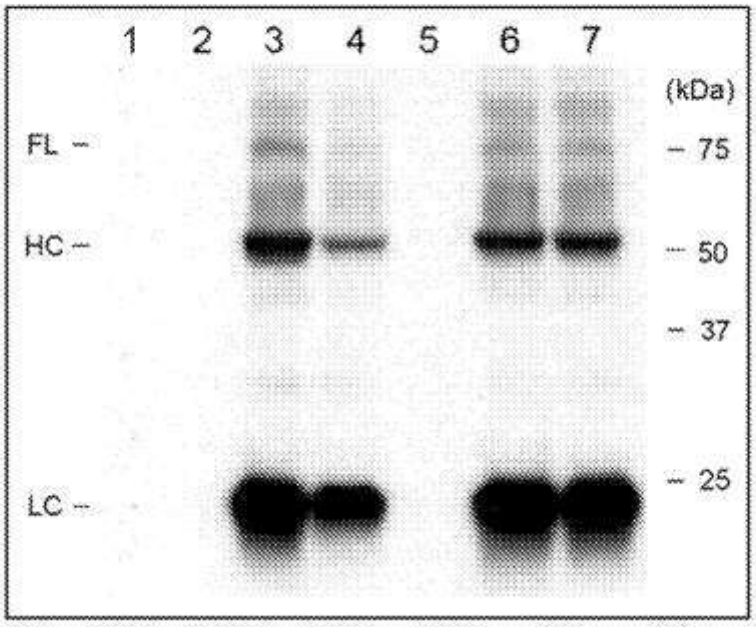


FIG. 86B



Linha	Par de iniciador PCR	tTamanho de banda prevista (bp)
1	f0/r5	1120
2	f1/r3	1171
3	f4/r1	1794
4	f1/r1	2795
5	TK-F5/pCB-R4	2536

FIG. 86C



1. Controle
2. E3LΔ83N-TK$^-$-Vetor
3. E3LΔ83N-TK$^-$-hFlt3L-anti-muCTLA-4
4. E3LΔ83N-TK$^-$-hFlt3L-anti-muCTLA-4-C7L$^-$-mOX40L
5. VACV
6. VACV-TK$^-$-anti-muCTLA-4-C7L$^-$-mOX40L
7. VACV-TK$^-$-anti-muCTLA-4-E5R$^-$-hFlt3L-mOX40L

FIG. 87

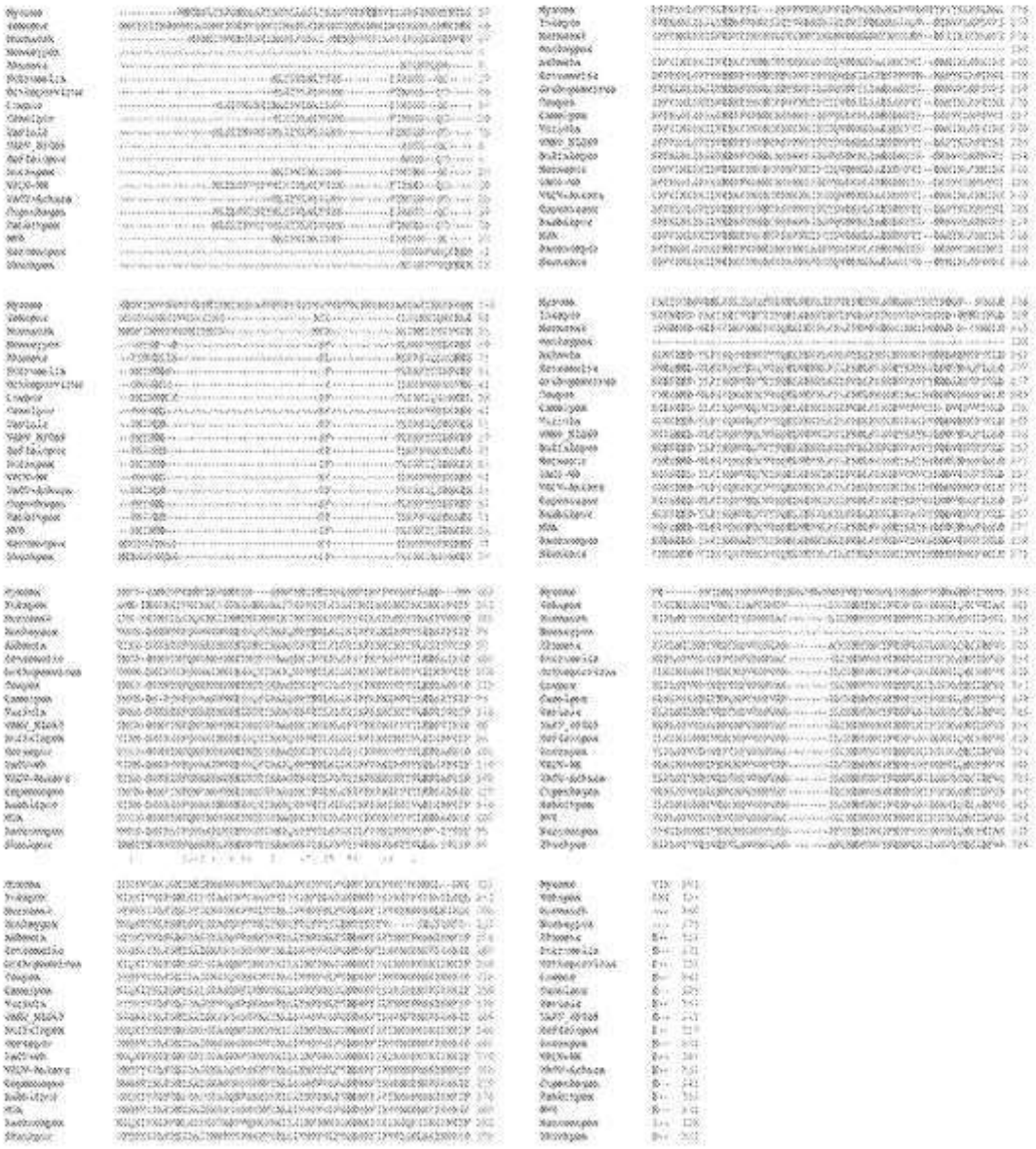


FIG. 88A

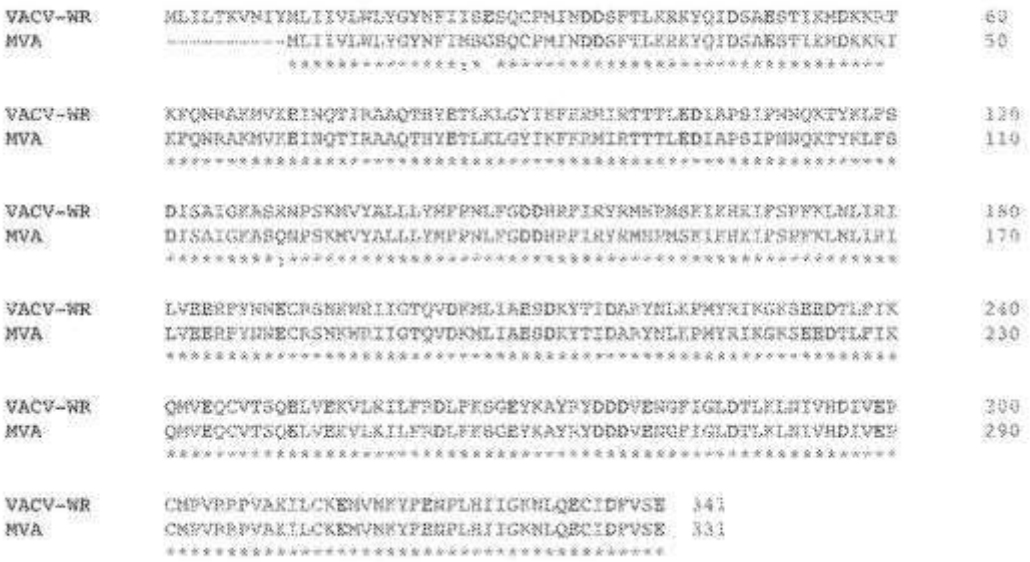

VACV-WR MLILTKVNIYMLIIVLWLYGYNFIISESQCPMINDDSFTLKRKYQIDSAESTIKMDKKRT 60
MVA MLIIVLWLYGYNFIMSGSQCPMINDDSFTLKRKYQIDSAESTLKMDKKKI 50
VACV-WR KFQNRAKMVKEINQTIRAAQTHYETLKLGYIEFEMIKTTTLEDIAPSIPNNQKTYKLFS 120
MVA KFQNRAKMVKEINQTIRAAQTHYETLKLGYIKFEMIRTTTLEDIAPSIPNNQKTYKLFS 110
VACV-WR DISAIGKASKNPSKMVYALLLYMFPNLFGDDHRFIKYKMNPMSKIKHKIPSFFKLMLIRI 180
MVA DISAIGKASQNPSKMVYALLLYMFPNLFGDDHPFIKYKMNPMSKIFHKIPSFFKLMLIFI 170
VACV-WR LVEERFYNNECKSNKWRIIGTQVDKMLIAESDKYTIDARYNLKPMYRIKGKSEEDTLFIK 240
MVA LVEERFYNNECKSNKWRIIGTQVDKMLIAESDKYTIDARYNLKPMYRIKGKSEEDTLFIK 230
VACV-WR QMVEQCVTSQELVEKVLKILFRDLFKSGEYKAYFYDDDVENGFIGLDTLKLMIVHDIVEP 300
MVA QMVEQCVTSQELVEKVLKILFRDLFKSGEYKAYKYDDDVENGFIGLDTLKLMIVHDIVEP 290
VACV-WR CNFVRPPVAKILCKEMVNKYPENPLHIIGKNLQECIDFVSE 341
MVA CNFVRPPVAKILCKEMVNKYPENPLHIIGKNLQECIDFVSE 331

FIG. 88B

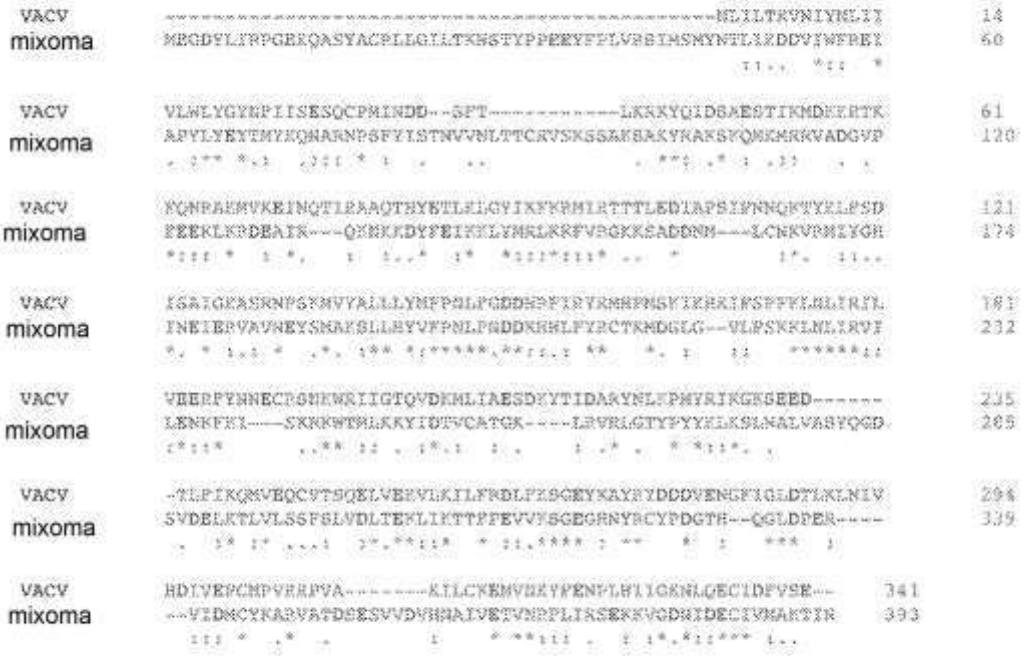

VACV
mixoma
VACV
mixoma
VACV
mixoma
VACV
mixoma
VACV
mixoma
VACV
mixoma
VACV
mixoma

FIG. 89A

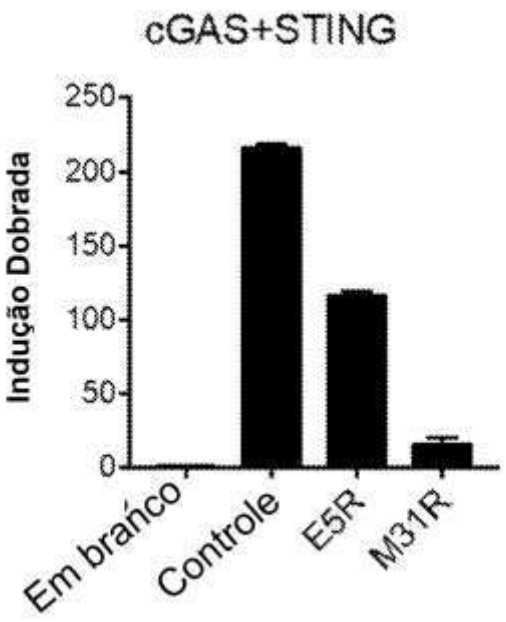


FIG. 89B

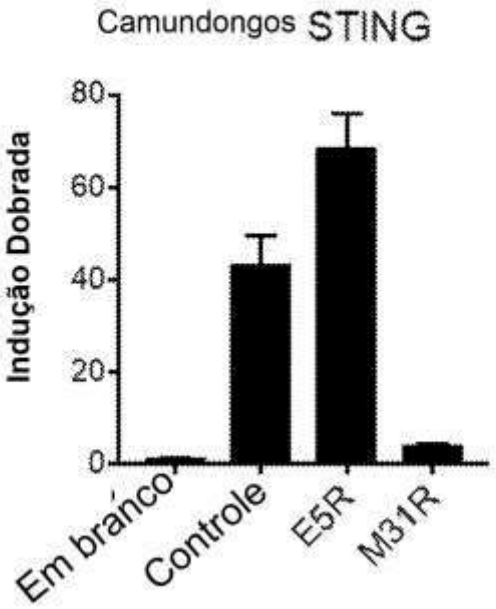


FIG. 90A

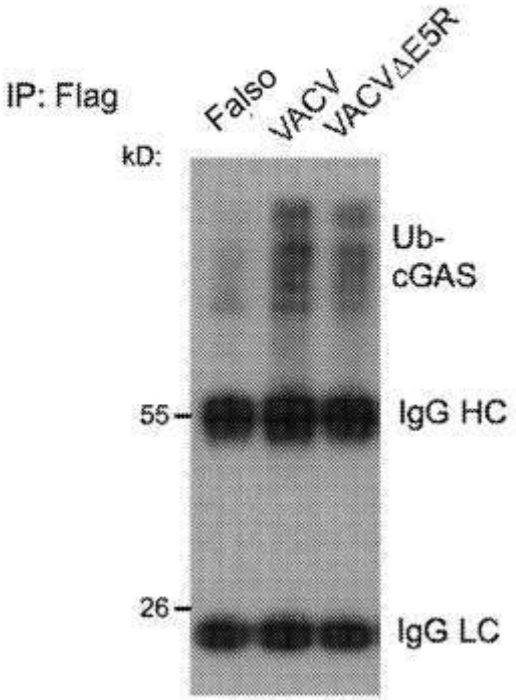


FIG. 90B

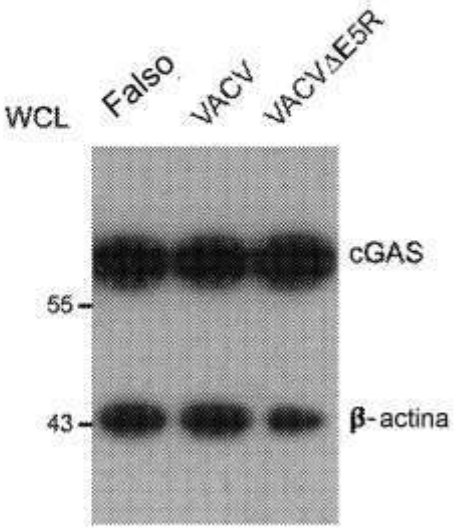


FIG. 91A

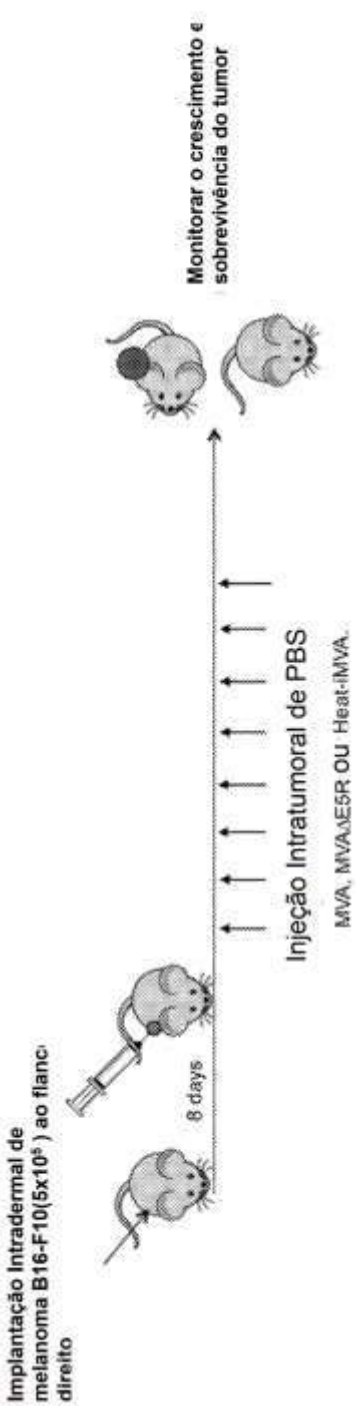

Implantação Intradermal de melanoma B16-F10(5x10⁵) ao flanc direito
8 days
Injeção Intratumoral de PBS
MVA, MVAΔE5R ou Heat-iMVA
Monitorar o crescimento e sobrevivência do tumor

FIG. 91B

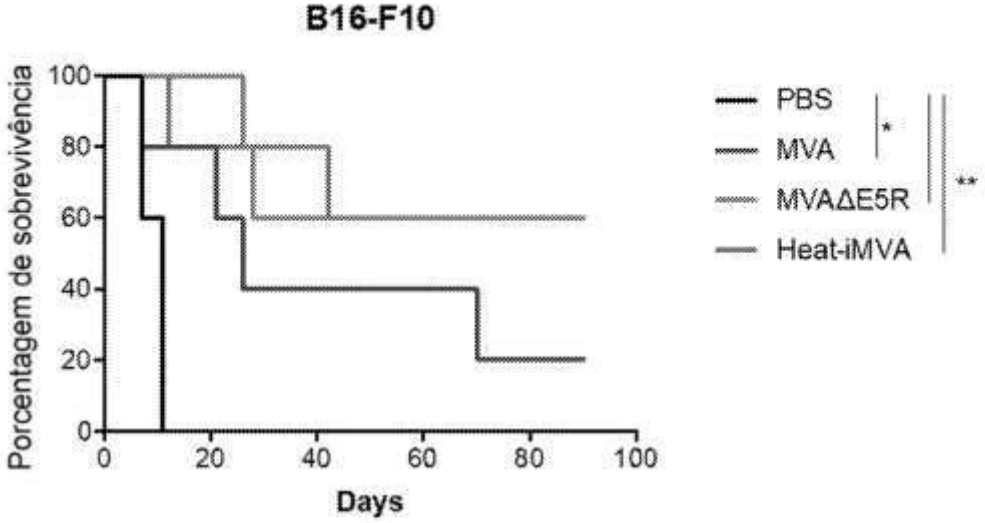


FIG. 91C

PBS	MVA	MVAΔE5R	MVA
11	26	Indefinido	Indefinido

FIG. 92A

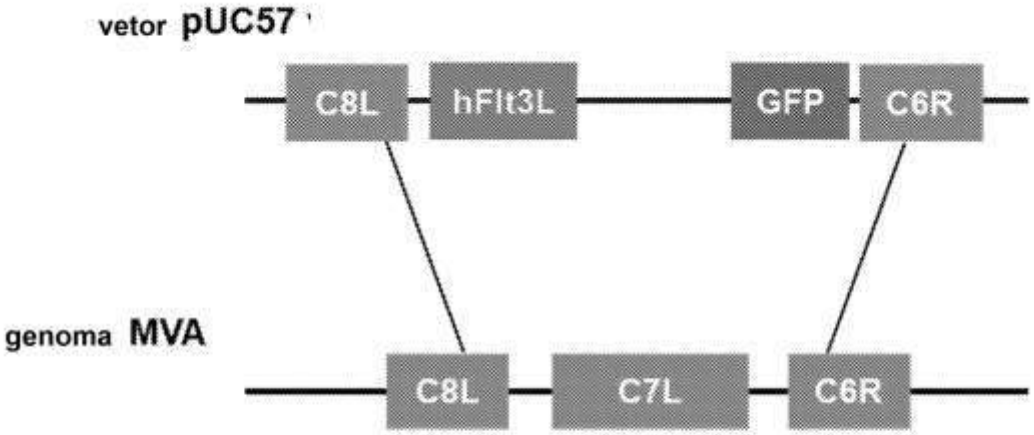


FIG. 92B

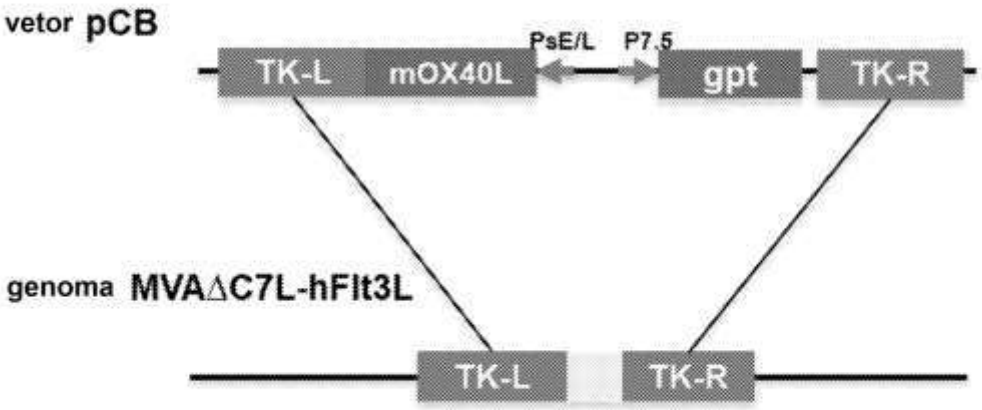


FIG. 92C

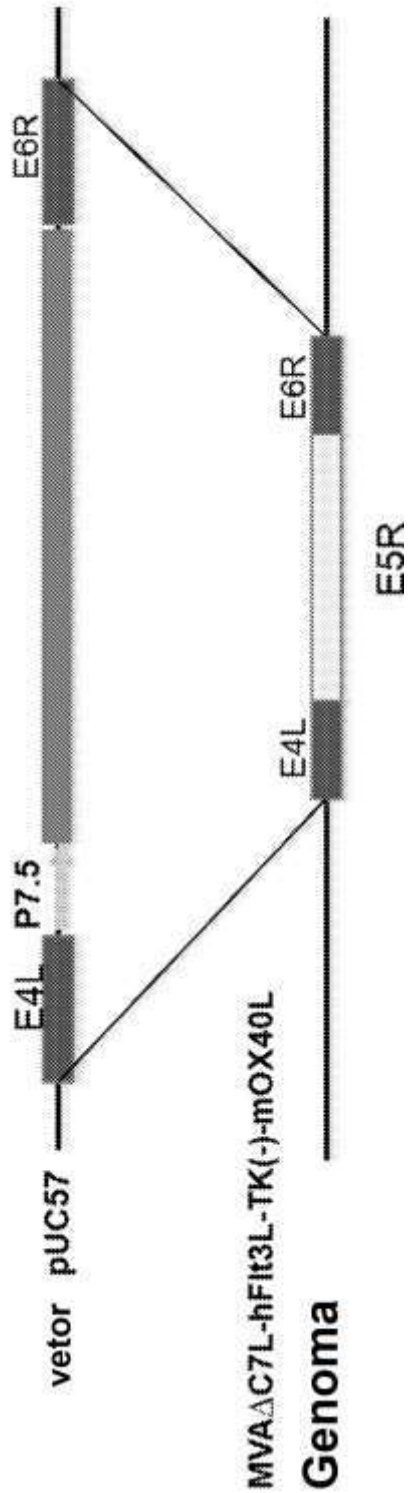

E6R
E6R
E5R
E4L
P7.5
E4L
vetor pUC57
MVAΔC7L-hFlt3L-TK(-)-mOX40L
Genoma

FIG. 92D

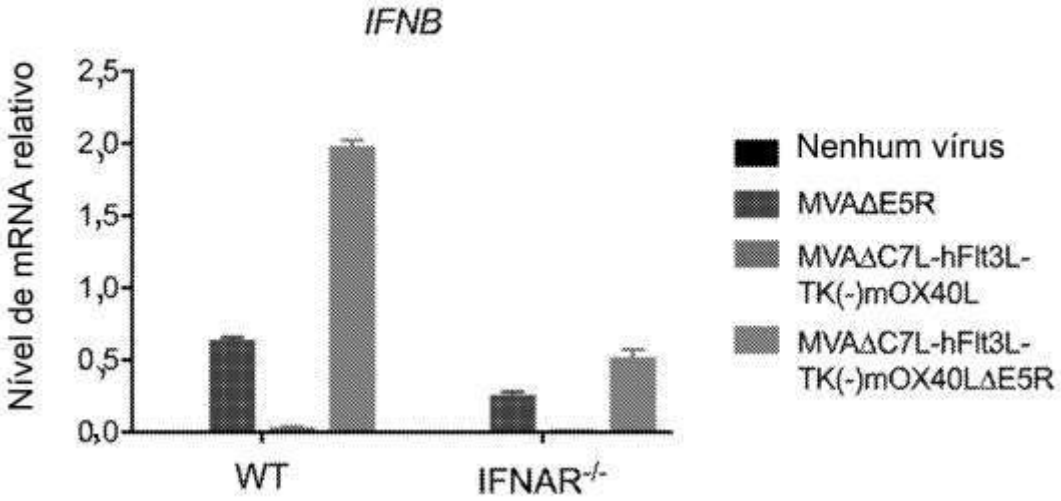


FIG. 92E

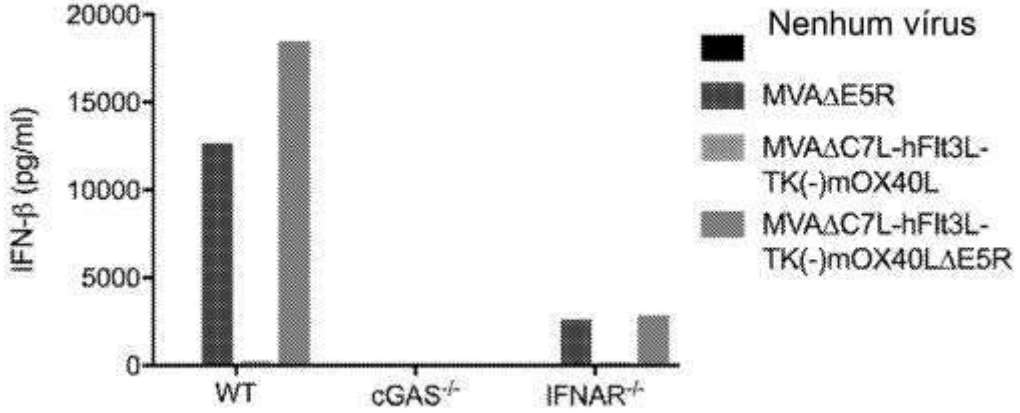


FIG. 93A

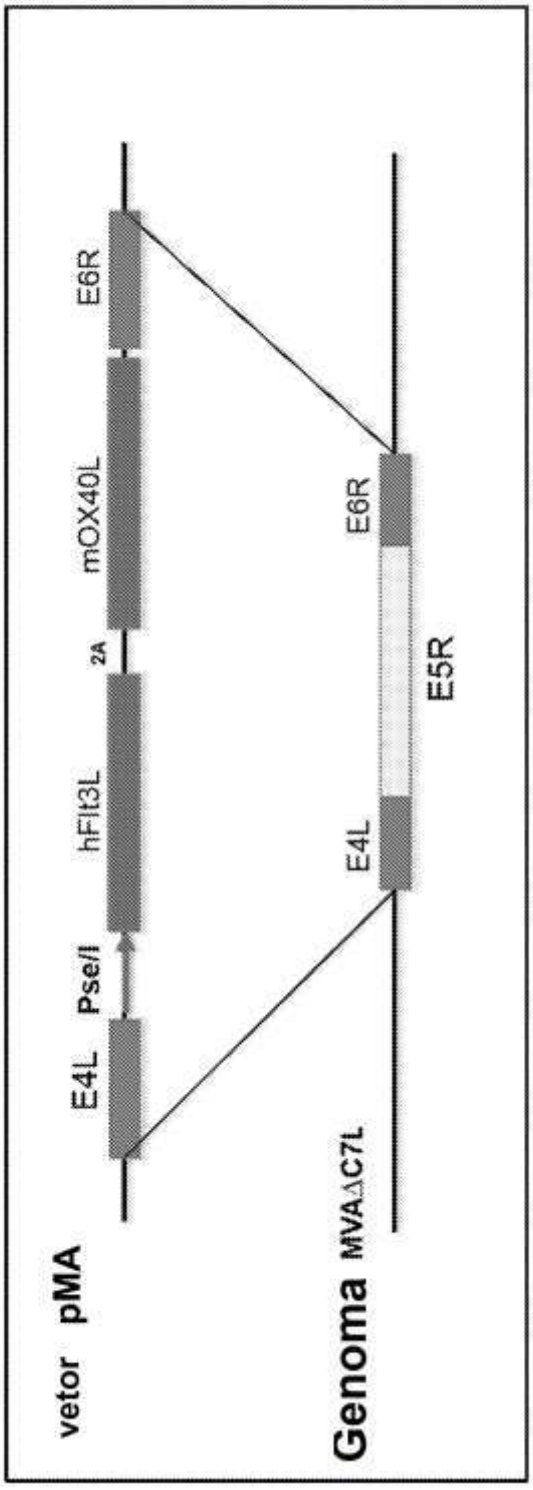

vetor pMA
E4L
Pse/I
hFlt3L
2A
mOX40L
E6R
Genoma MVAΔC7L
E4L
E5R
E6R

FIG. 93B

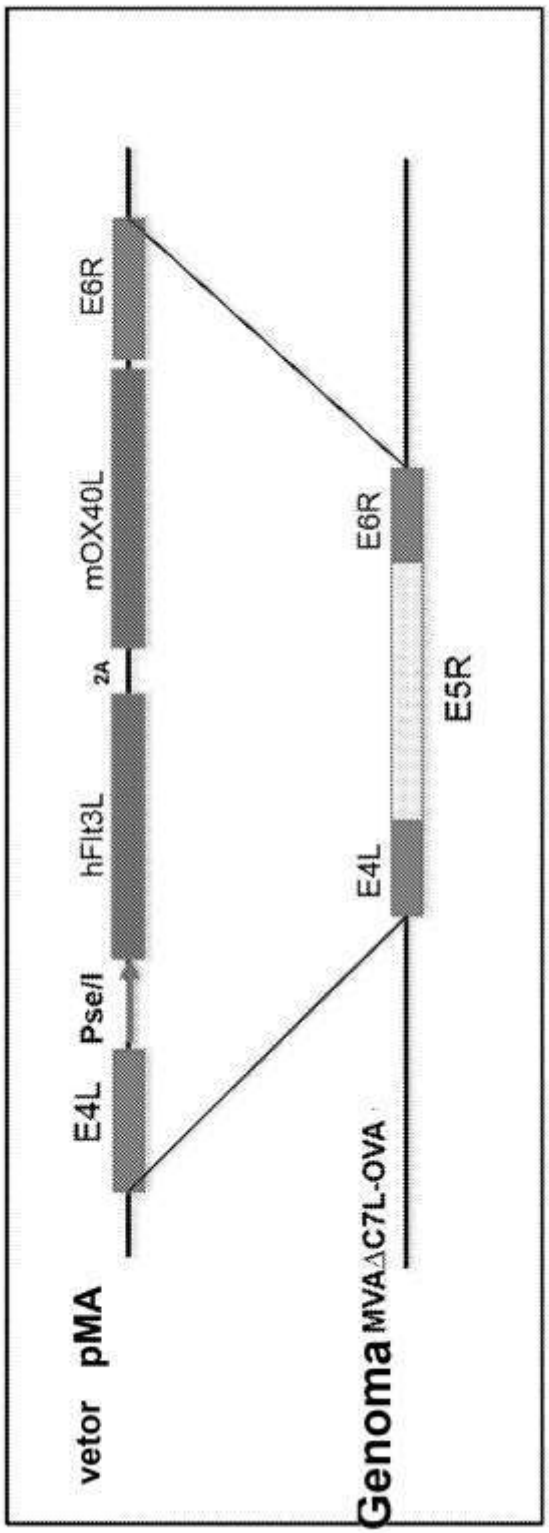

vetor pMA
E4L
PseII
hFlt3L
2A
mOX40L
E6R
Genoma MVAΔC7L-OVA
E4L
E5R
E6R

FIG. 94A

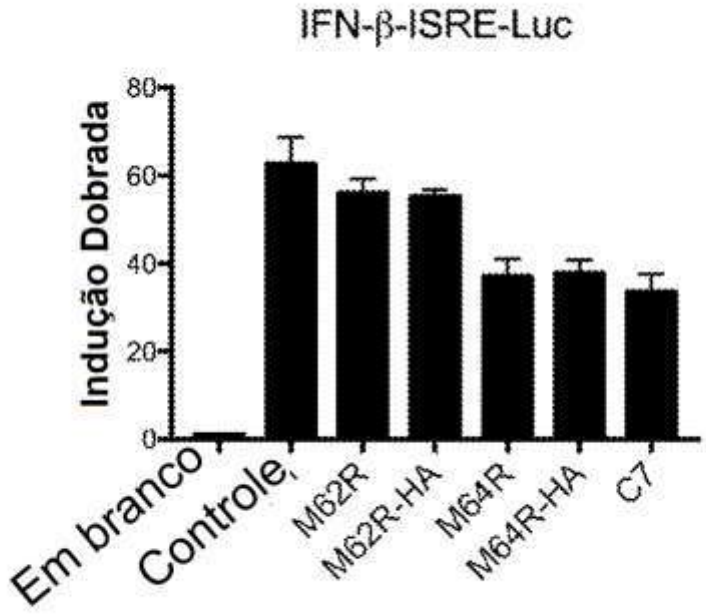


FIG. 94B

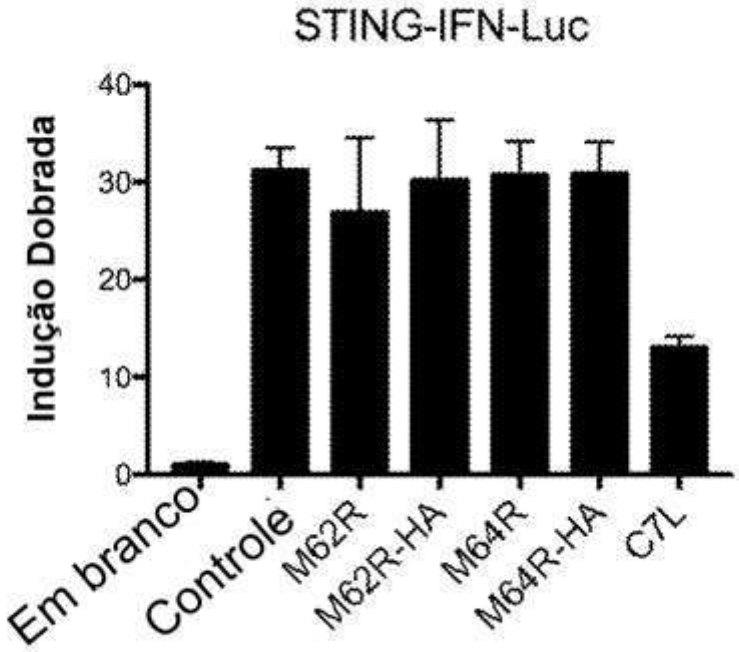


FIG. 95

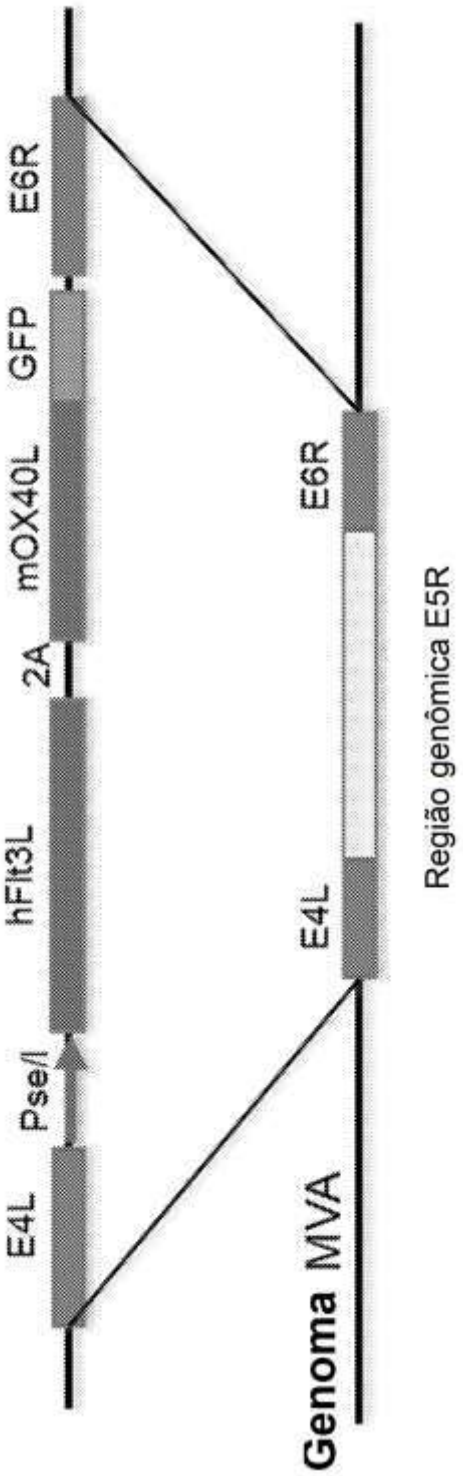

E6R
GFP
mOX40L
2A
hFlt3L
PseII
E4L
Genoma MVA
E6R
E4L
Região genômica E5R

FIG. 96A

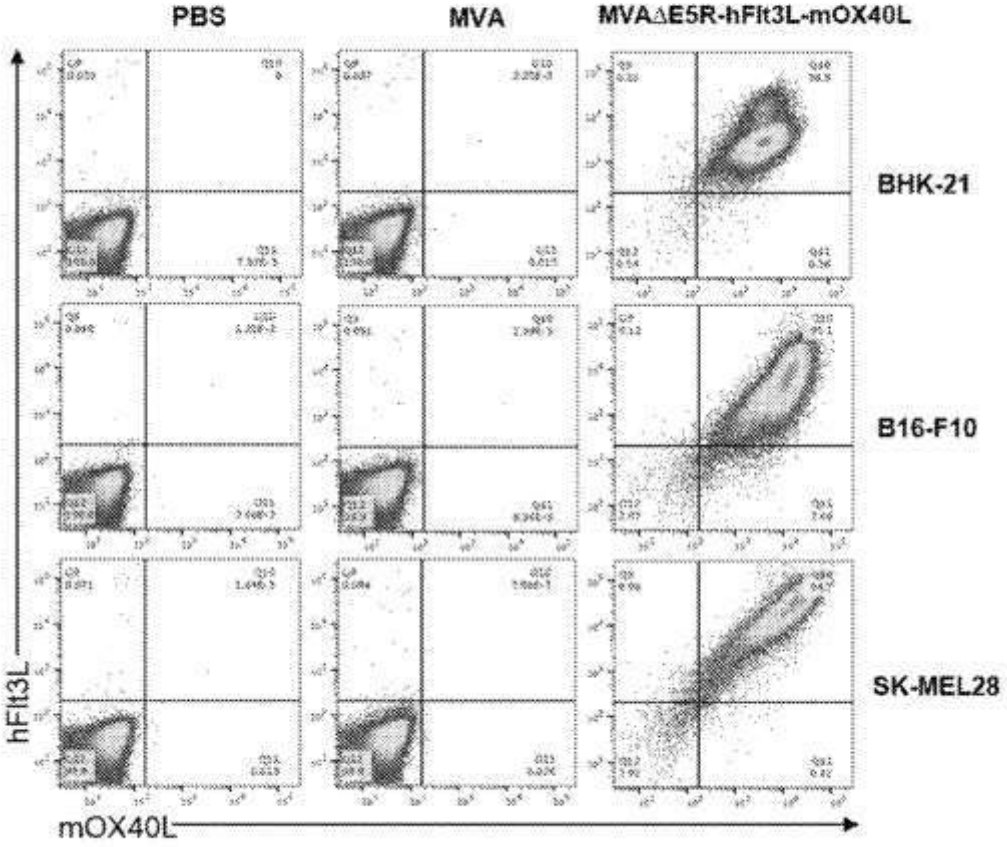

PBS
MVA
MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L
BHK-21
B16-F10
SK-MEL28
hFlt3L
mOX40L

FIG. 96B

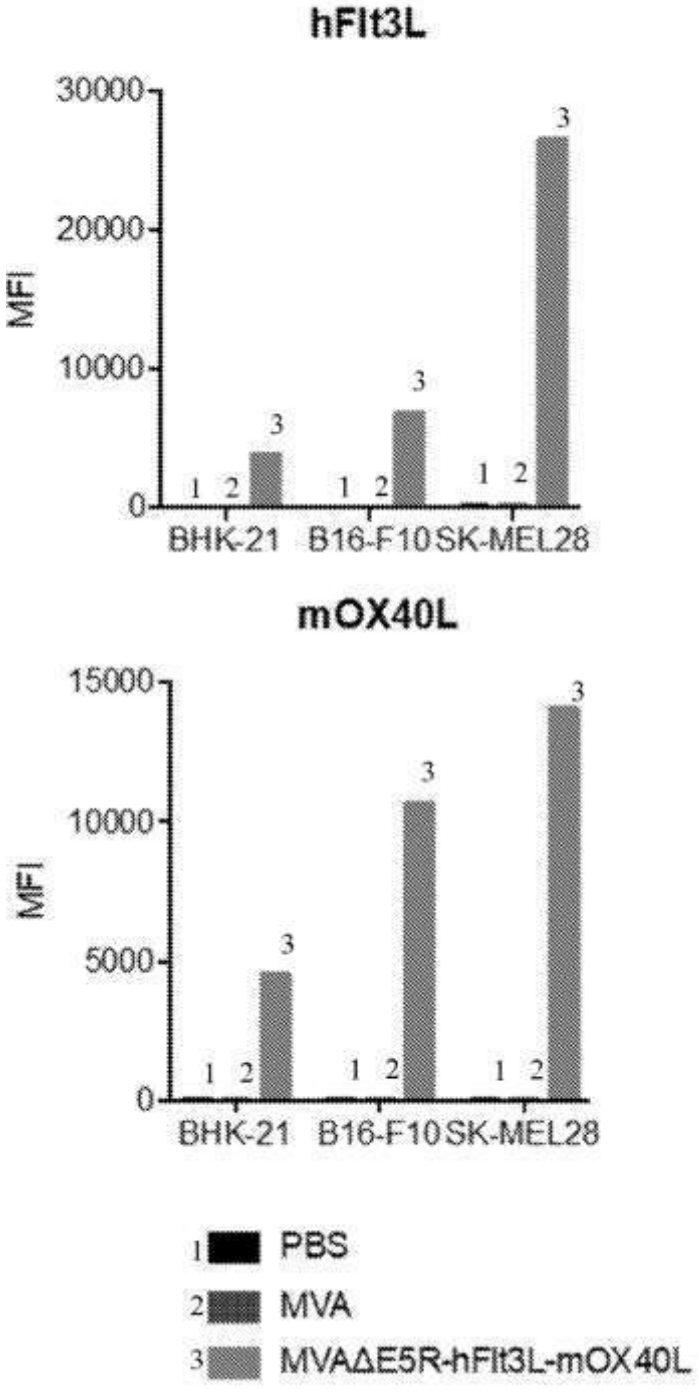

hFlt3L
30000
20000
10000
0
MFI
1 2 3
1 2 3
1 2 3
BHK-21
B16-F10
SK-MEL28
mOX40L
15000
10000
5000
0
MFI
1 2 3
1 2 3
1 2 3
BHK-21
B16-F10
SK-MEL28
1 PBS
2 MVA
3 MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L

FIG. 97

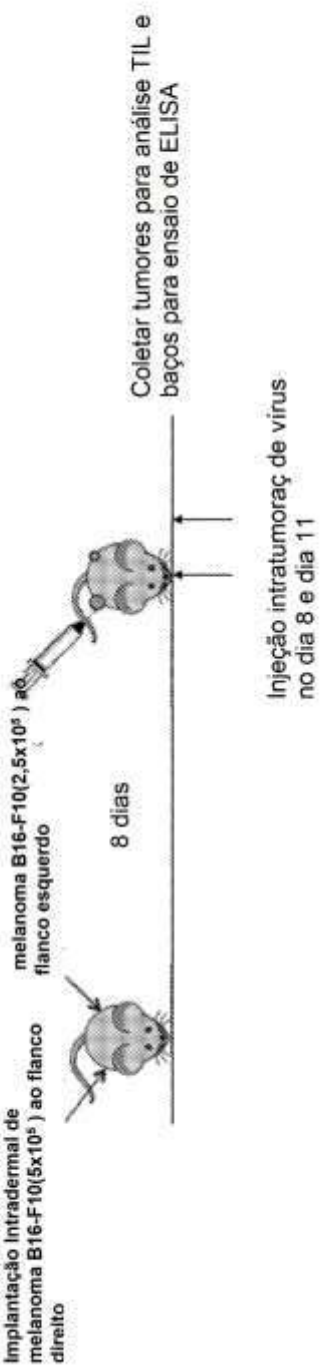

Implantação Intradermal de melanoma B16-F10(5x10⁵) ao flanco direito
melanoma B16-F10(2,5x10⁵) ao flanco esquerdo
8 dias
Injeção intratumoraç de vírus no dia 8 e dia 11
Coletar tumores para análise TIL e baços para ensaio de ELISA

FIG. 98A

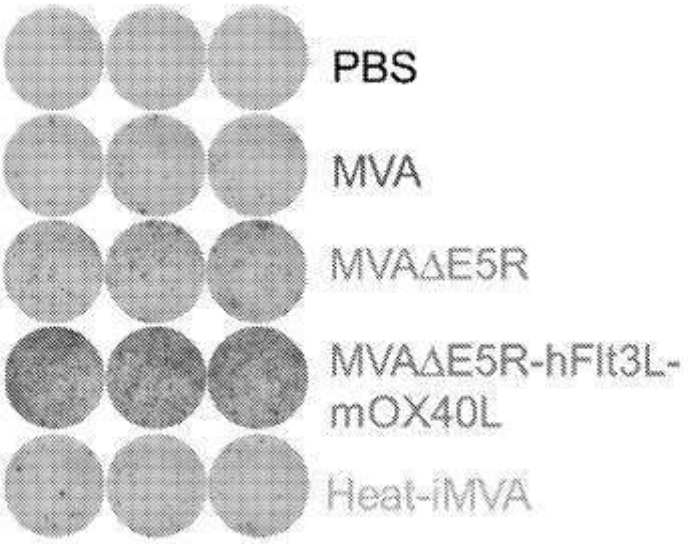


FIG. 98B

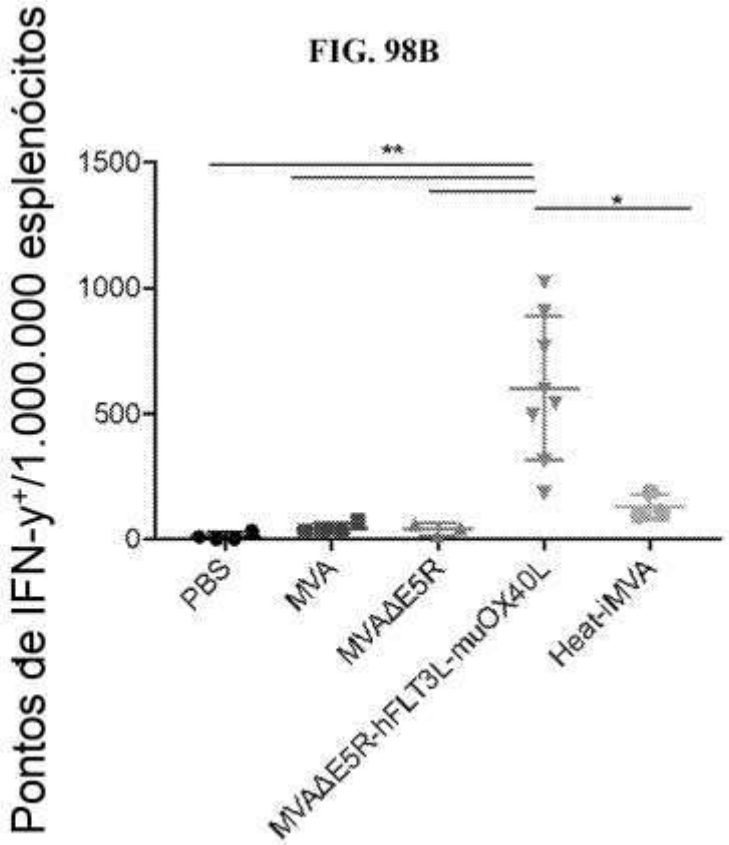


FIG. 99A

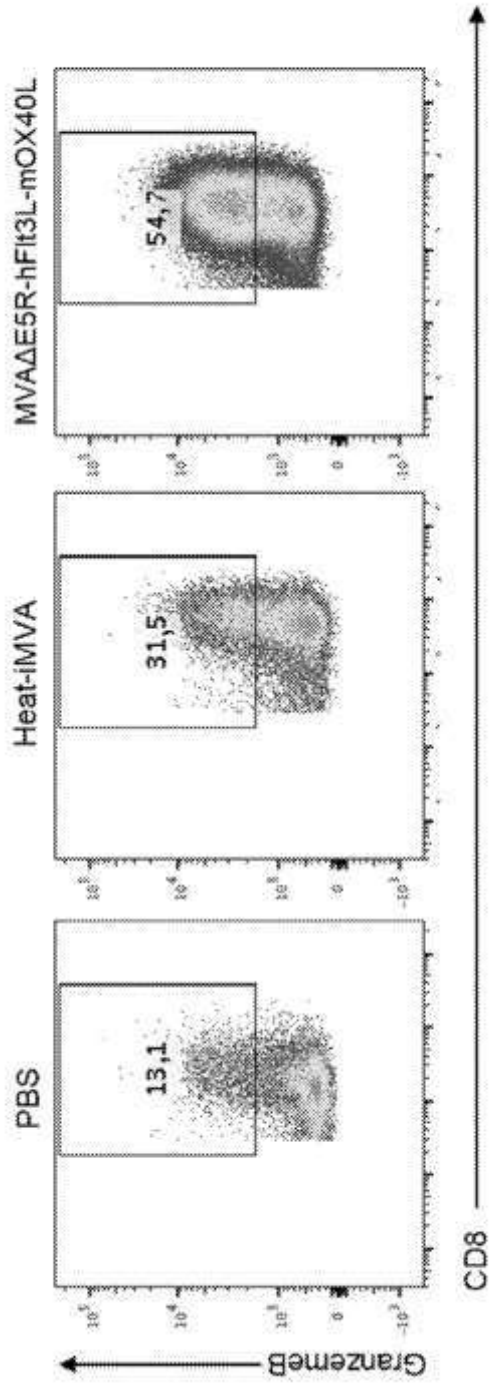

MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L
54,7
Heat-iMVA
31,5
PBS
13,1
Granzeme B
CD8

FIG. 99B

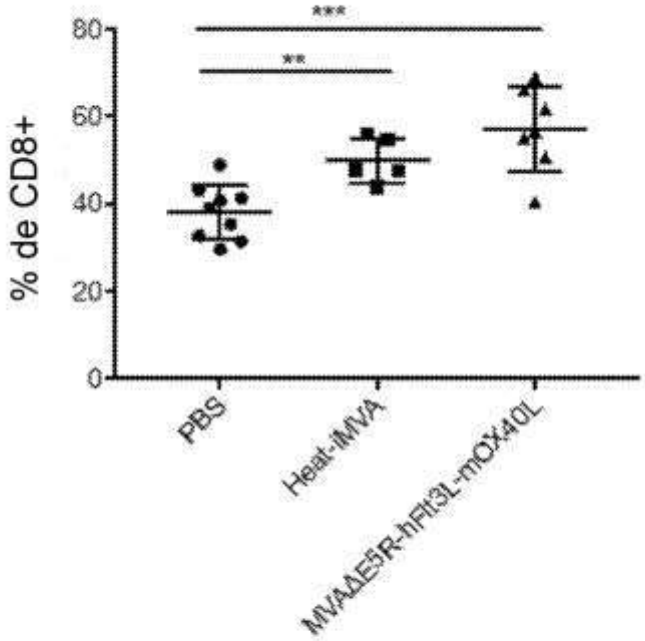


FIG. 99C

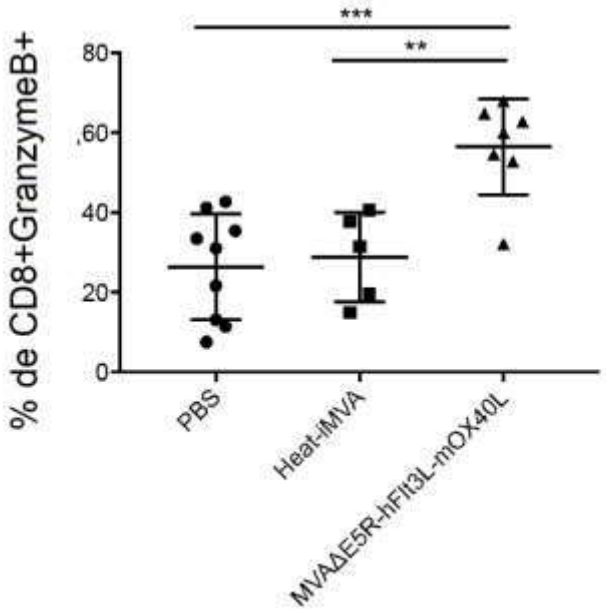


FIG. 100A

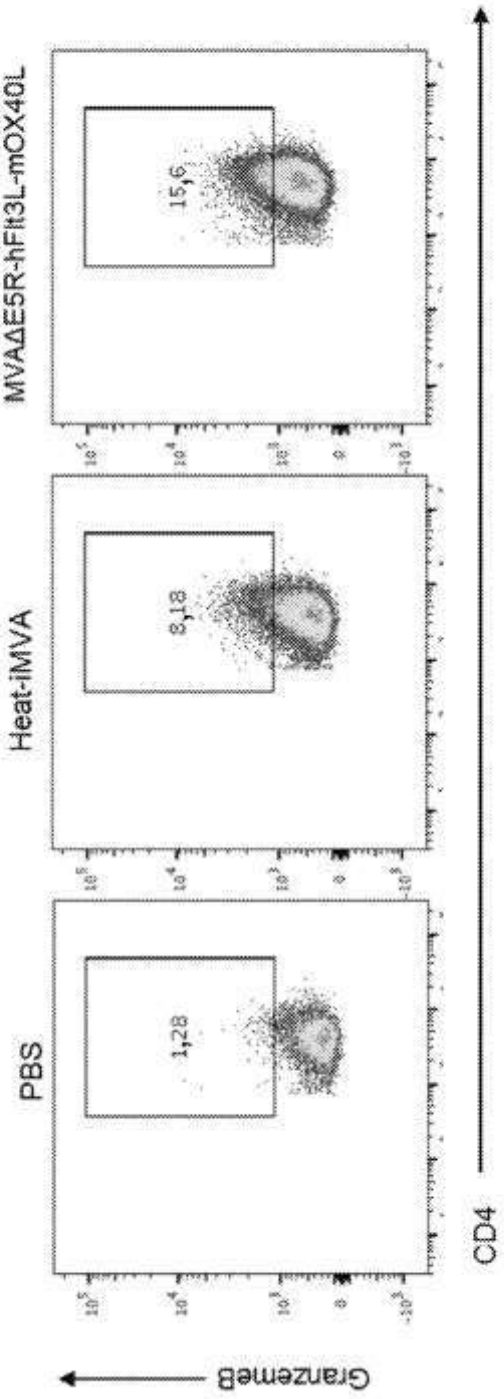

MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L
15,6
Heat-iMVA
8,18
PBS
1,28
Granzeme B
CD4

FIG. 100B

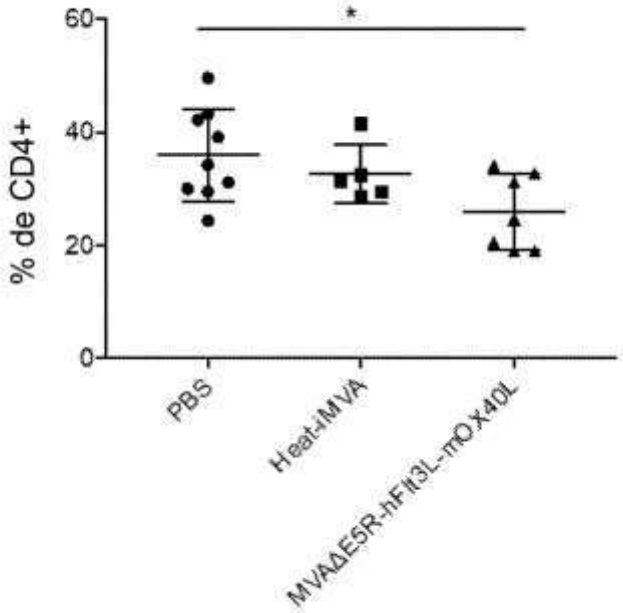


FIG. 100C

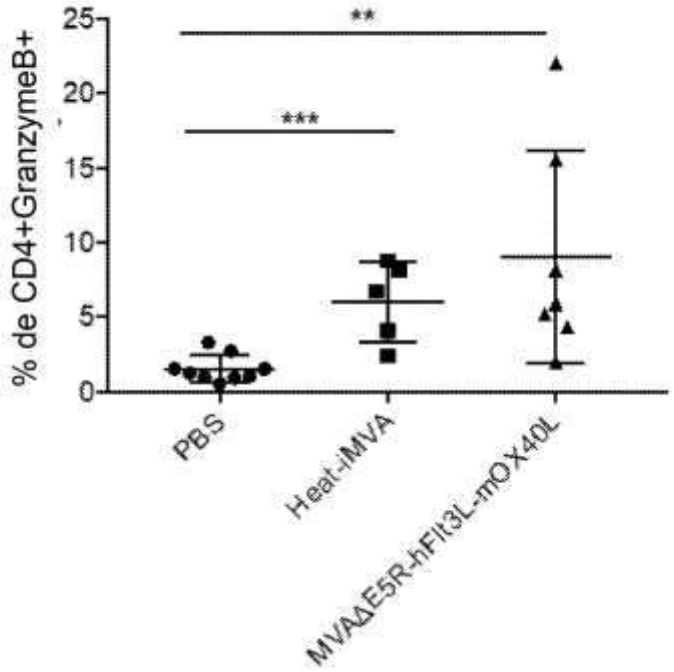


FIG. 101A

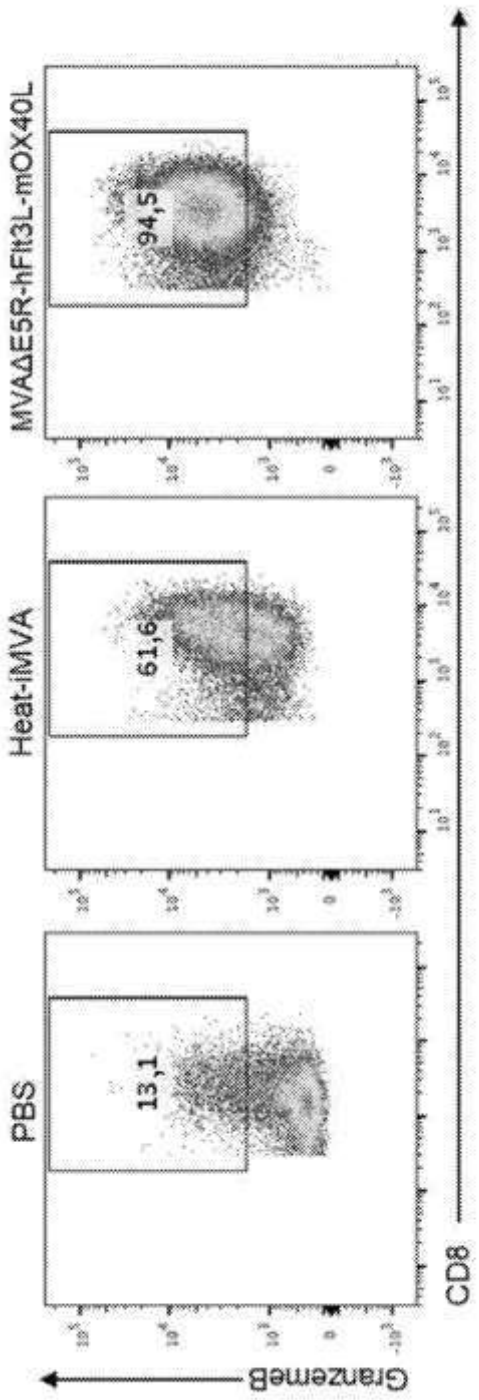

MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L
94,5
Heat-iMVA
61,6
PBS
13,1
GranzemeB
CD8

FIG. 101B

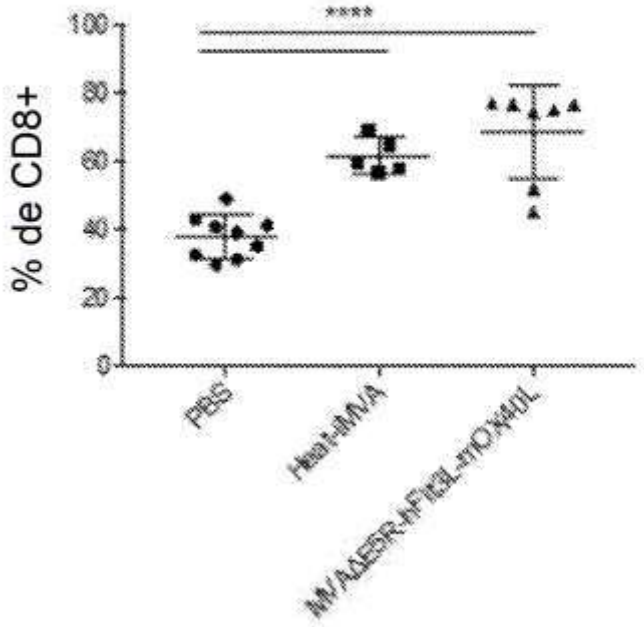


FIG. 101C

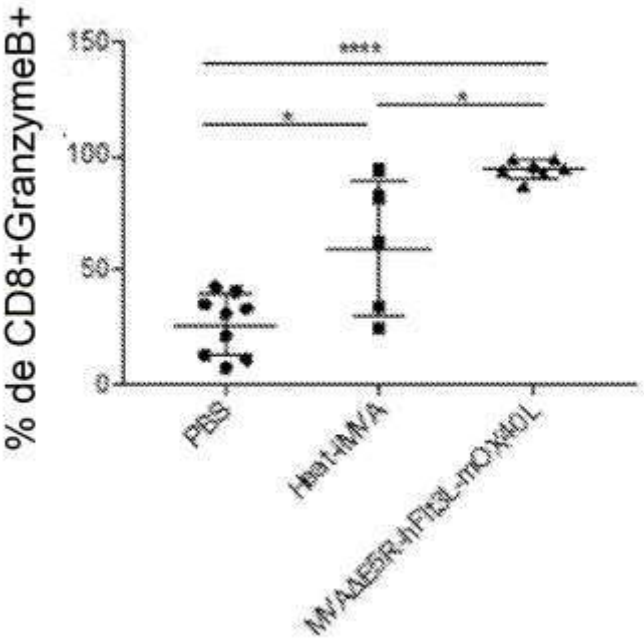


FIG. 102A

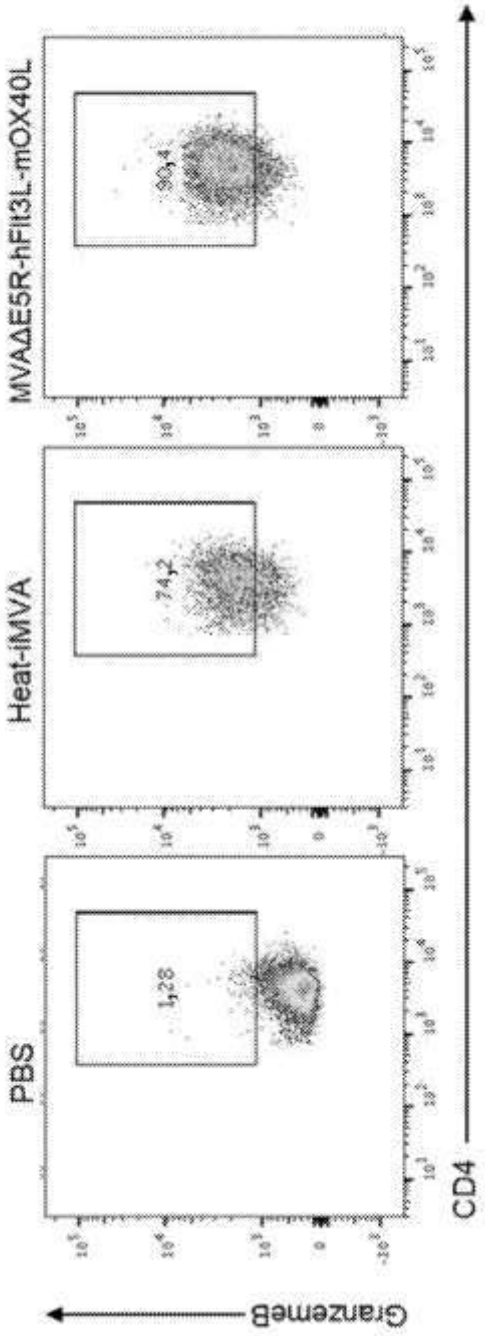

MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L
Heat-iMVA
PBS
1,28
74,2
30,4
GranzemeB
CD4

FIG. 102B

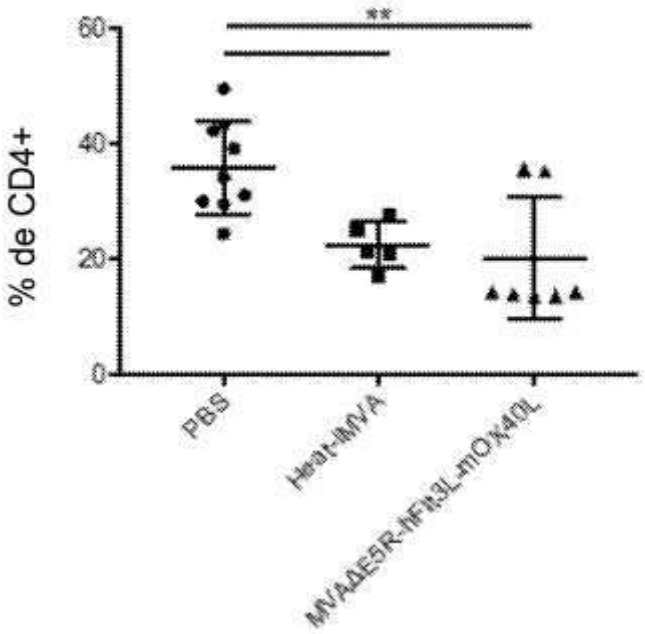


FIG. 102C

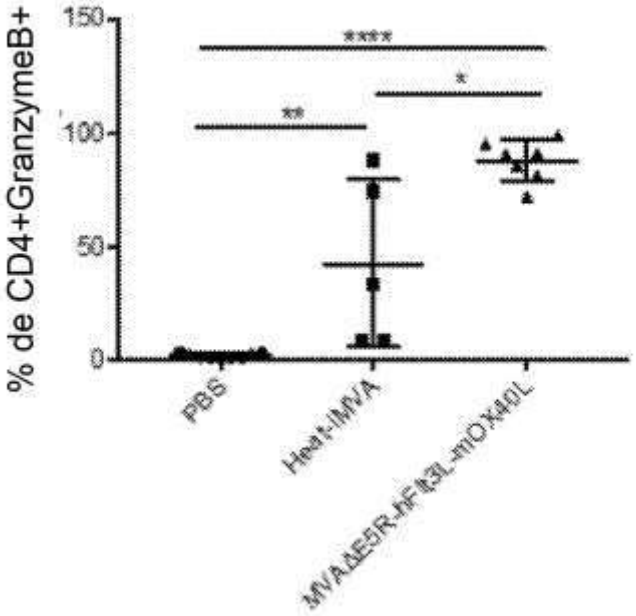


FIG. 103A

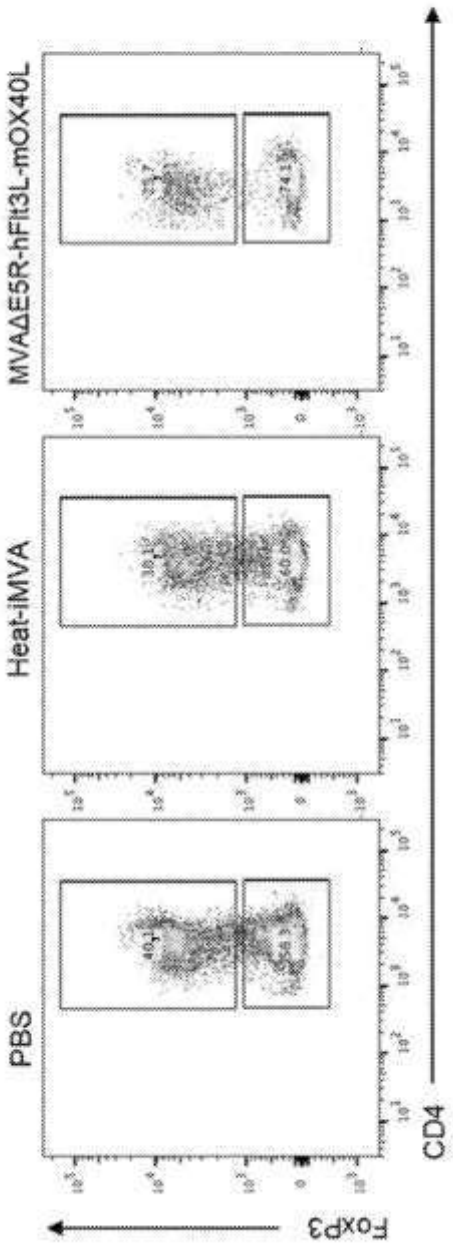


FIG. 103B

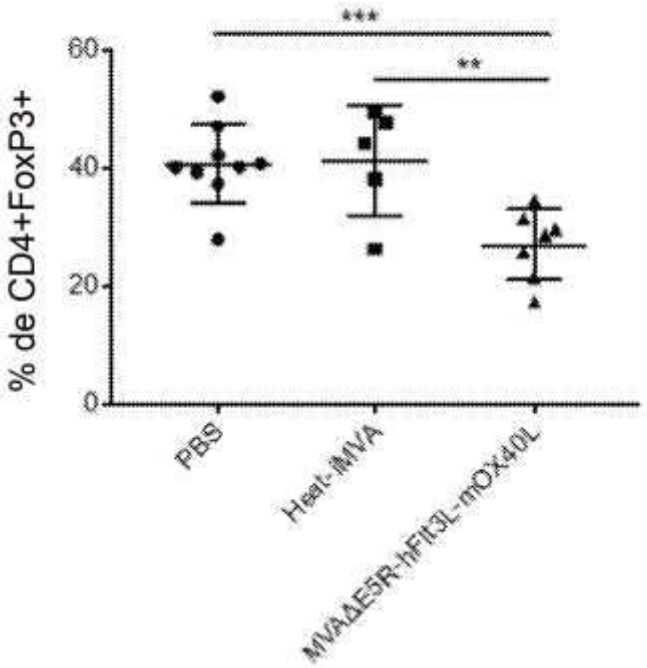


FIG. 103C

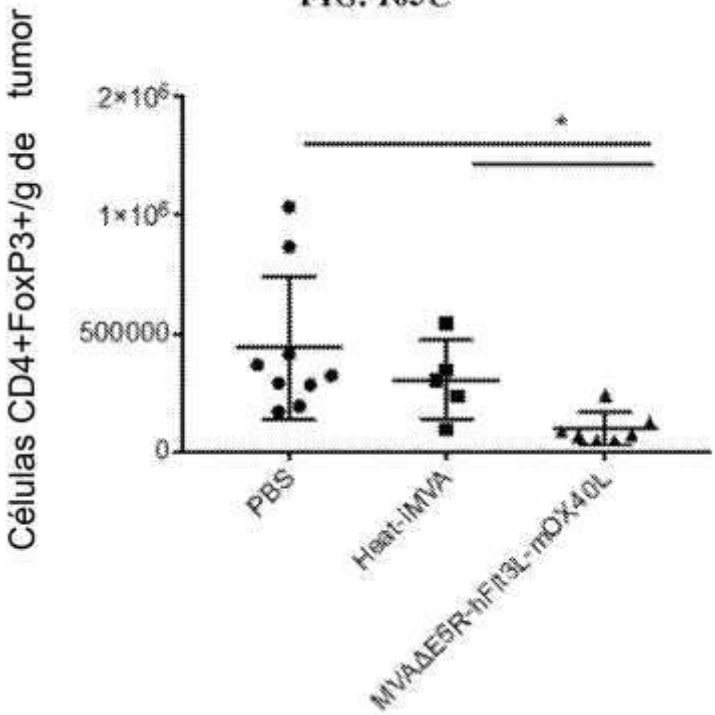


FIG. 104A

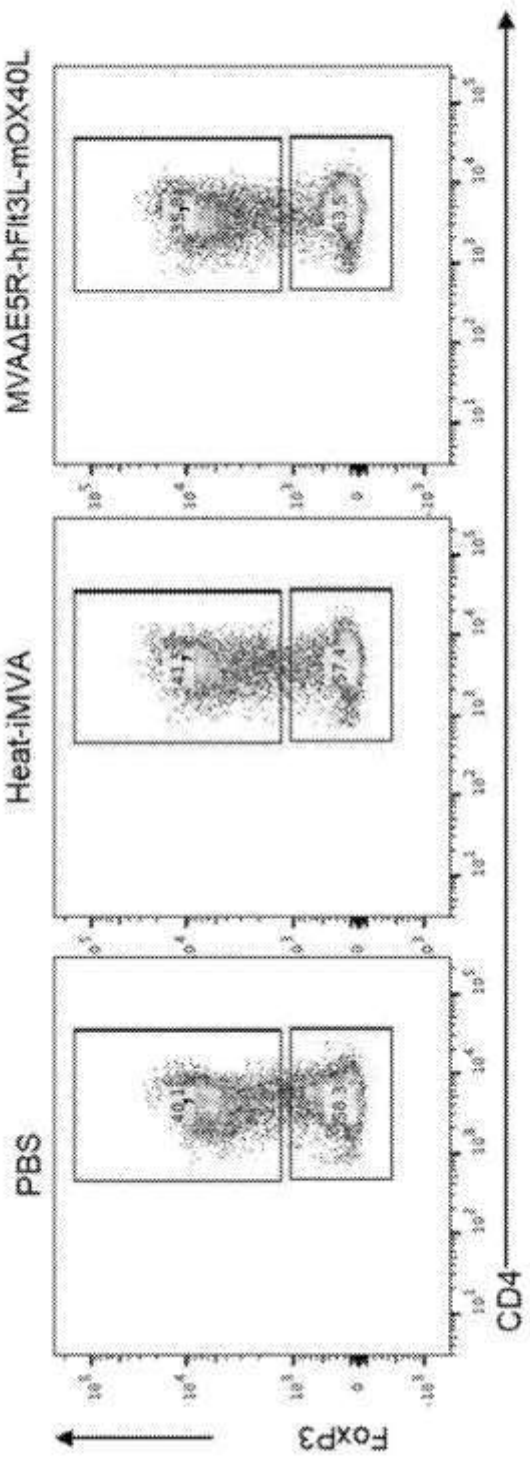


FIG. 104B

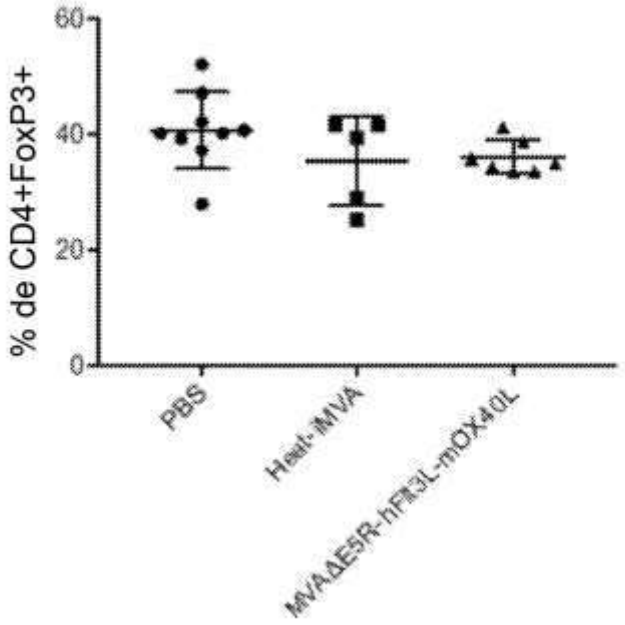


FIG. 104C

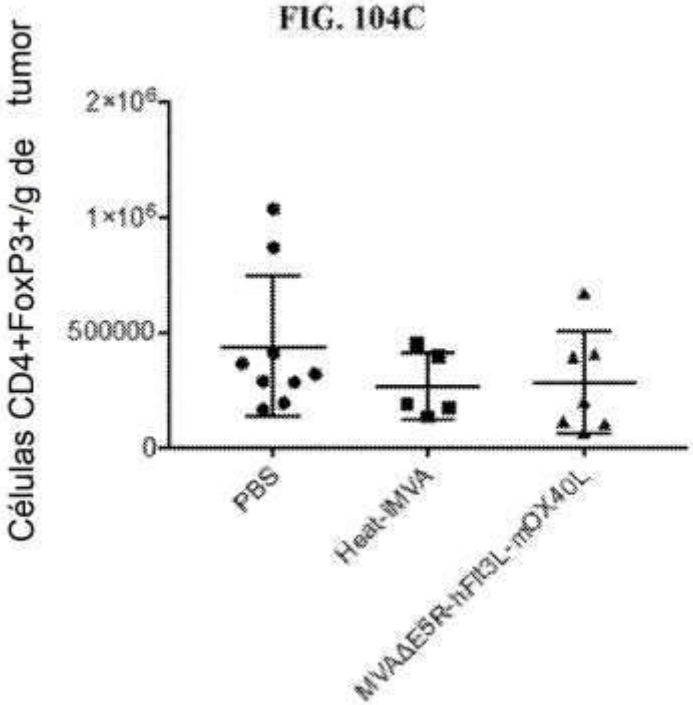
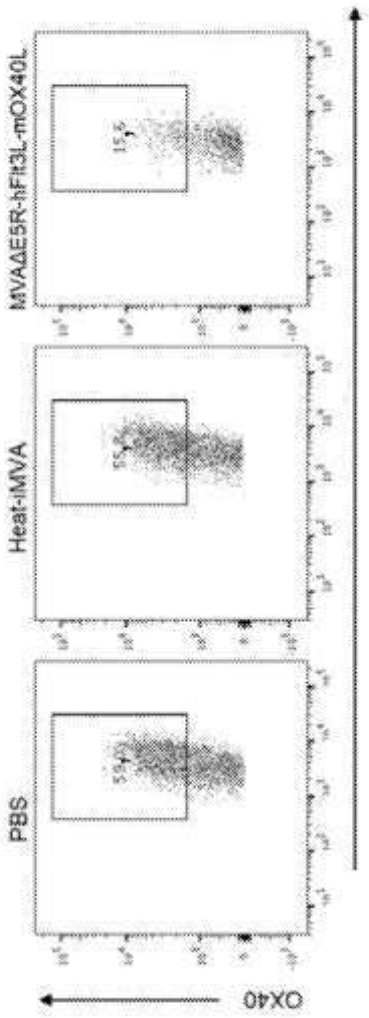


FIG. 105A



Tumores injetados

Fechando em células FoxP3+CD4+

FIG. 105B

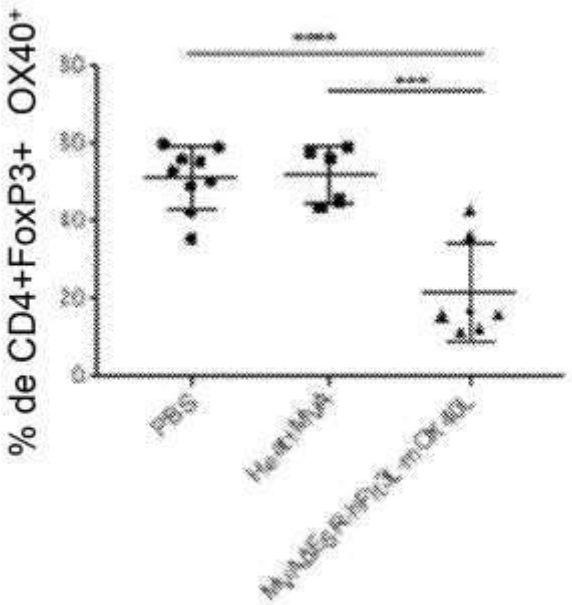


FIG. 105C

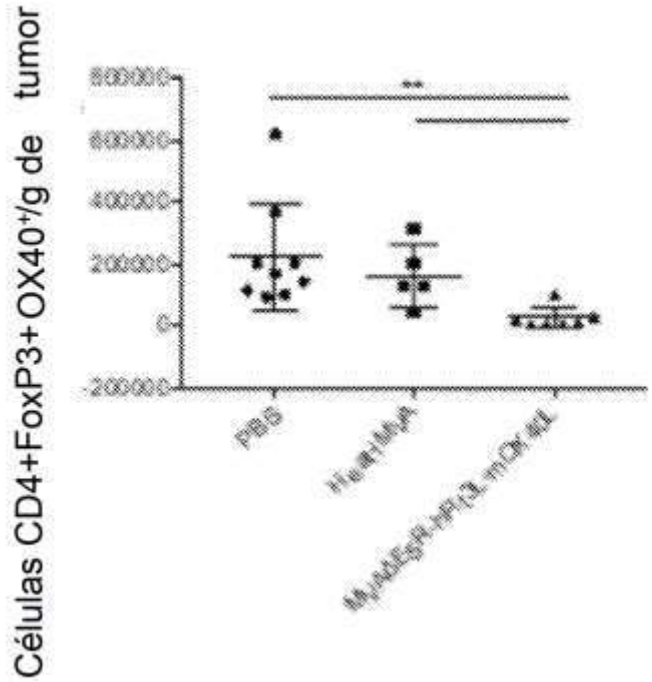


FIG. 106A

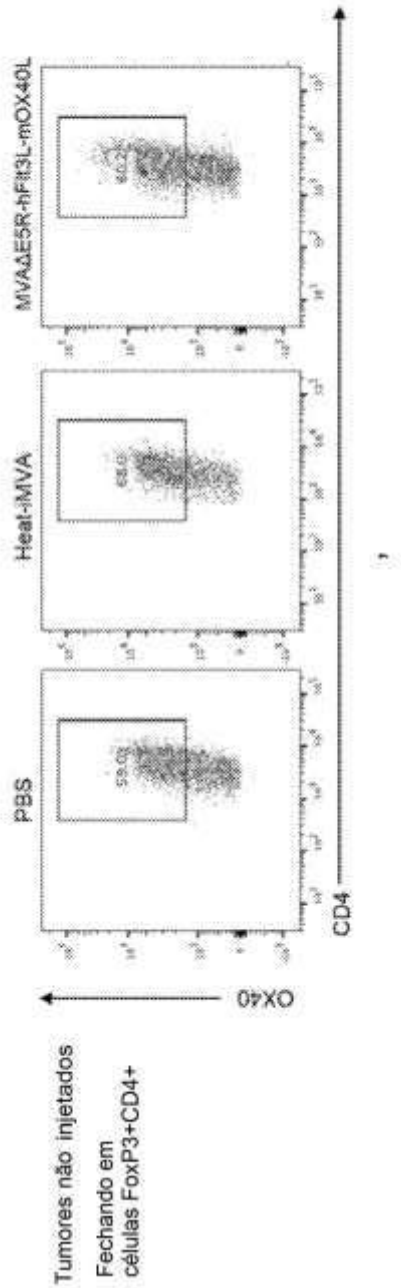

PBS
Heat-MVA
MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L
59.0
65.0
60.2
CD4
OX40
Tumores não injetados
Fechando em
células FoxP3+CD4+

FIG. 106B

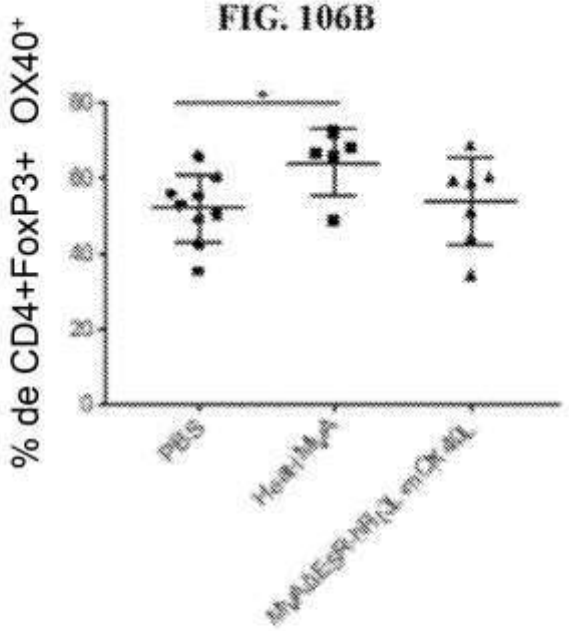


FIG. 106C

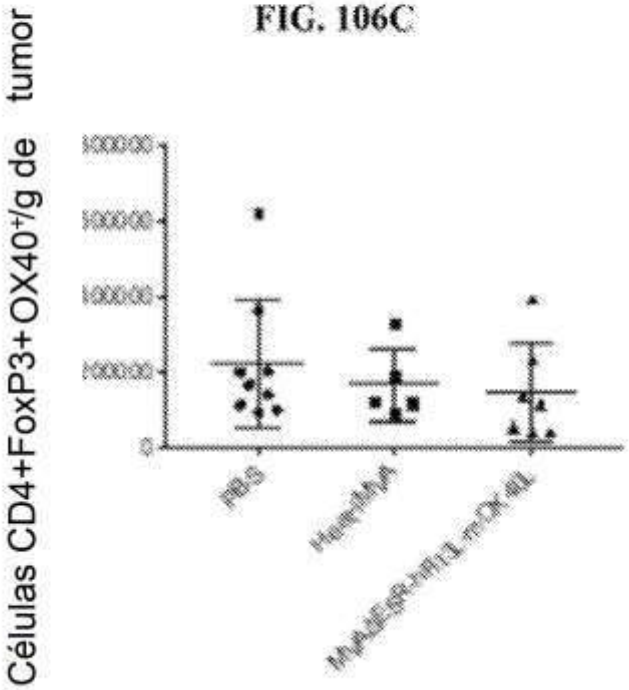


FIG. 107A

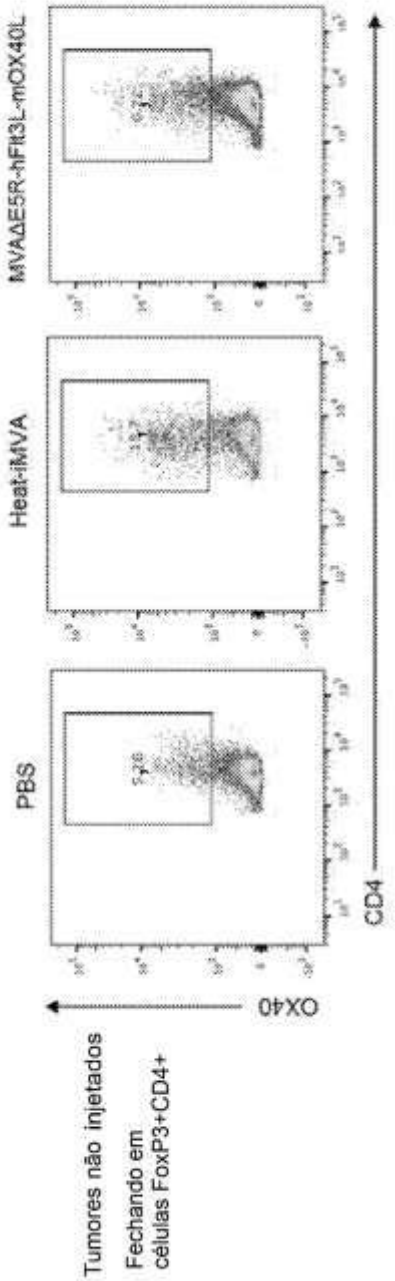

MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L
Heat-iMVA
PBS
CD4
OX40
Tumores não injetados
Fechando em células FoxP3+CD4+

FIG. 107B

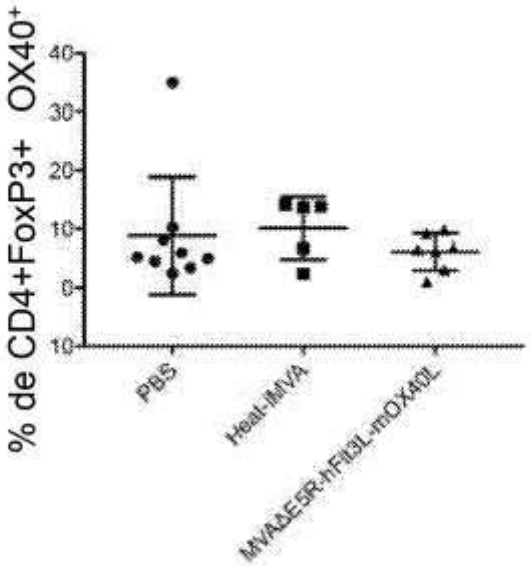


FIG. 107C

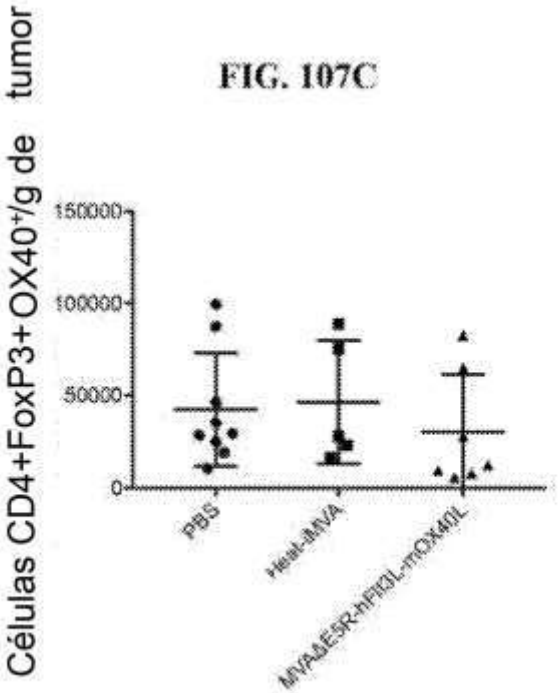


FIG. 108

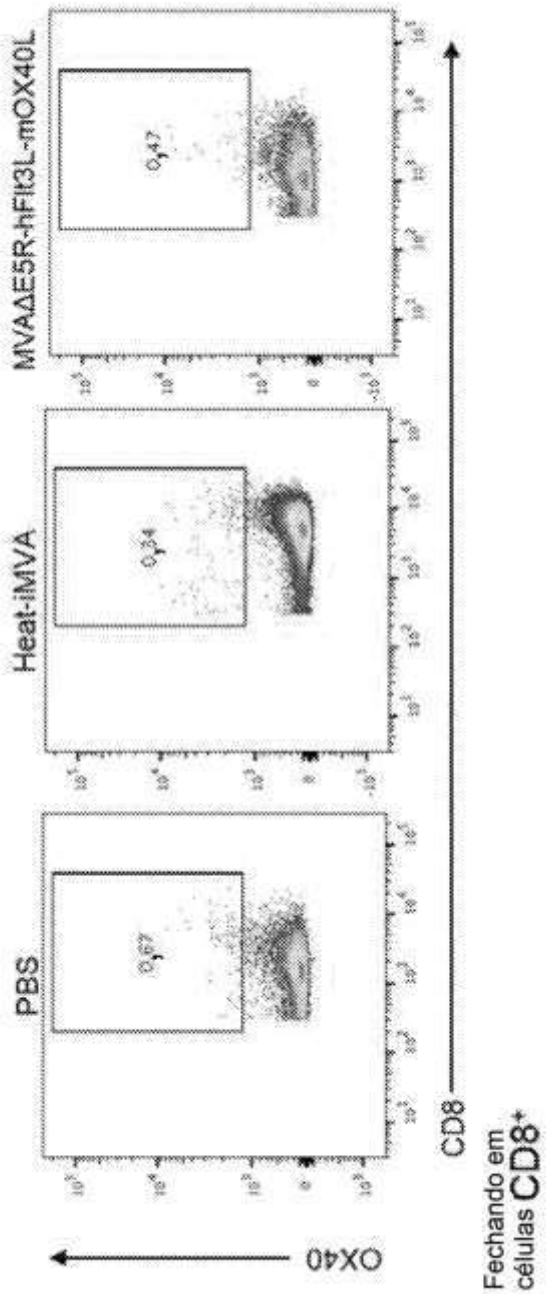

MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L
Heat-iMVA
PBS
0,47
0,34
0,67
OX40
CD8
Fechando em células CD8+

FIG. 109A

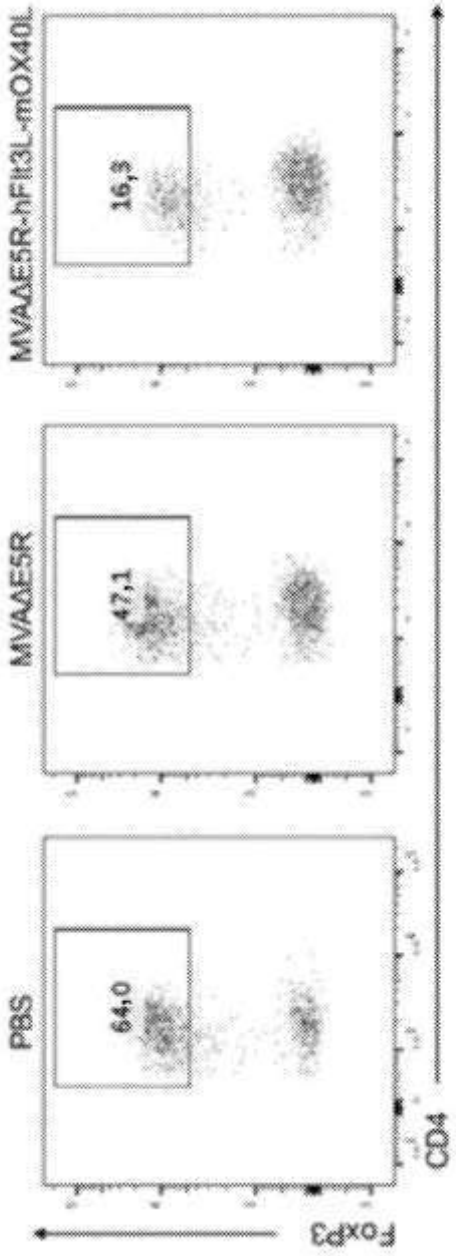


FIG. 109B

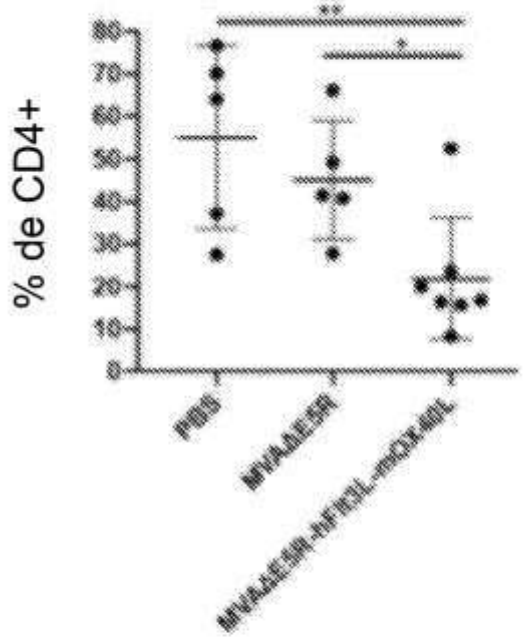


FIG. 109C

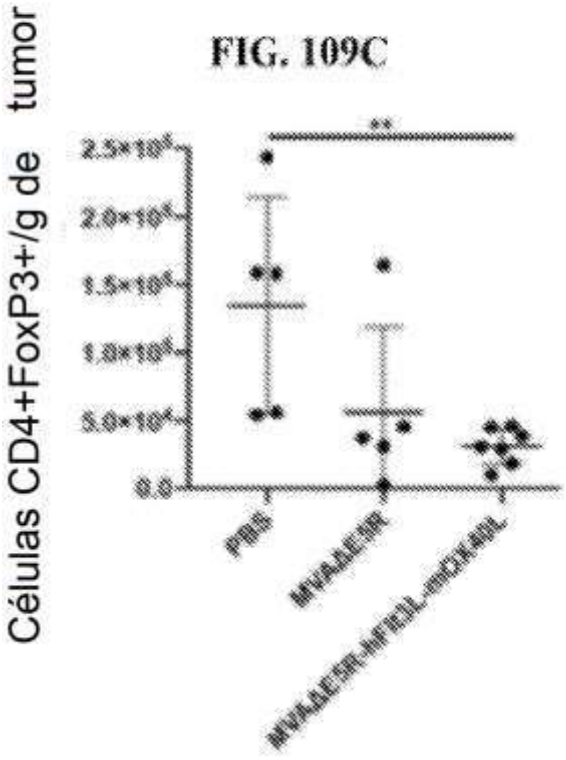


FIG. 110

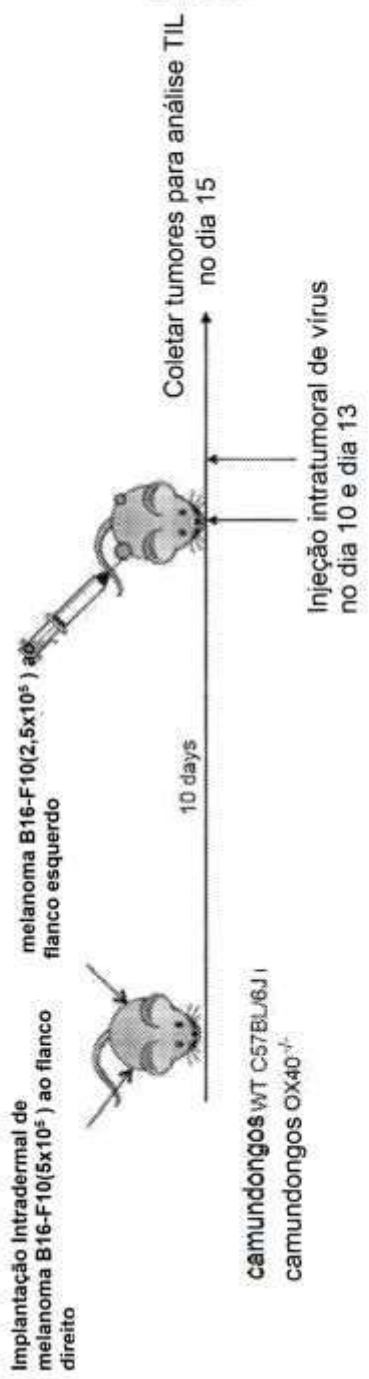

Implantação Intradermal de melanoma B16-F10(5x10⁵) ao flanco direito
melanoma B16-F10(2,5x10⁵) ao flanco esquerdo
10 days
camundongos WT C57BL/6J ou camundongos OX40⁻/⁻
Injeção intratumoral de vírus no dia 10 e dia 13
Coletar tumores para análise TIL no dia 15

FIG. 111A

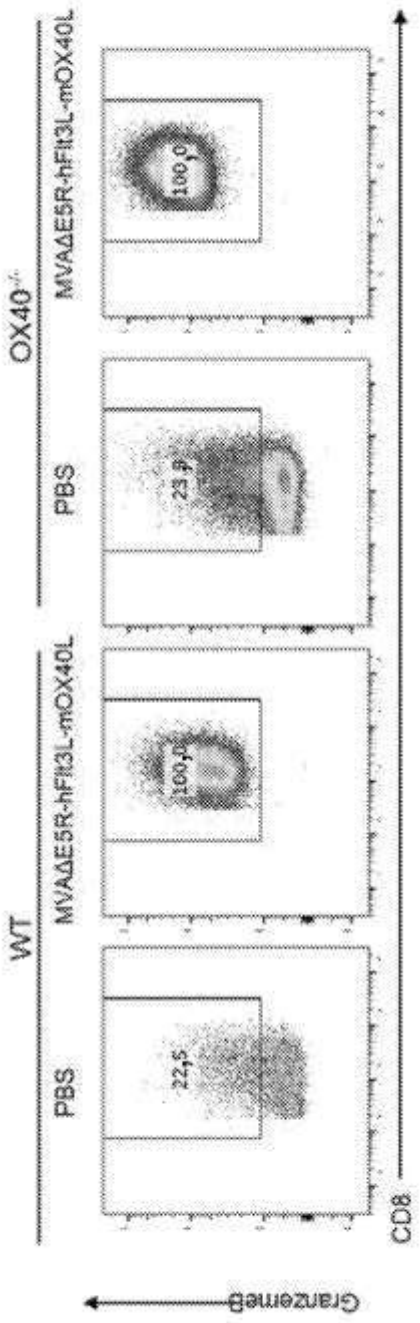

WT
OX40-/-
PBS
MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L
PBS
MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L
22,5
160
23,8
100,0
Granzyme B
CD8

FIG. 111B

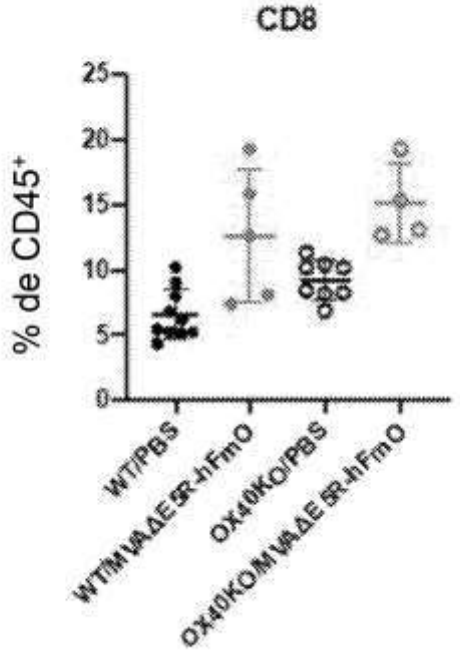


FIG. 111C

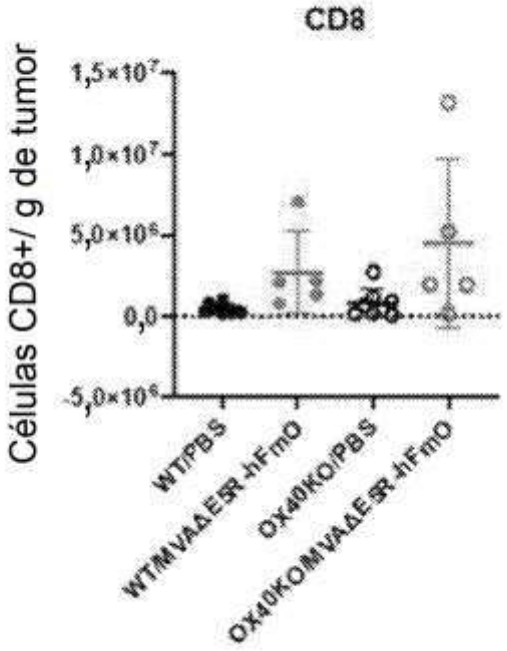


FIG. 111D

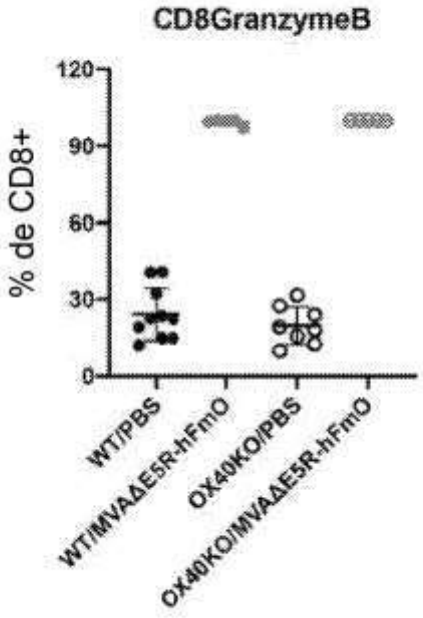


FIG. 111E

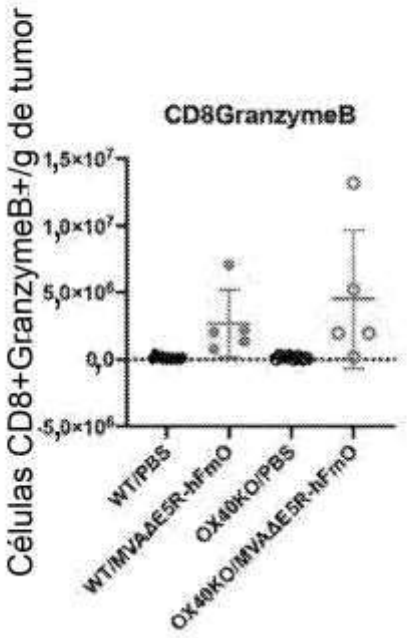


FIG. 112A

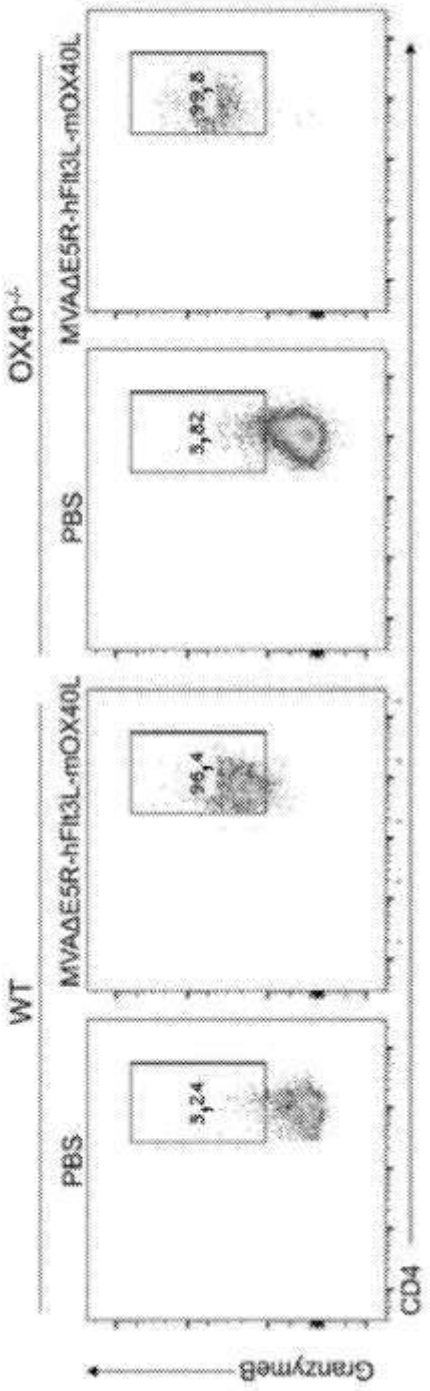

OX40-/-
MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L
PBS
WT
MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L
PBS
3,8
3,62
36,4
3,24
CD4
Granzyme B

FIG. 112B

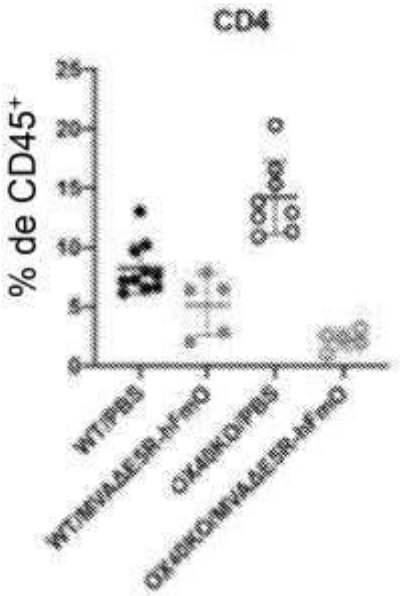


FIG. 112C

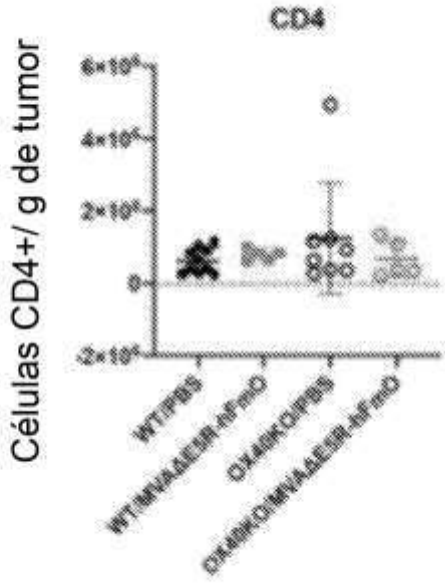


FIG. 112D

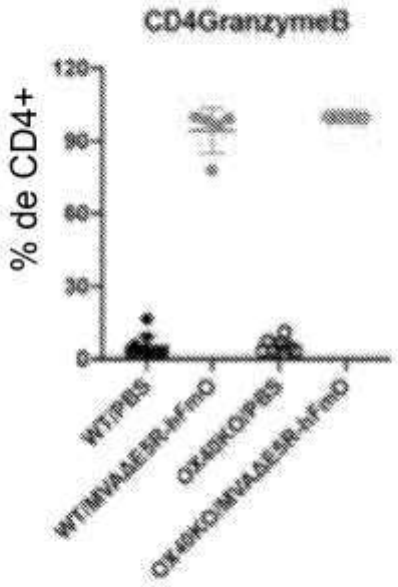


FIG. 112E

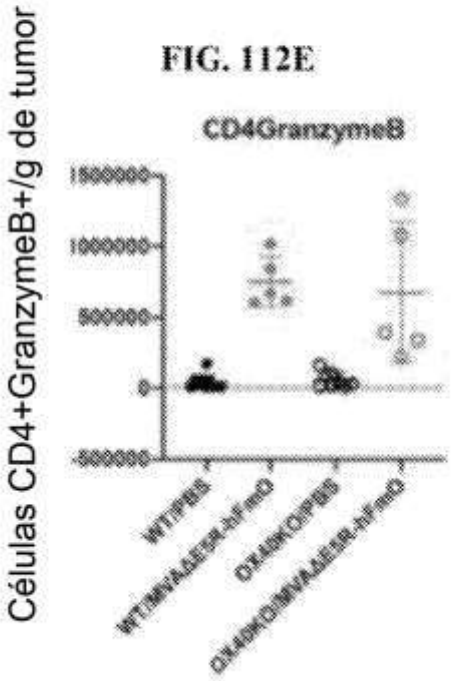


FIG. 113A

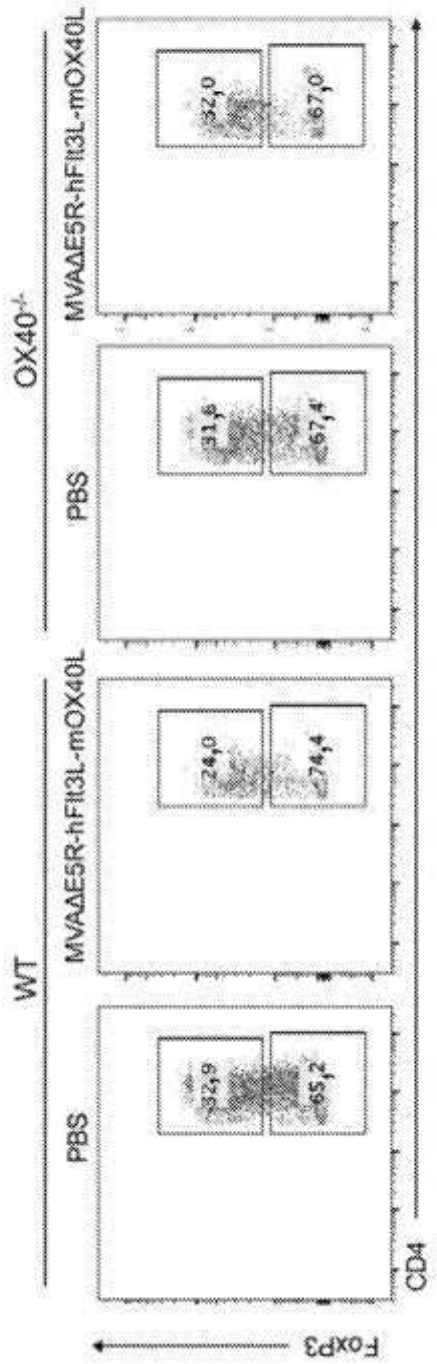

WT
OX40-/-
PBS
MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L
PBS
MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L
32,9
65,2
24,0
74,4
31,6
67,4
32,0
67,0
FoxP3
CD4

FIG. 113B

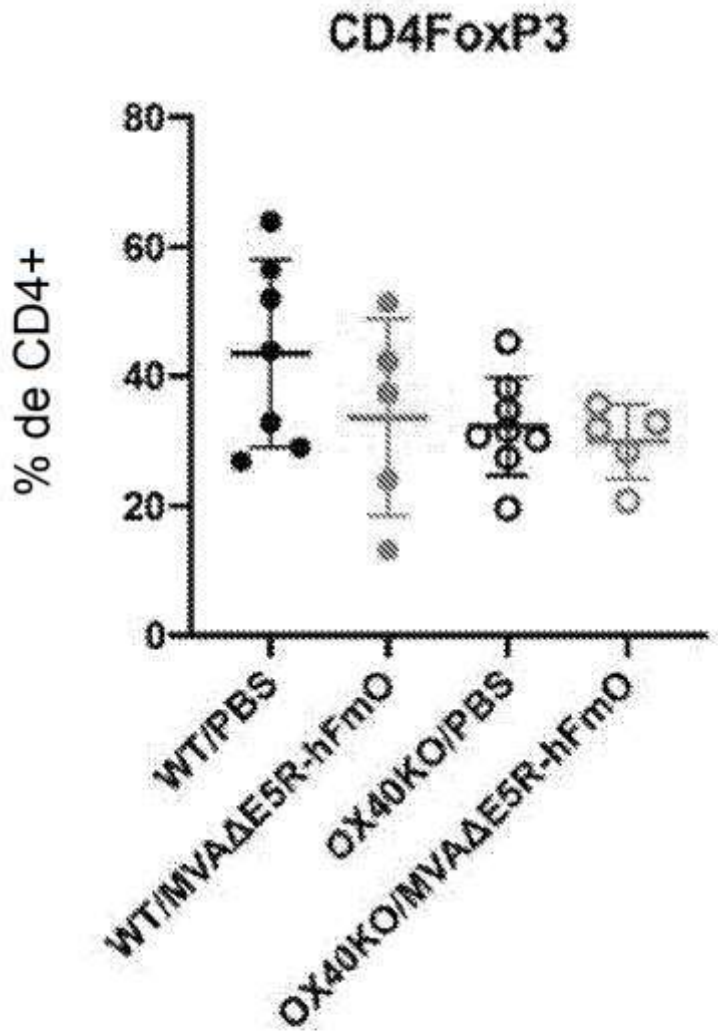

CD4FoxP3
% de CD4+
80
60
40
20
0
WT/PBS
WT/MVAΔE5R-hFmO
OX40KO/PBS
OX40KO/MVAΔE5R-hFmO

FIG. 114A

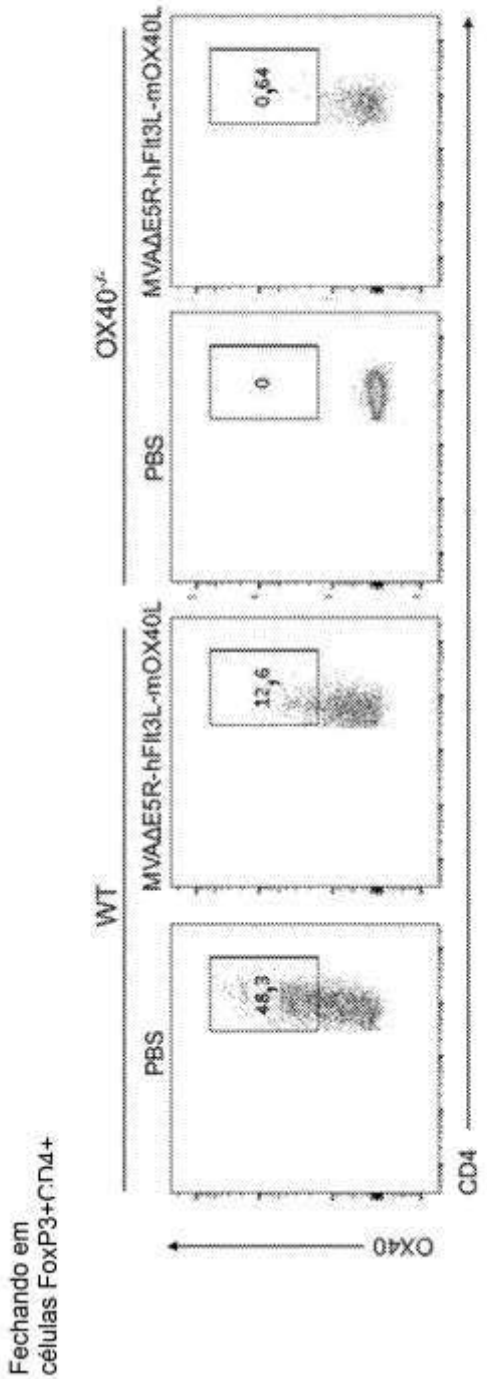

Fechando em células FoxP3+CD4+
WT
OX40-/-
PBS
MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L
PBS
MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L
46,3
12,6
0
0,64
OX40
CD4

FIG. 114B

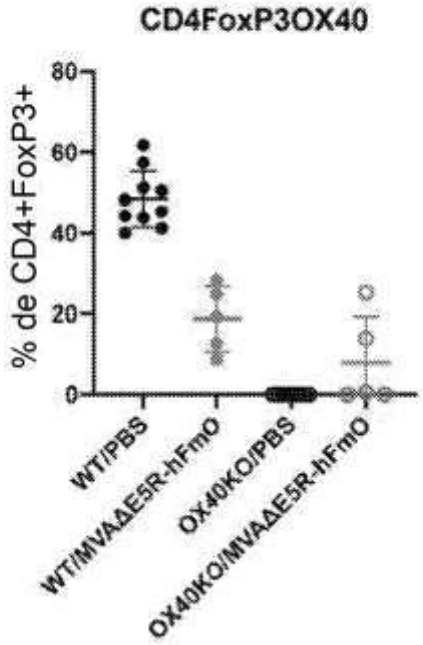


FIG. 114C

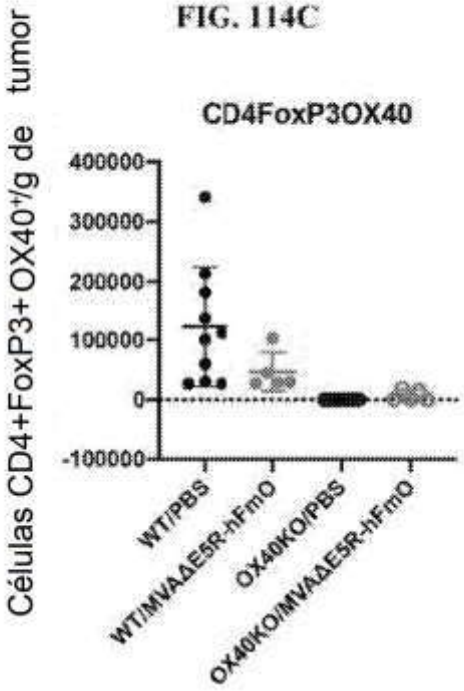


FIG. 115A

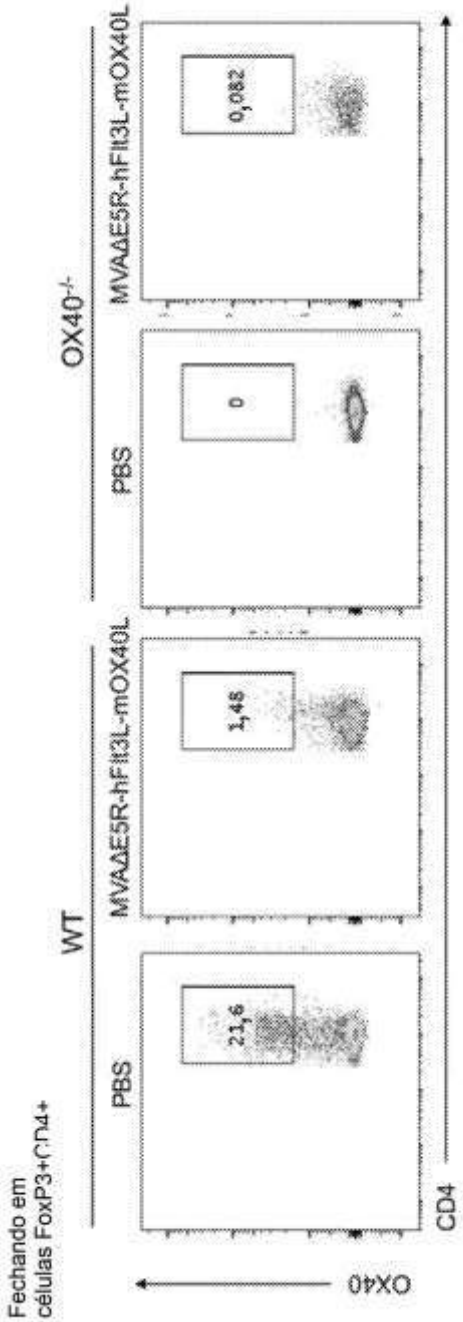

Fechando em células FoxP3+CD4+
WT
OX40-/-
PBS
MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L
PBS
MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L
21,6
1,48
0
0,082
OX40
CD4

FIG. 115B

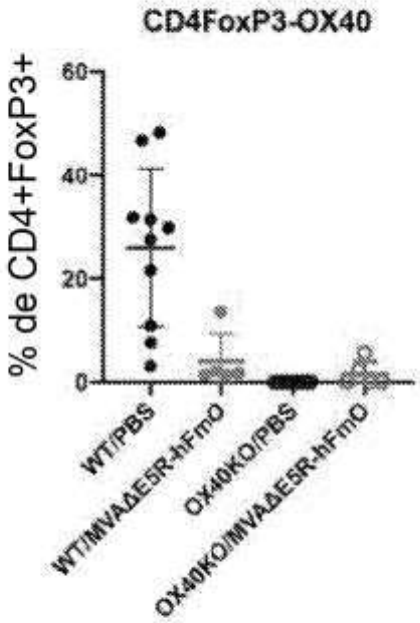


FIG. 115C

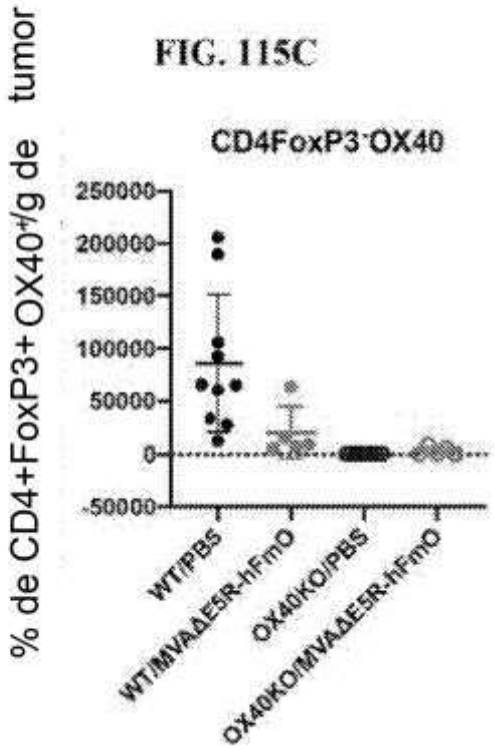


FIG. 116A

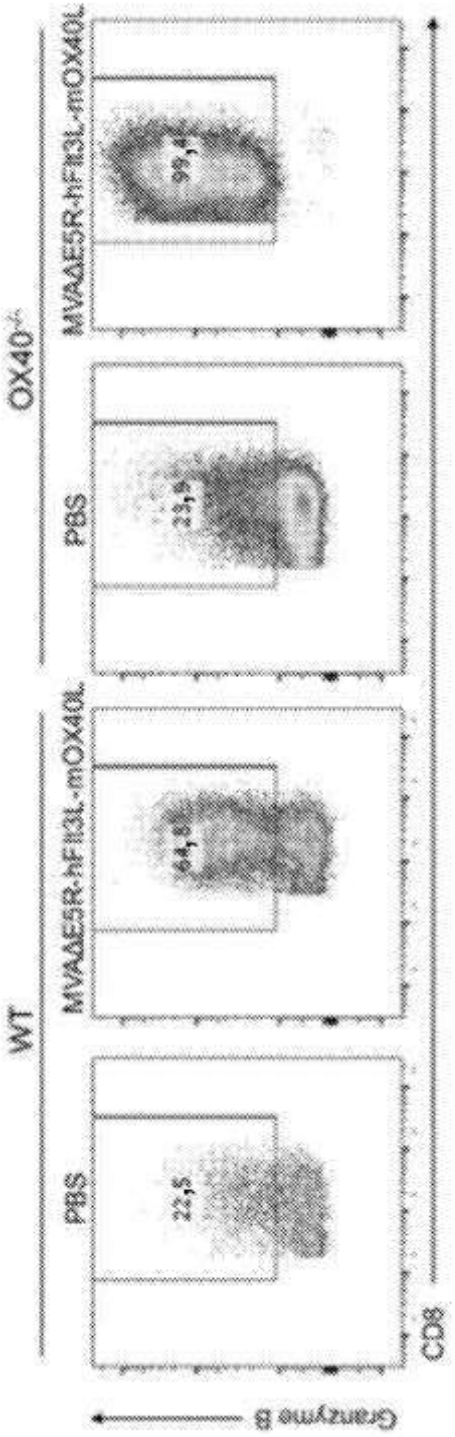

OX40-/-
WT
MVAΔE5R-hF13L-mOX40L
PBS
99,1
23,9
64,8
22,5
CD8
Granzyme B

FIG. 116B

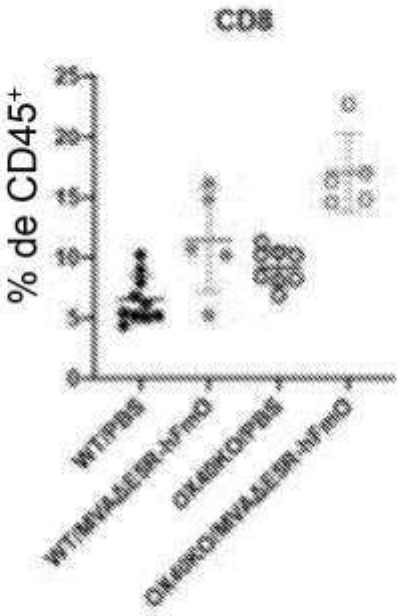


FIG. 116C

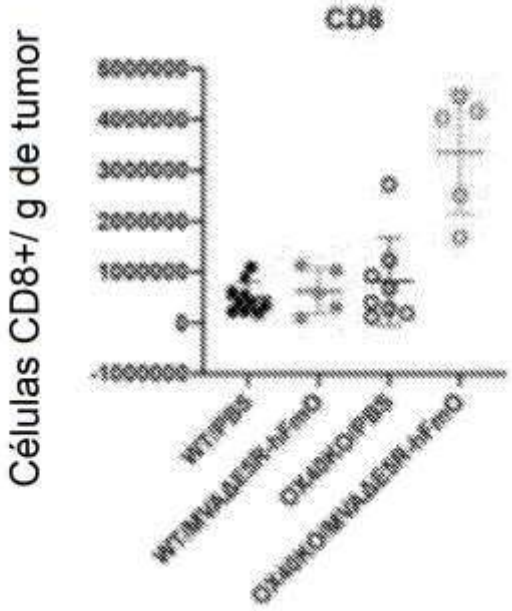


FIG. 116D

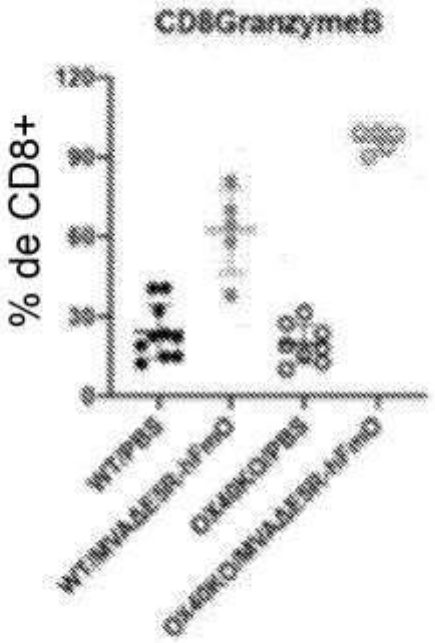


FIG. 116E

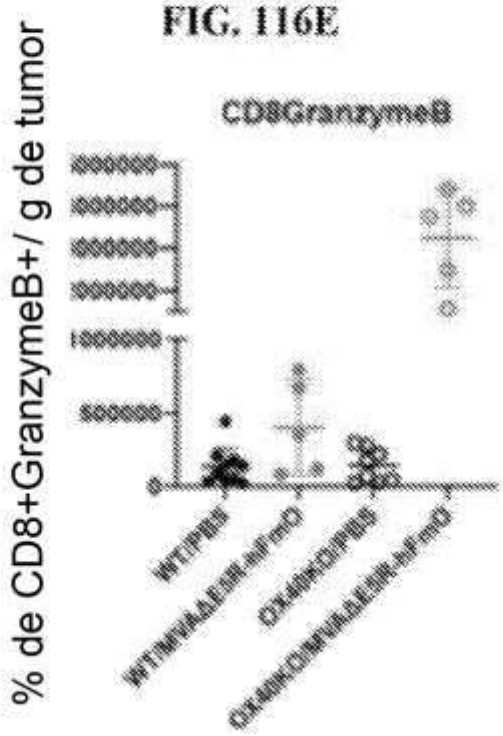


FIG. 117A

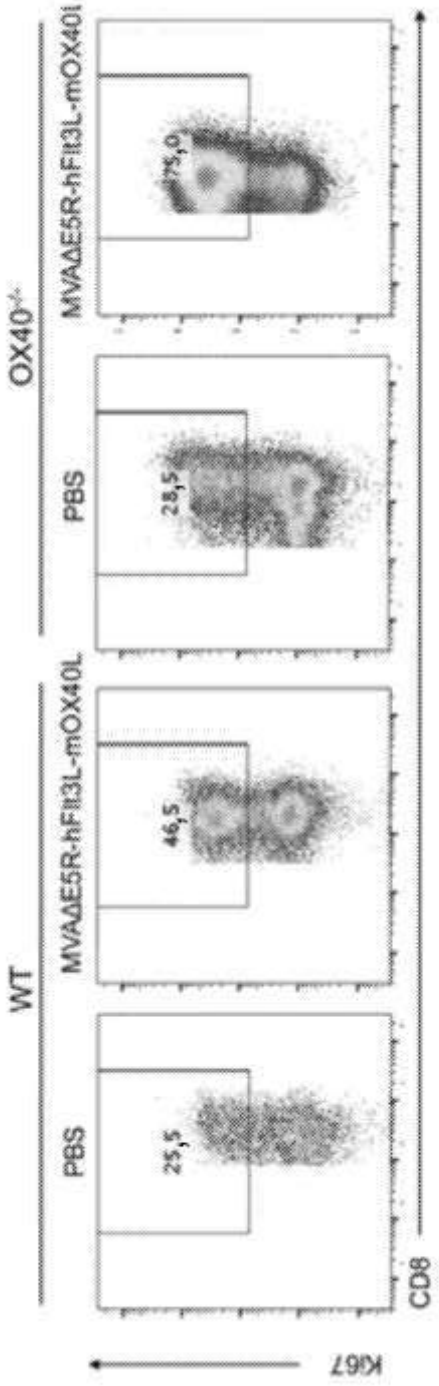

OX40-/-
WT
MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40l
MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L
PBS
PBS
75,0
28,5
46,5
25,5
CD8
Ki67

FIG. 117B

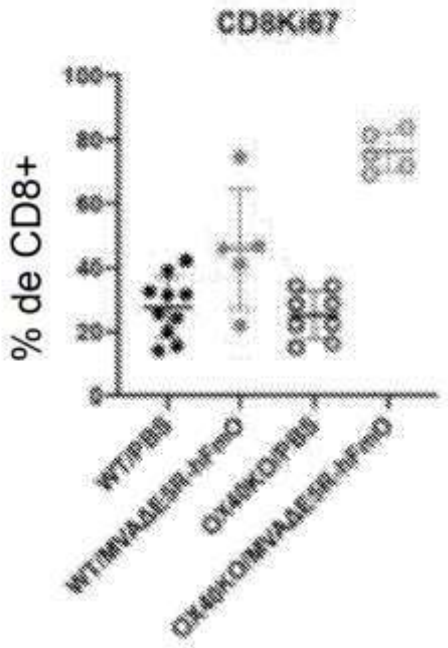


FIG. 117C

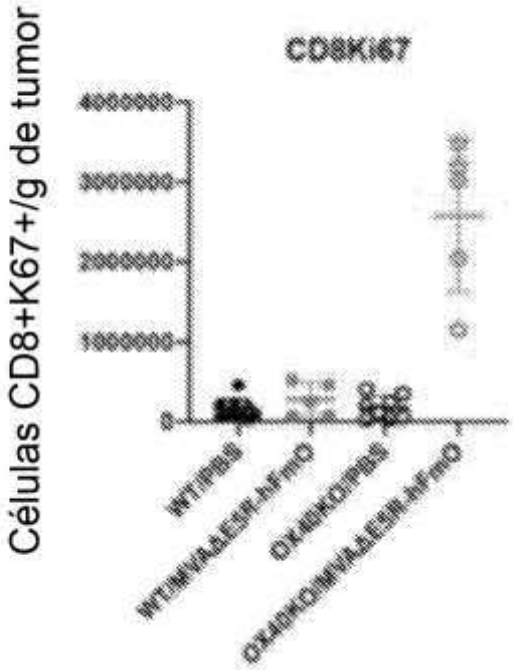


FIG. 118A

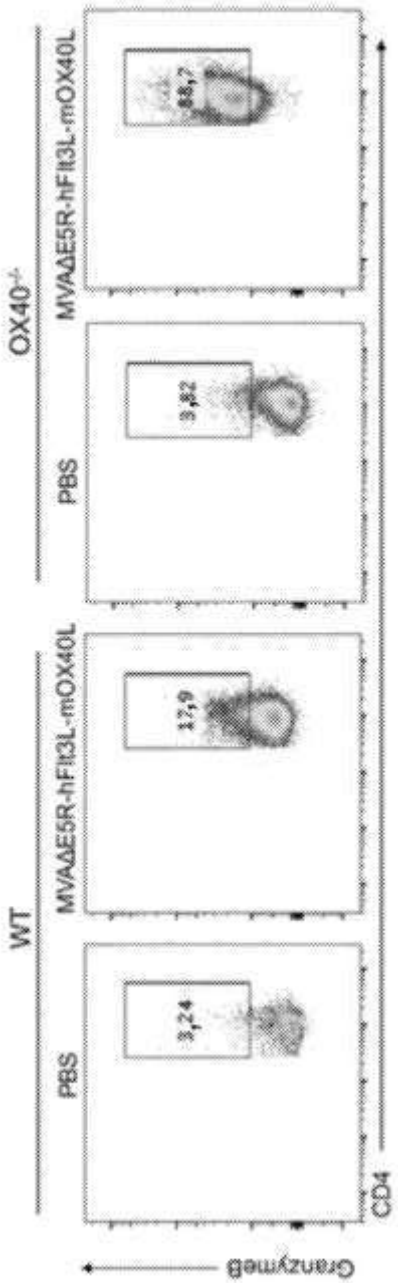

WT
OX40-/-
PBS
MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L
PBS
MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L
3,24
17,9
3,82
88,7
Granzyme B
CD4

FIG. 118B

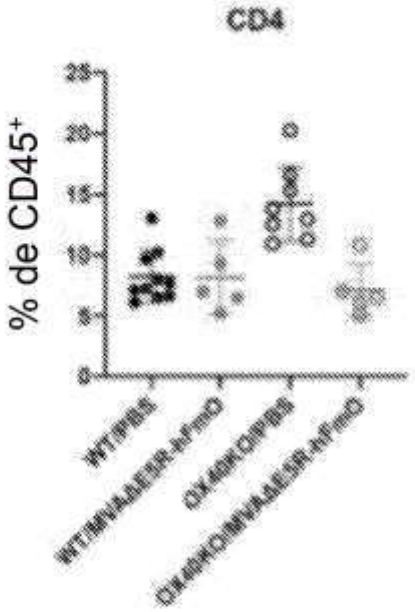


FIG. 118C

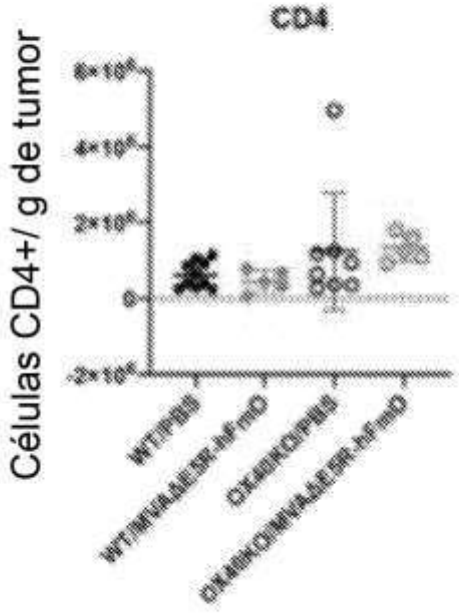


FIG. 118D

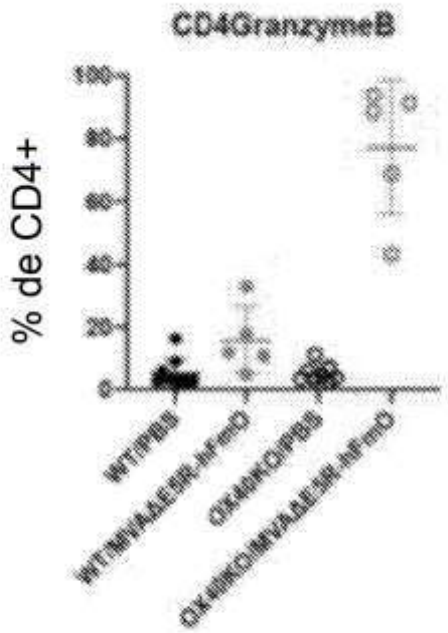


FIG. 118E

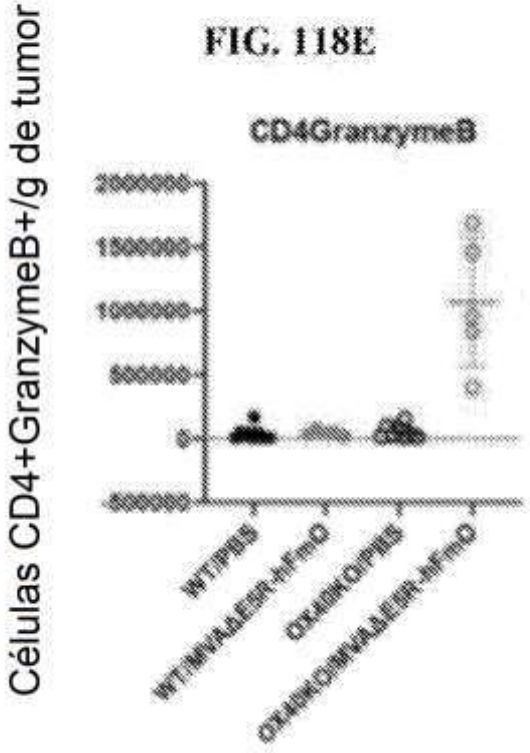


FIG. 119A

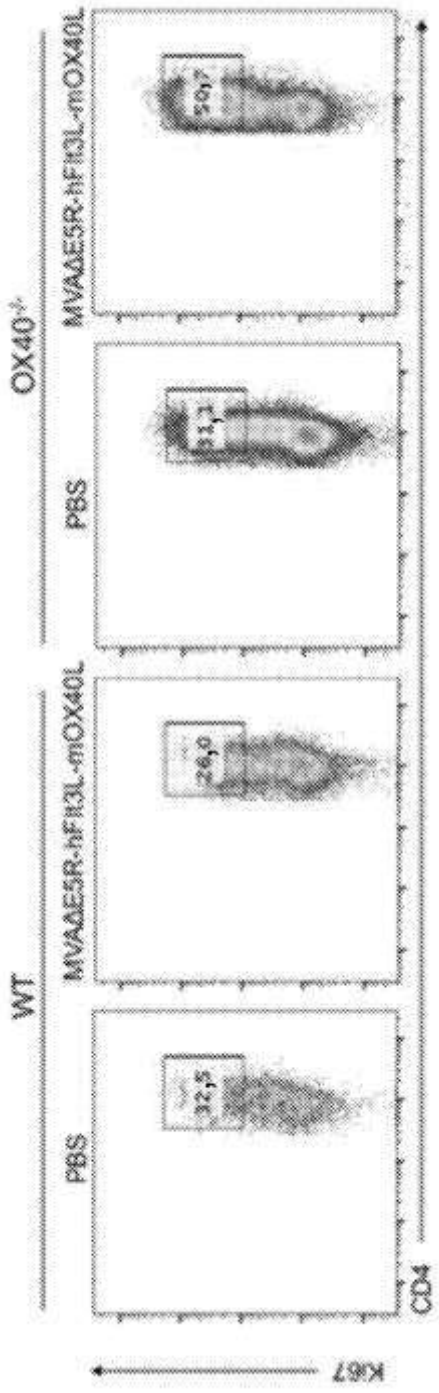

OX40-/-
WT
MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L
PBS
MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L
PBS
50,7
31,7
26,0
32,5
CD4
Ki67

FIG. 119B

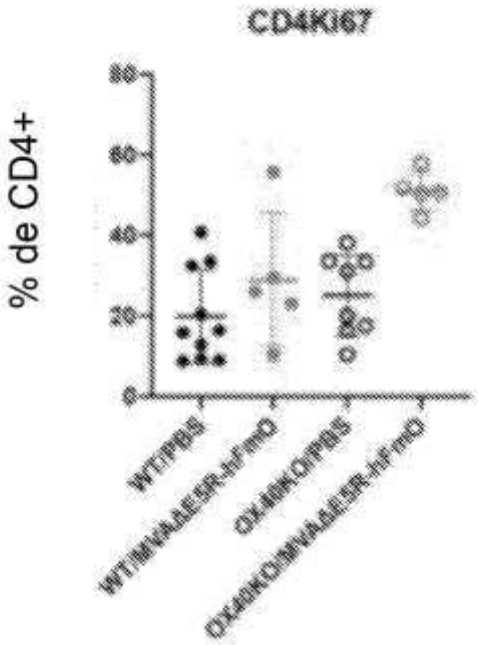


FIG. 119C

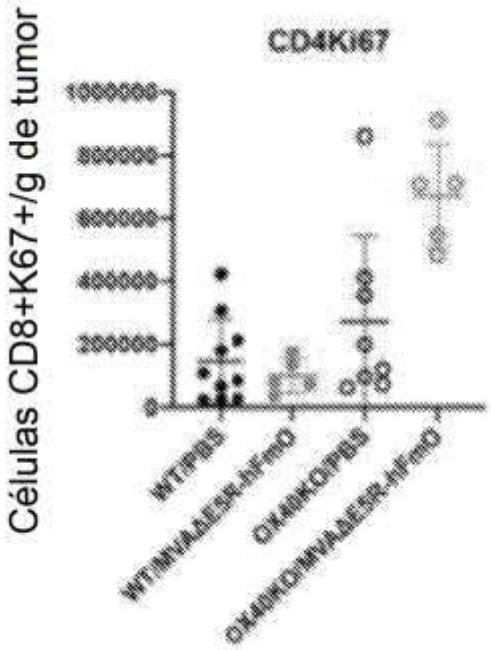


FIG. 120

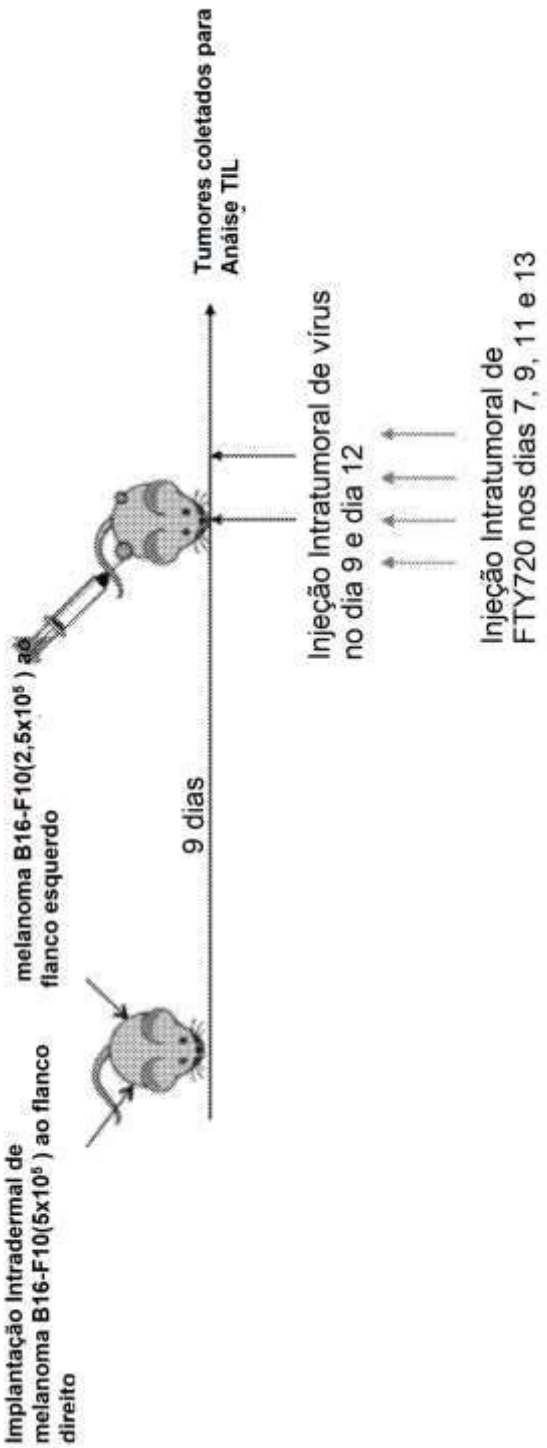

Implantação Intradermal de melanoma B16-F10(5x10⁵) ao flanco direito
melanoma B16-F10(2,5x10⁵) ao flanco esquerdo
9 dias
Tumores coletados para Análise TIL
Injeção Intratumoral de vírus no dia 9 e dia 12
Injeção Intratumoral de FTY720 nos dias 7, 9, 11 e 13

FIG. 121

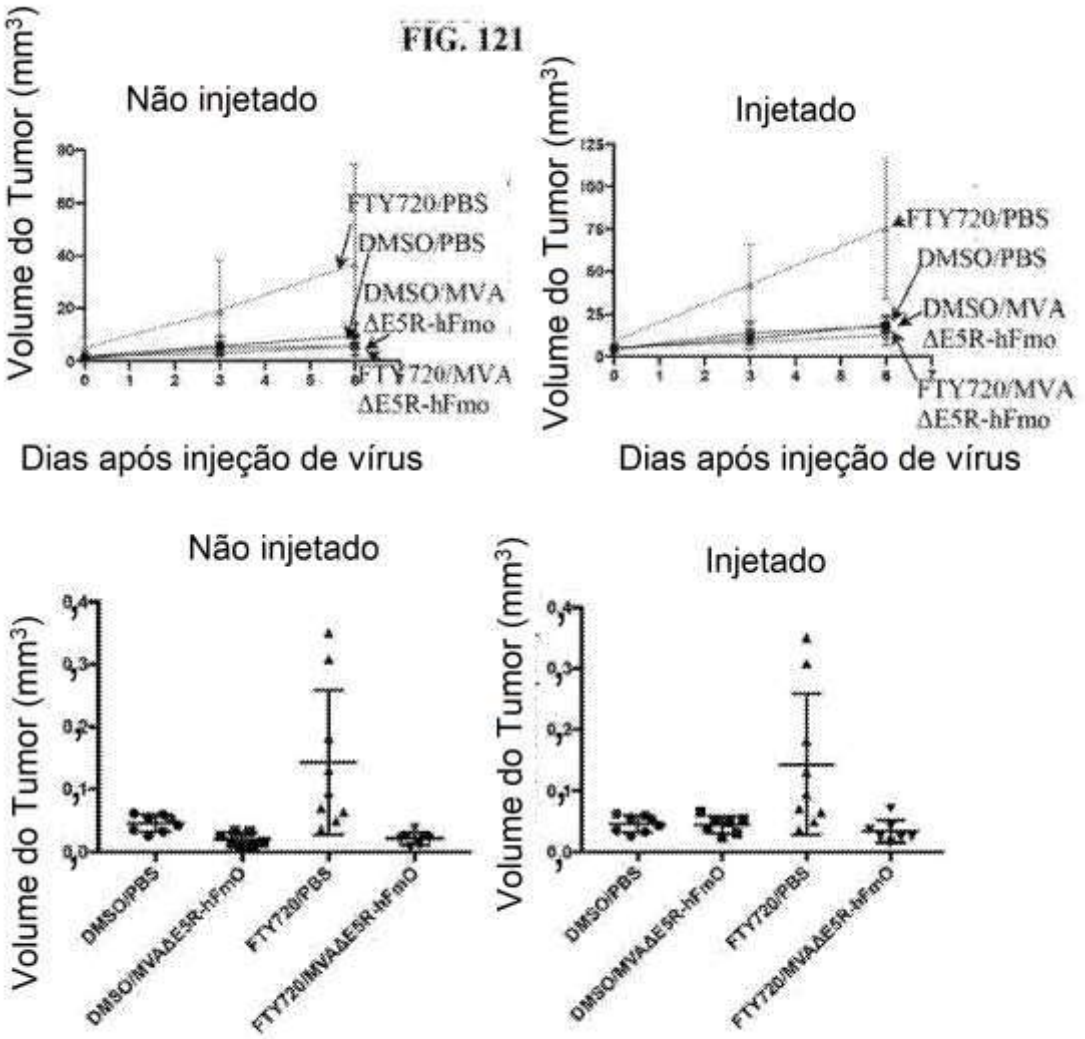

Não injetado
Volume do Tumor (mm3)
FTY720/PBS
DMSO/PBS
DMSO/MVA ΔE5R-hFmo
FTY720/MVA ΔE5R-hFmo
Dias após injeção de vírus
Injetado
Volume do Tumor (mm3)
FTY720/PBS
DMSO/PBS
DMSO/MVA ΔE5R-hFmo
FTY720/MVA ΔE5R-hFmo
Dias após injeção de vírus
Não injetado
Volume do Tumor (mm3)
DMSO/PBS
DMSO/MVAΔE5R-hFmO
FTY720/PBS
FTY720/MVAΔE5R-hFmO
Injetado
Volume do Tumor (mm3)
DMSO/PBS
DMSO/MVAΔE5R-hFmO
FTY720/PBS
FTY720/MVAΔE5R-hFmO

FIG. 122A

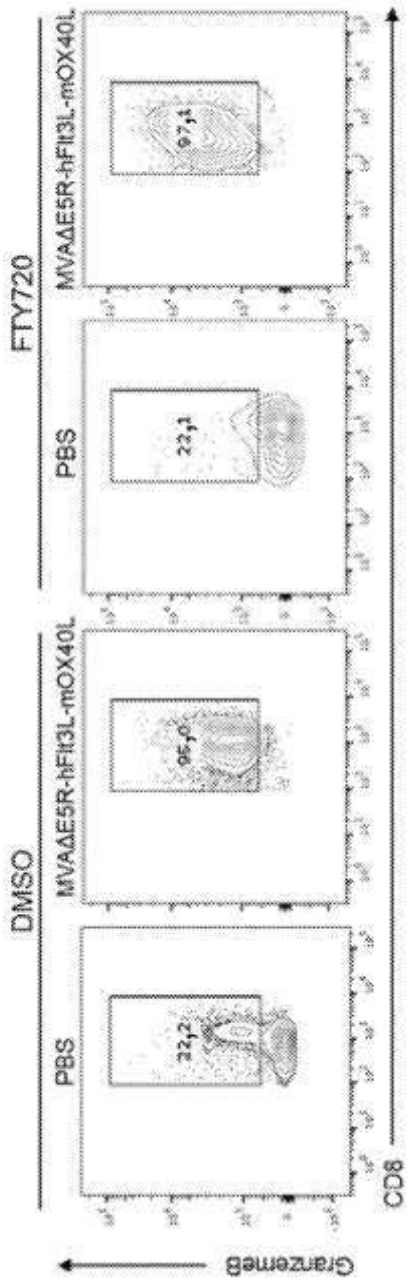

DMSO
FTY720
PBS
MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L
PBS
MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L
22,2
9,5
22,1
9,1
Granzyme B
CD8

FIG. 122B

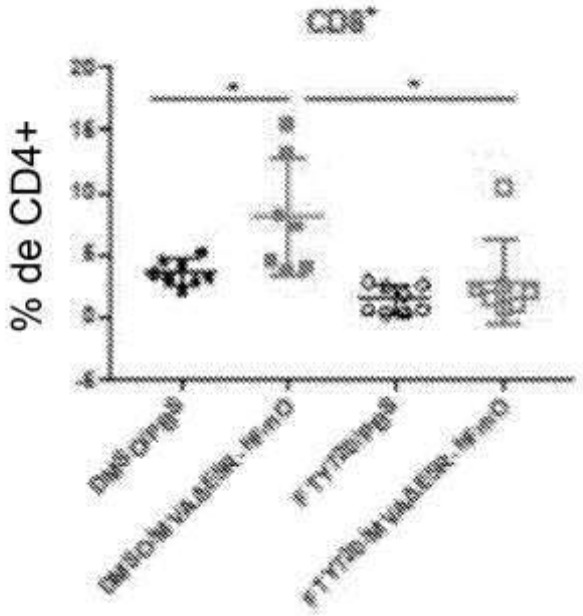


FIG. 122C

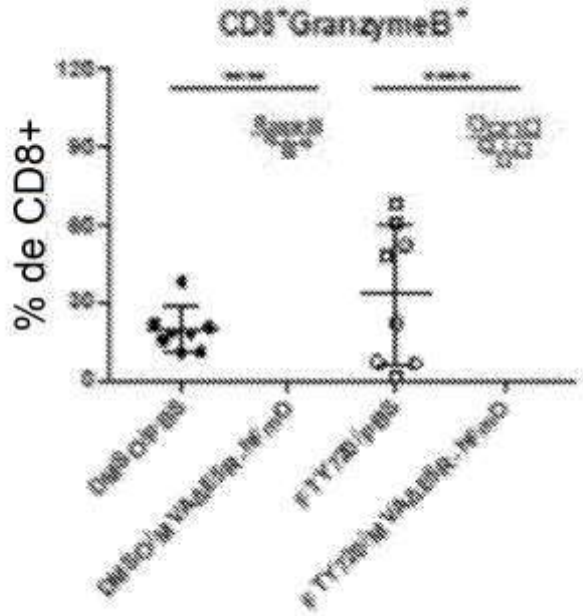


FIG. 122D

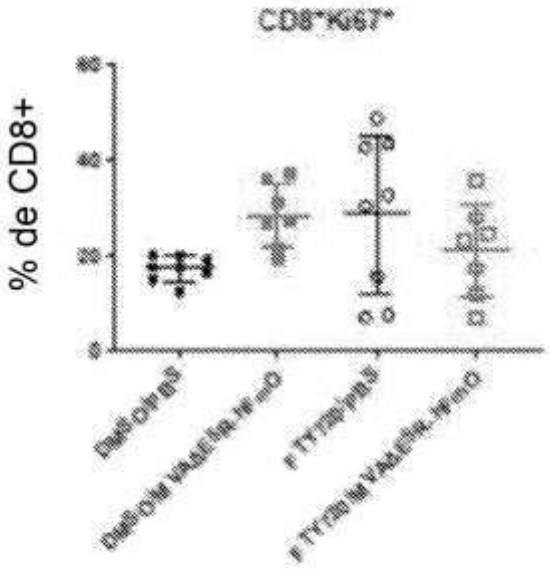


FIG. 123A

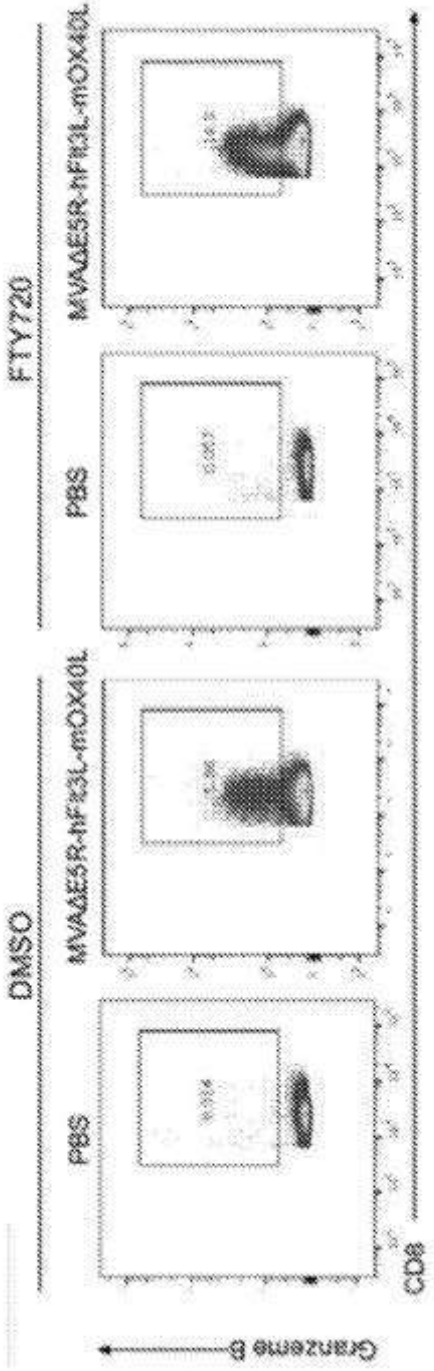

FTY720
DMSO
MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L
PBS
MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L
PBS
CD8
Granzeme B

FIG. 123B

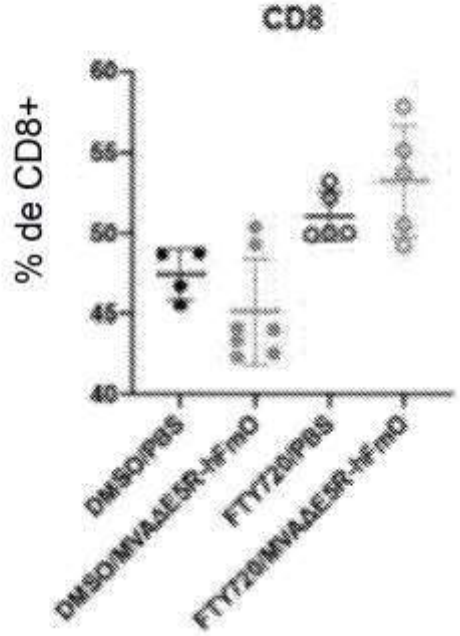


FIG. 123C

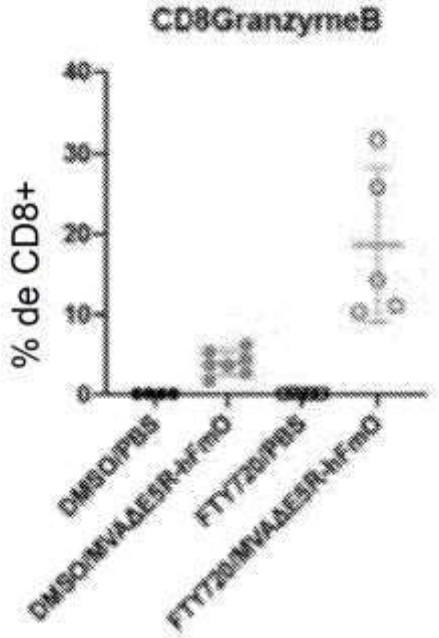


FIG. 124A

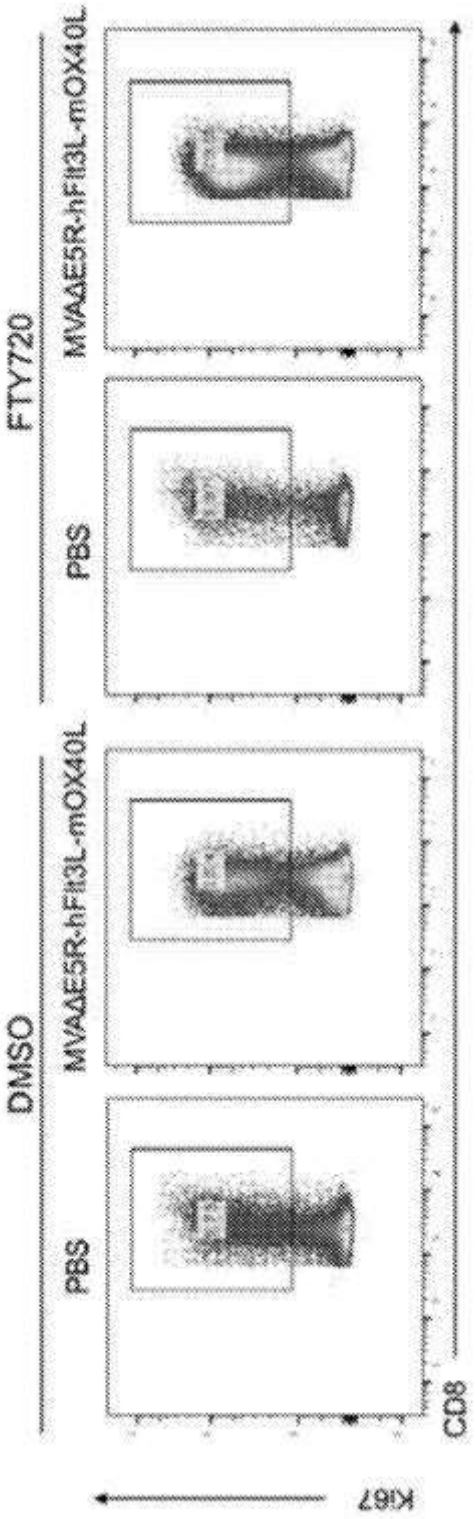

FTY720
DMSO
MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L
PBS
MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L
PBS
CD8
Ki67

FIG. 124B

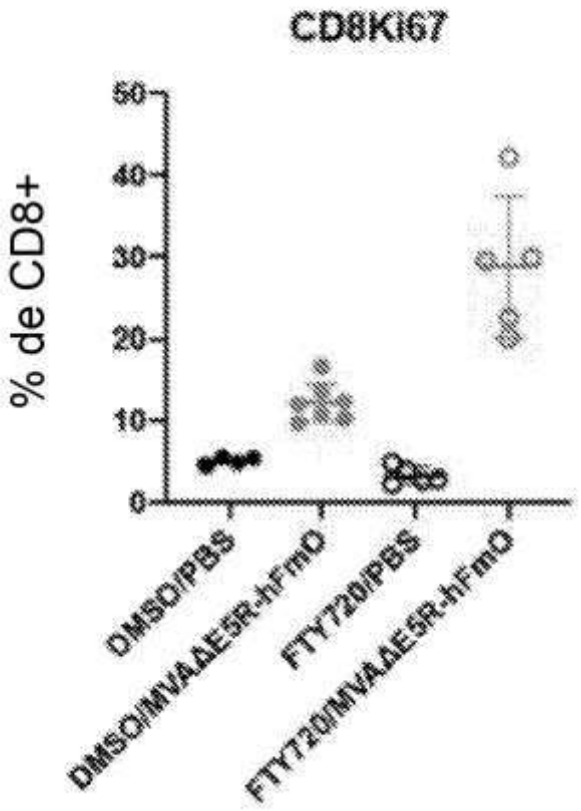

CD8Ki67
% de CD8+
50
40
30
20
10
0
DMSO/PBS
DMSO/MVAΔE5R-hFmO
FTY720/PBS
FTY720/MVAΔE5R-hFmO

FIG. 125

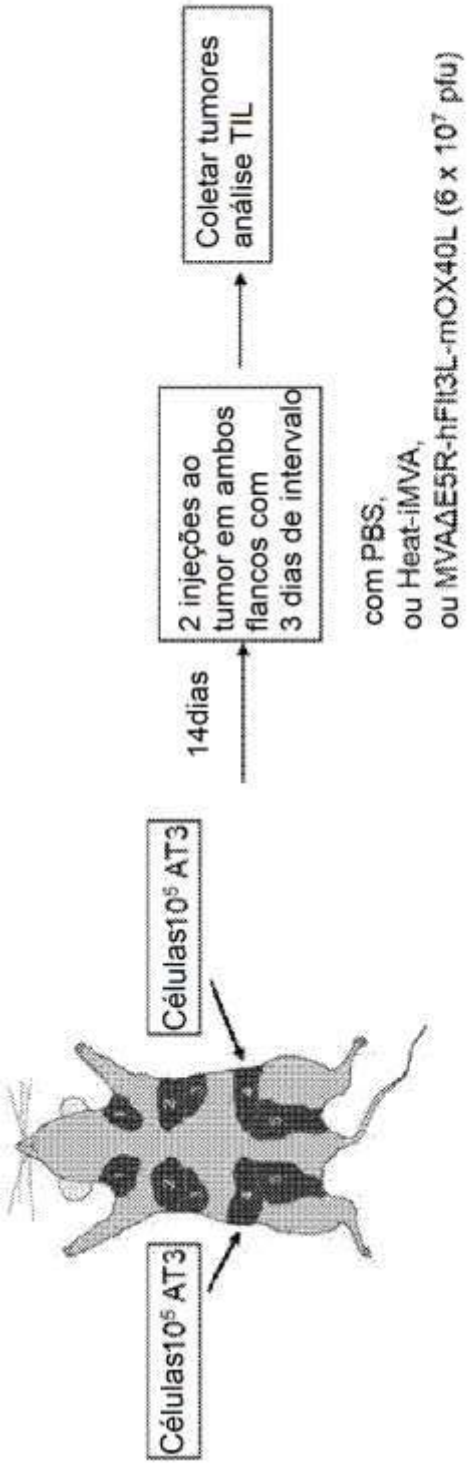

Células10^5 AT3
Células10^5 AT3
14dias
2 injeções ao tumor em ambos flancos com 3 dias de intervalo
Coletar tumores análise TIL
com PBS,
ou Heat-iMVA,
ou MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L (6 x 10^7 pfu)

FIG. 126A

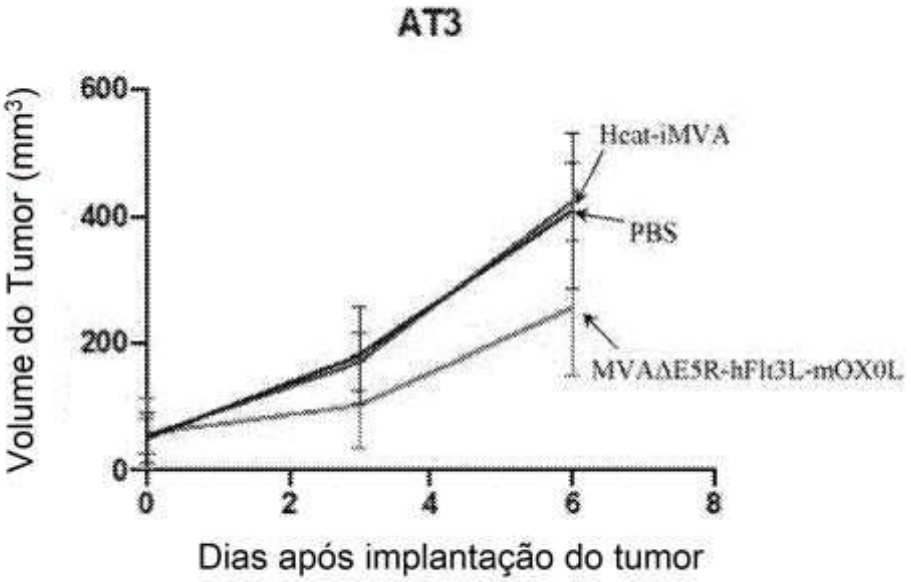


FIG. 126B

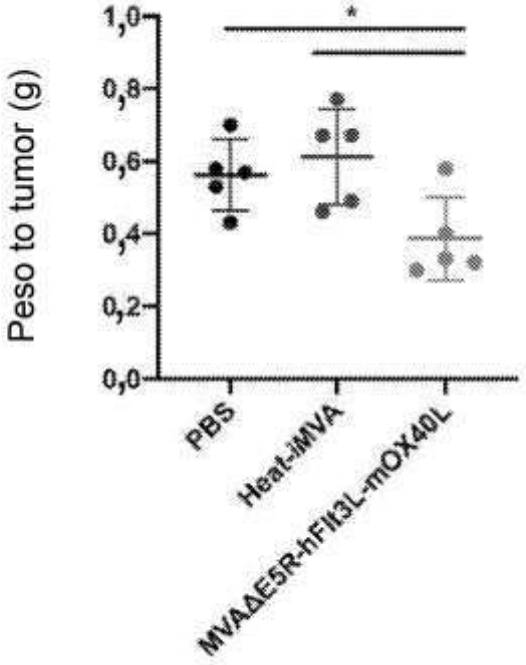


FIG. 127A

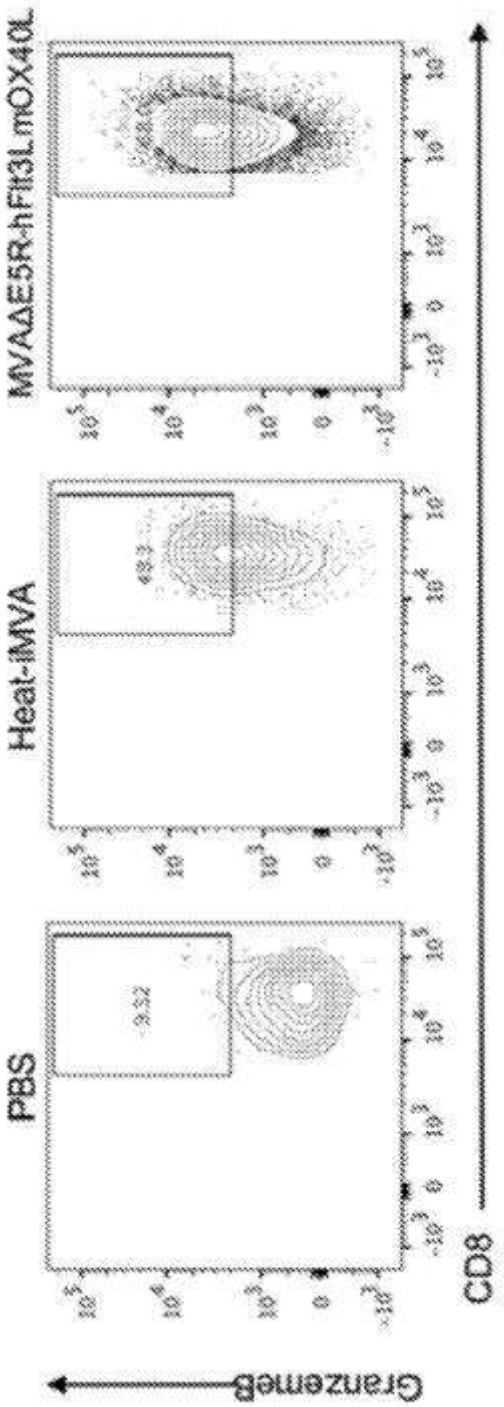


FIG. 127B

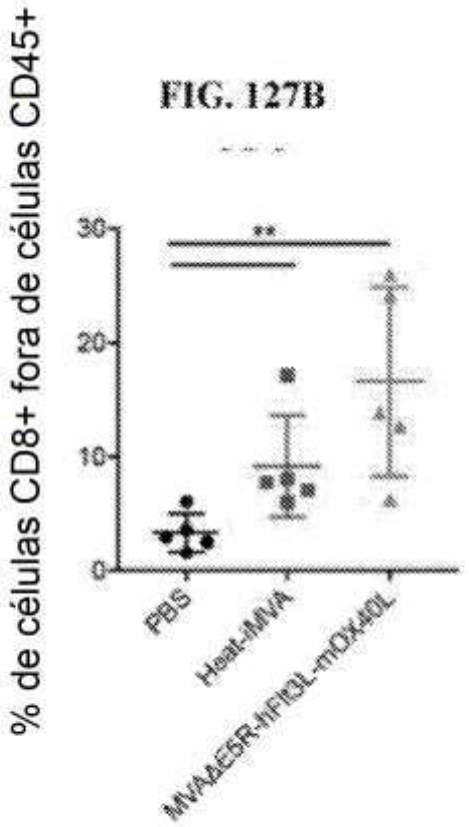


FIG. 127C

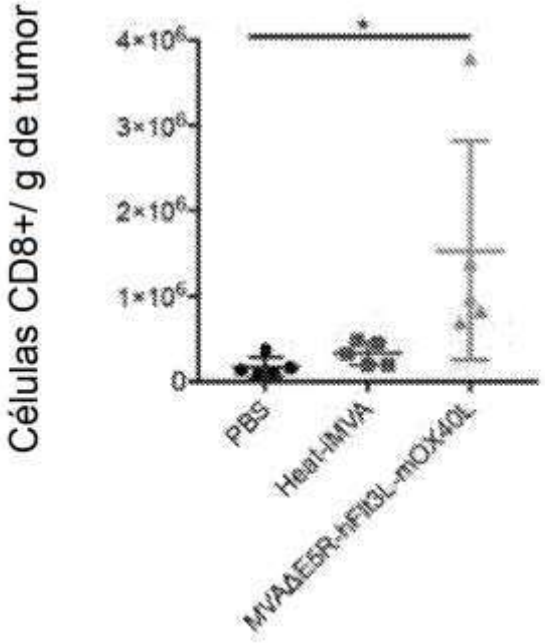


FIG. 127D

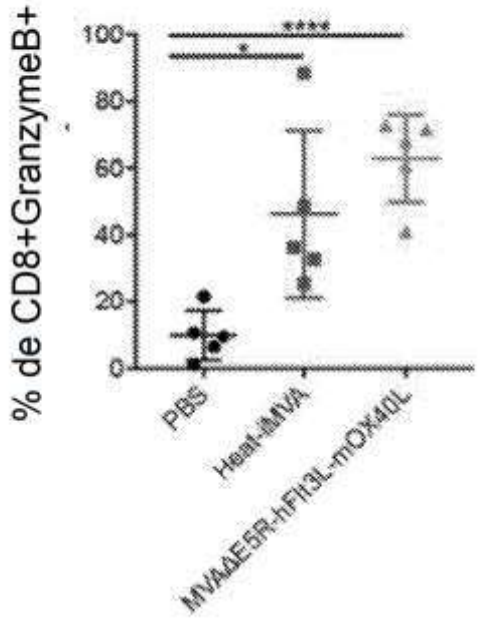


FIG. 127E

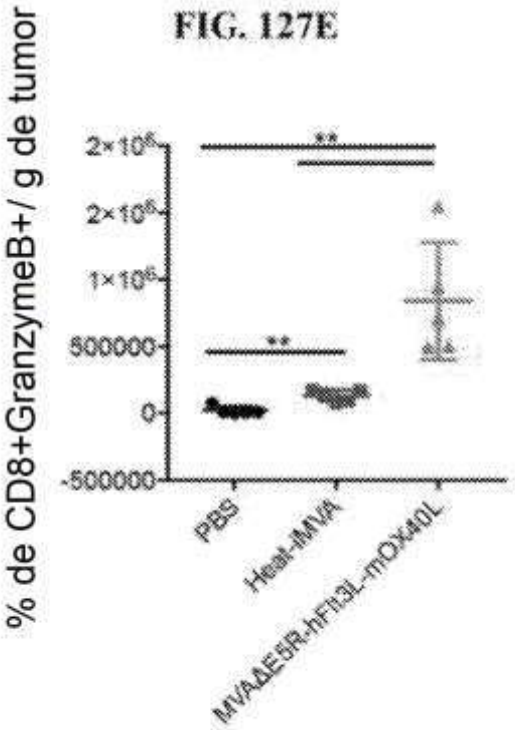


FIG. 128A

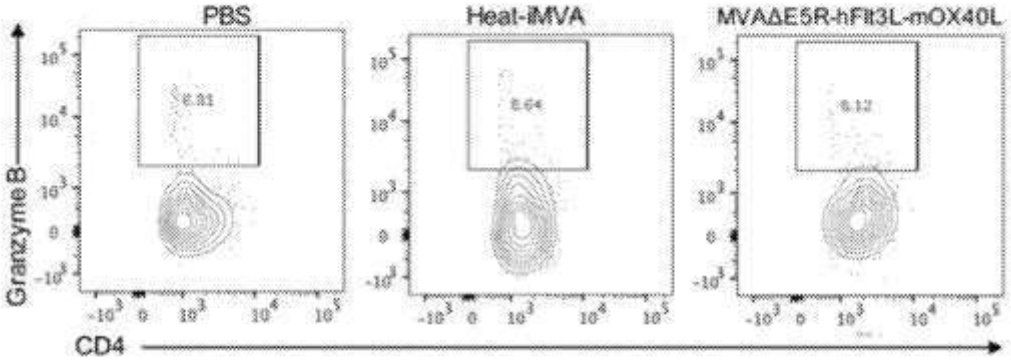


FIG. 128B

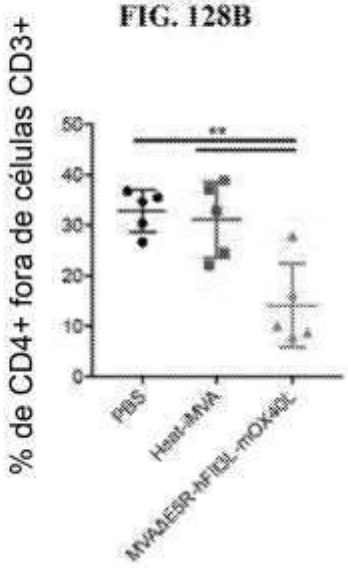


FIG. 128C

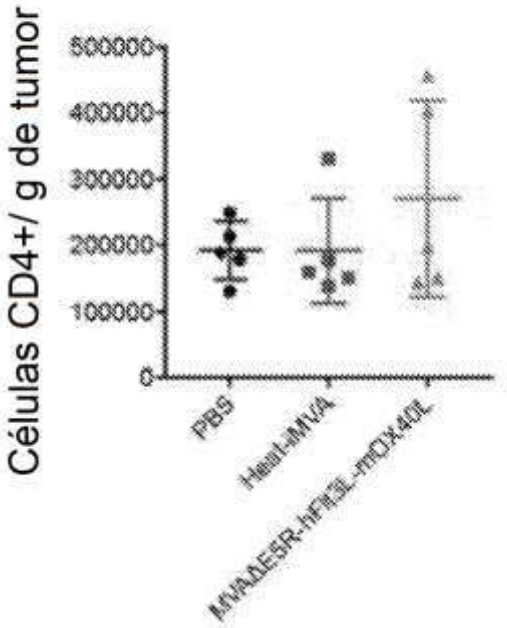


FIG. 128D

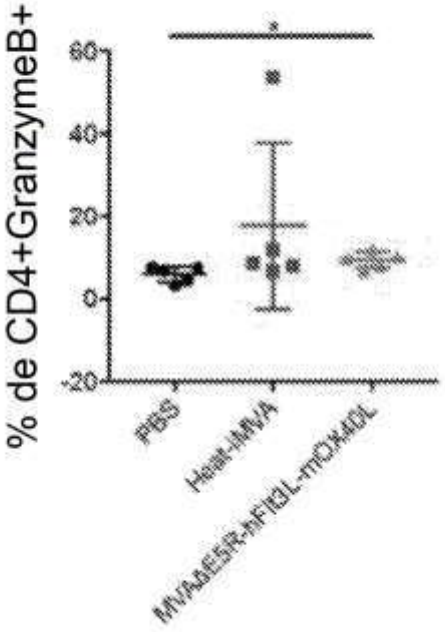


FIG. 128E

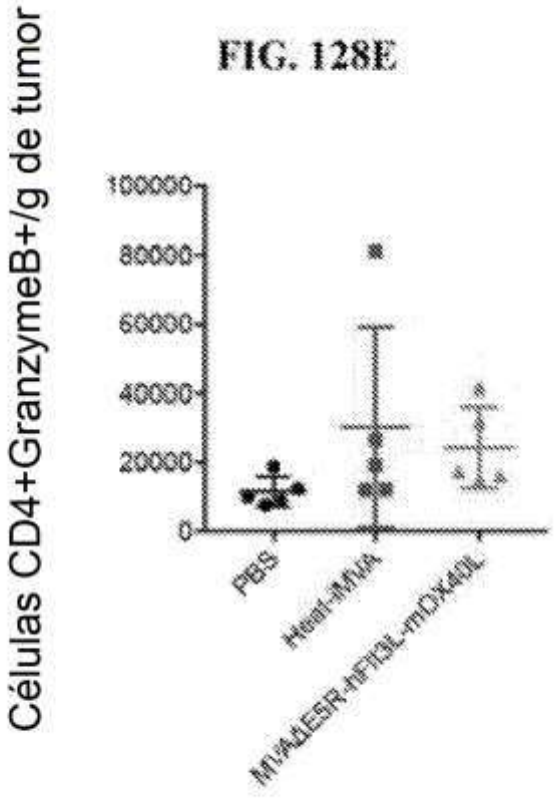

Células CD4+GranzymeB+/g de tumor
100000
80000
60000
40000
20000
0
PBS
H681-MVA
MVA/ESR-hFTGL-mOX40L

FIG. 129A

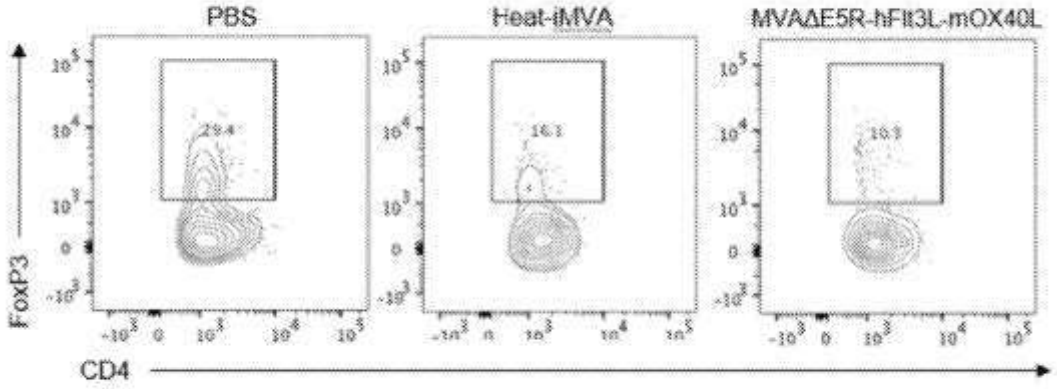


FIG. 129B

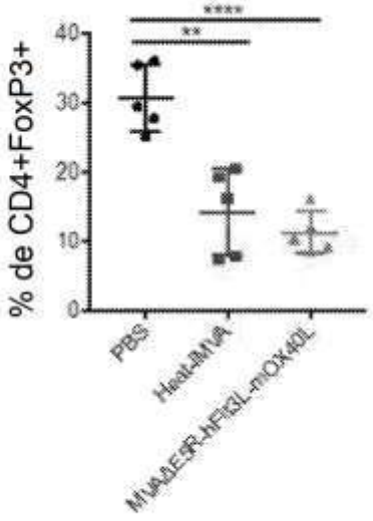


FIG. 129C

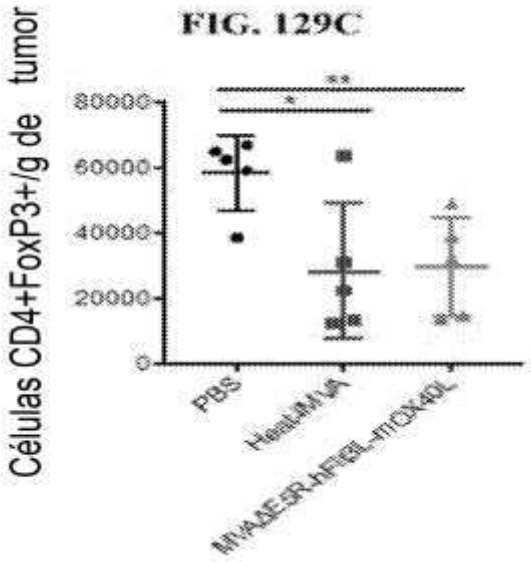

Células CD4+FoxP3+/g de tumor
80000
60000
40000
20000
0
**
*
PBS
HerkiMVA
MVA-mE5R-hFltBL-mTOX40L

FIG. 130

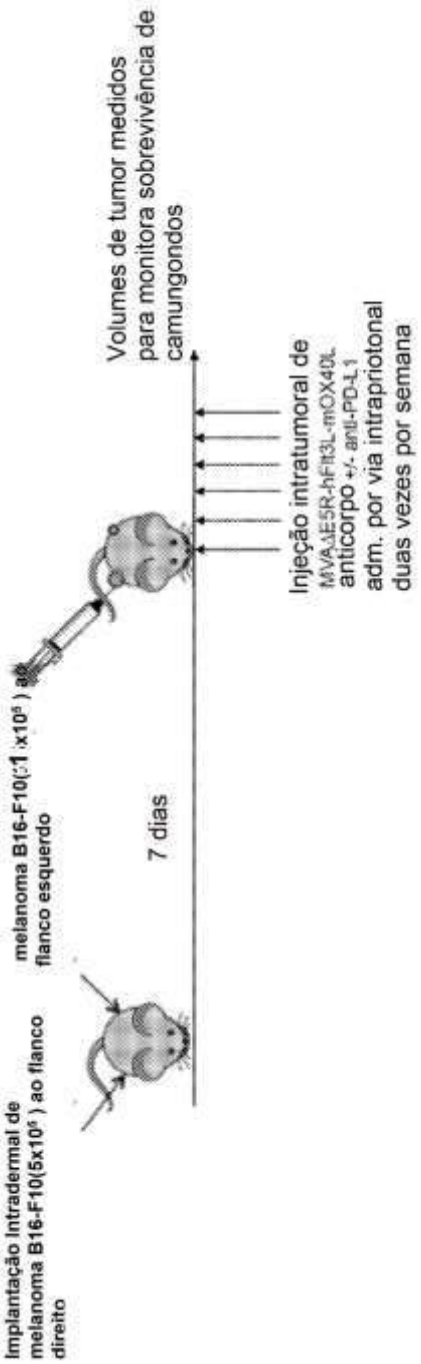

Implantação Intradermal de melanoma B16-F10(5x10⁵) ao flanco direito
melanoma B16-F10(0.1 x10⁶) ao flanco esquerdo
7 dias
Injeção intratumoral de MVA-E5R-hFlt3L-mOX40L anticorpo +/- anti-PD-L1 adm. por via intraprioronal duas vezes por semana
Volumes de tumor medidos para monitora sobrevivência de camungondos

FIG. 131A

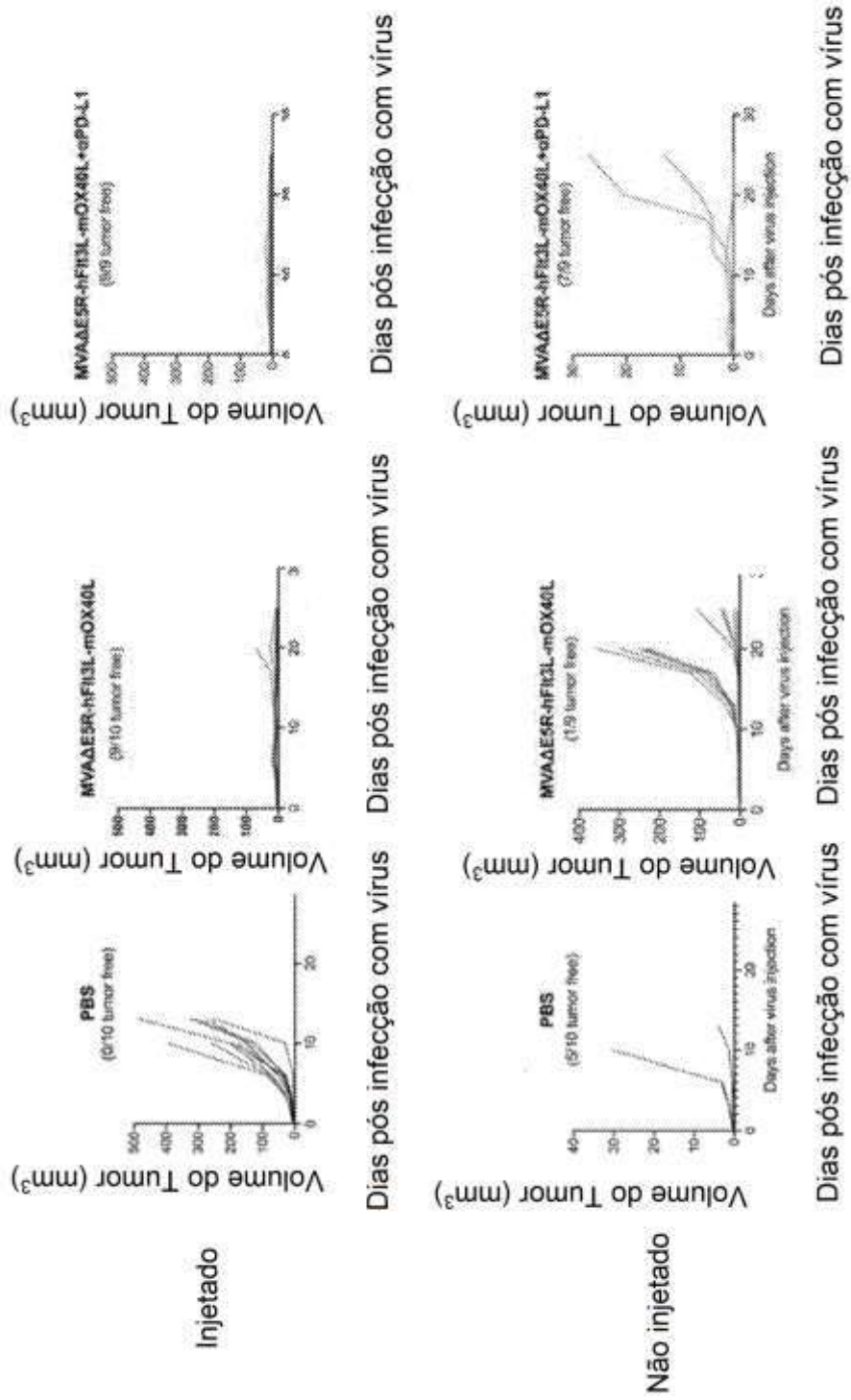

Não injetado
Injetado
PBS
(0/10 tumor free)
MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L
(3/10 tumor free)
MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L
(1/9 tumor free)
MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L+αPD-L1
(8/9 tumor free)
MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L+αPD-L1
(7/9 tumor free)
Volume do Tumor (mm3)
Dias pós infecção com vírus
Days after virus injection

FIG. 131B

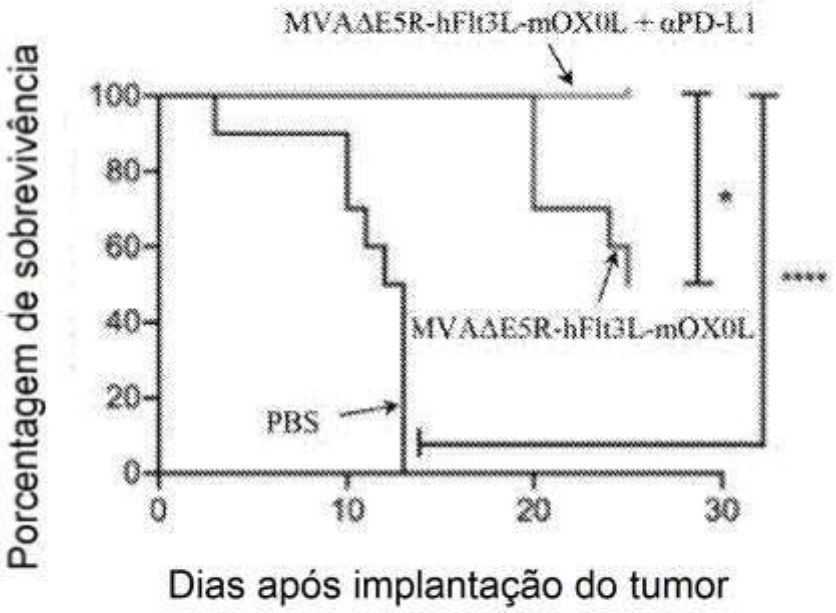

MVAΔE5R-hFlt3L-mOX0L + αPD-L1
MVAΔE5R-hFlt3L-mOX0L
PBS
*
****
Porcentagem de sobrevivência
100
80
60
40
20
0
0
10
20
30
Dias após implantação do tumor

FIG. 132A

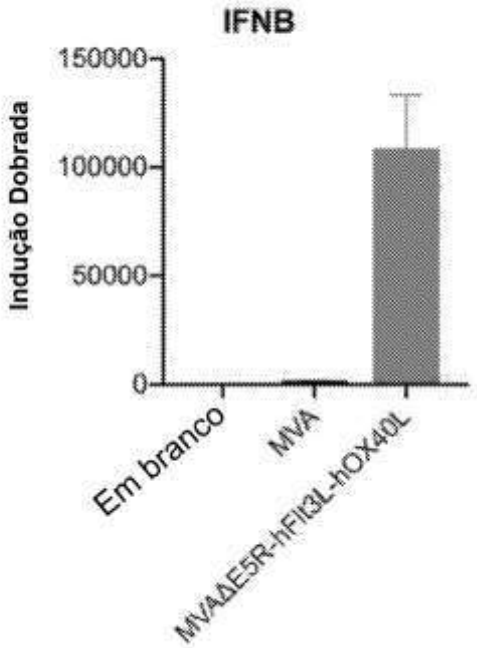


FIG. 132B

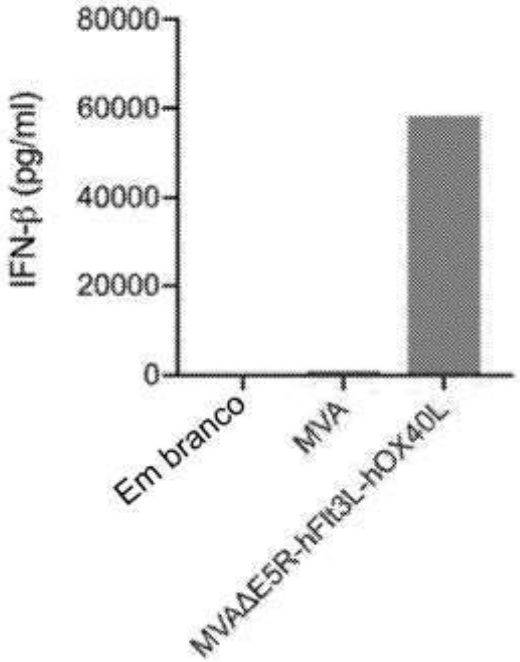


FIG. 133A

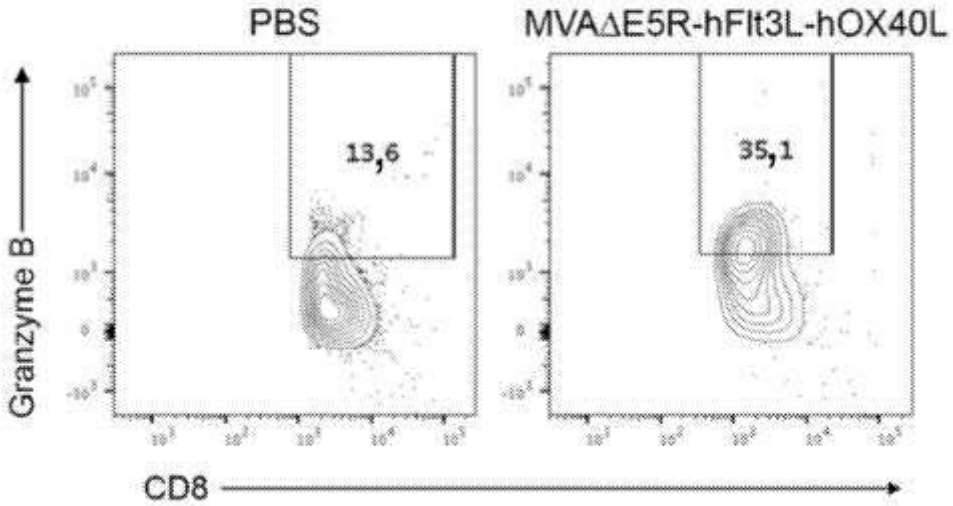


FIG. 133B

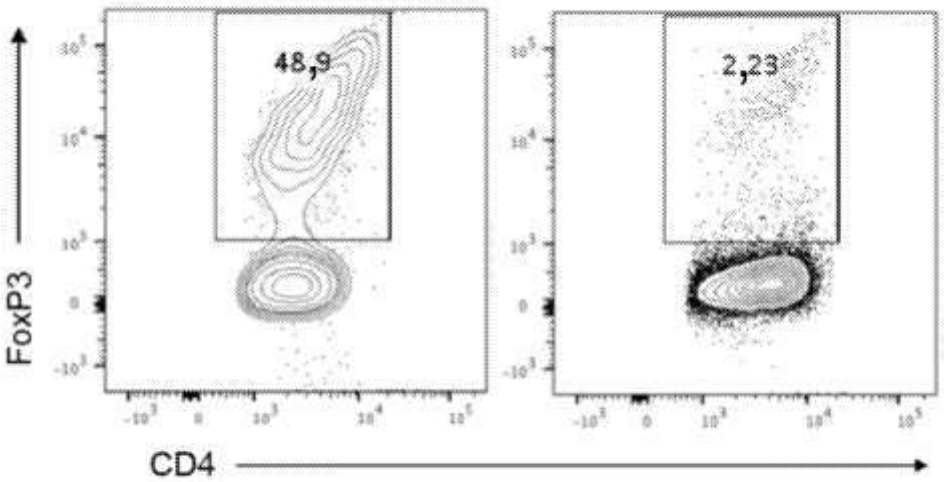


FIG. 134A

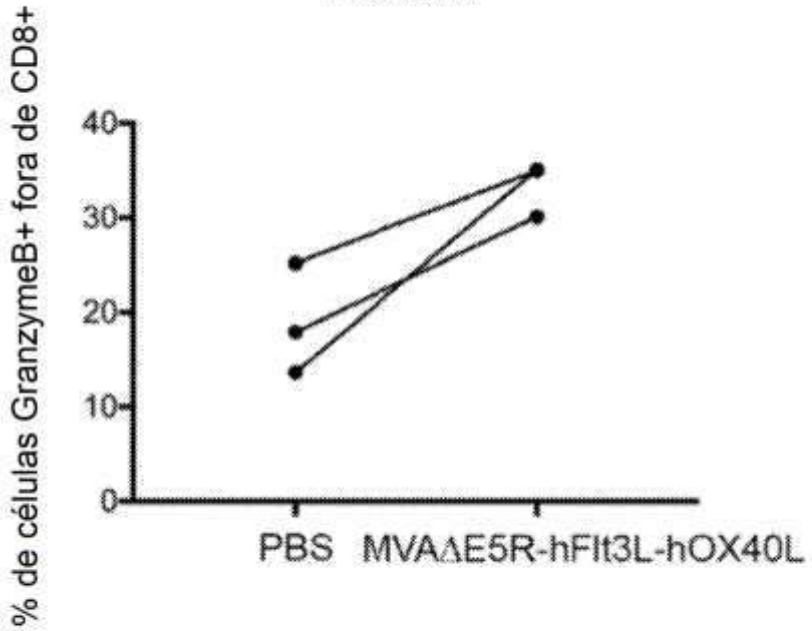


FIG. 134B

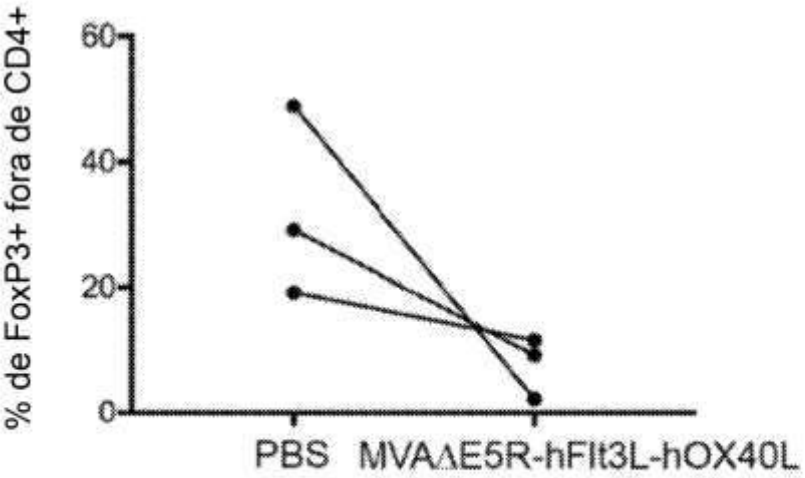


FIG. 135A

Plasmídeo para deleção E5R

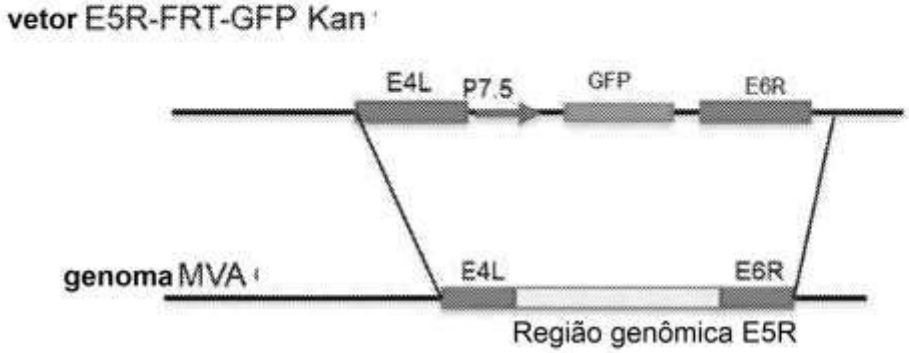


FIG. 135B

Plasmídeo para deleção E5R e inserção hFlt3L-mOX40L

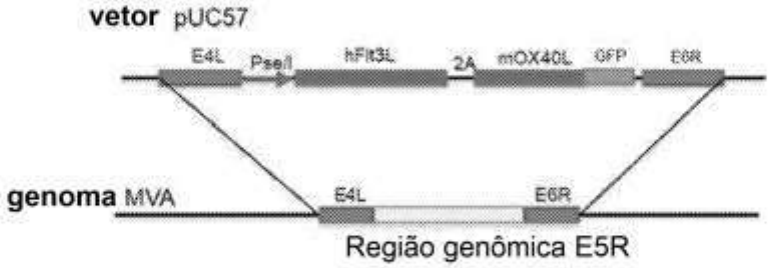


FIG. 135C

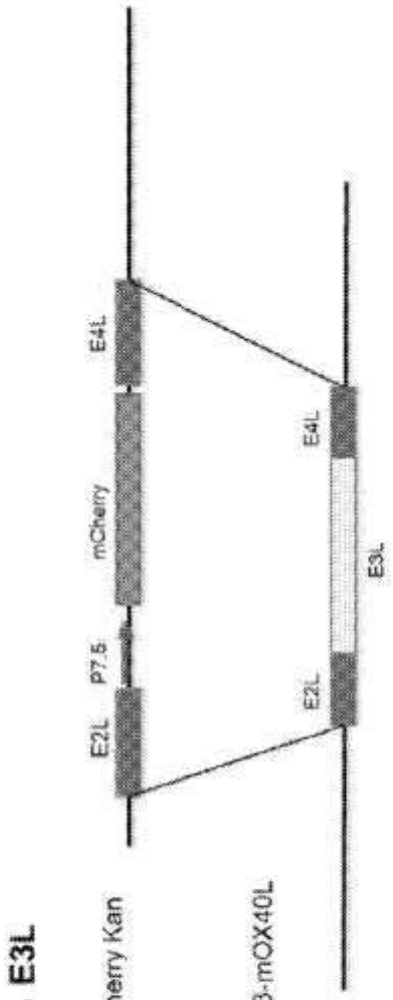

Plasmídeo para deleção E3L
vetor E3L-FRT-mCherry Kan
E2L
P7.5
mCherry
E4L
genoma MVAΔE5R-hFlt3-mOX40L
MVAΔE5R
E2L
E4L
E3L

FIG. 136

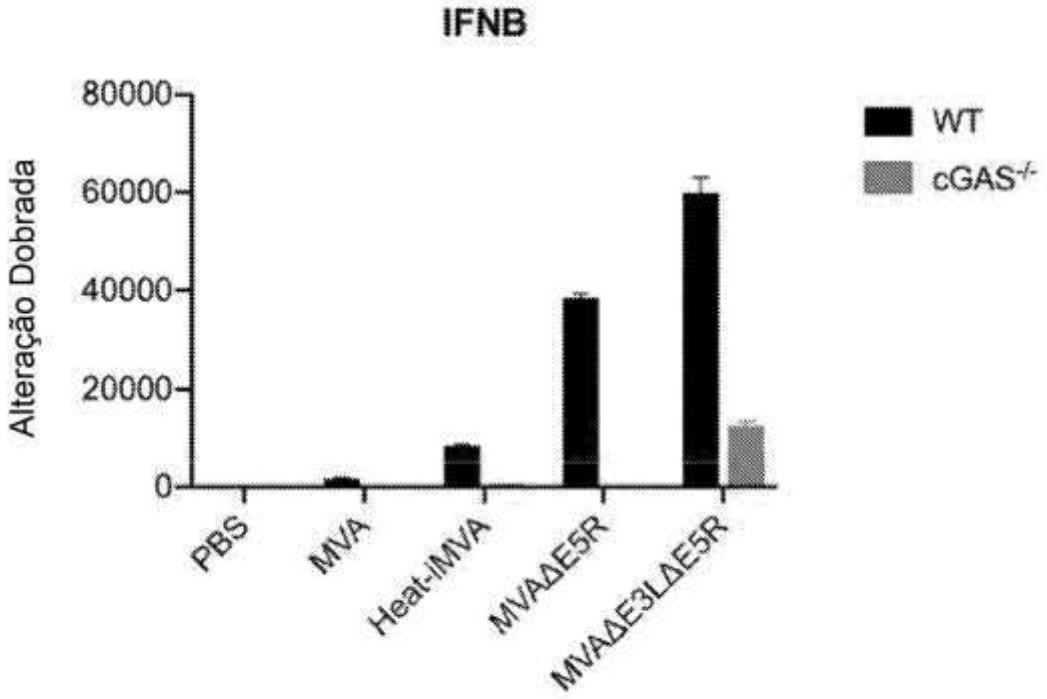

IFNB
Alteração Dobrada
80000
60000
40000
20000
0
WT
cGAS-/-
PBS
MVA
Heat-IMVA
MVAΔE5R
MVAΔE3LΔE5R

FIG. 137A

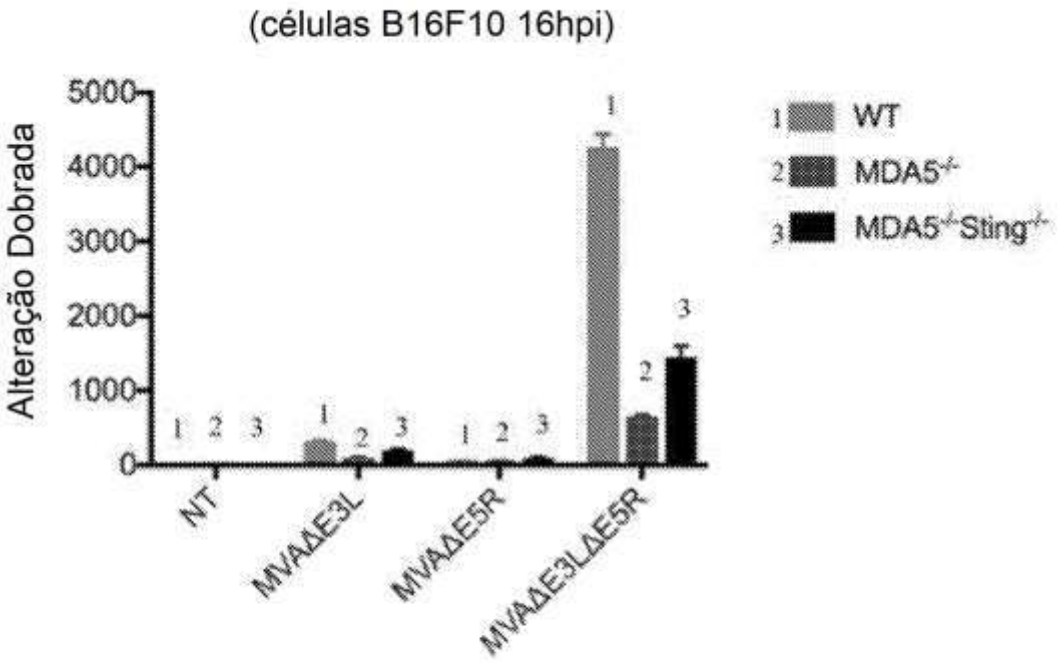


FIG. 137B

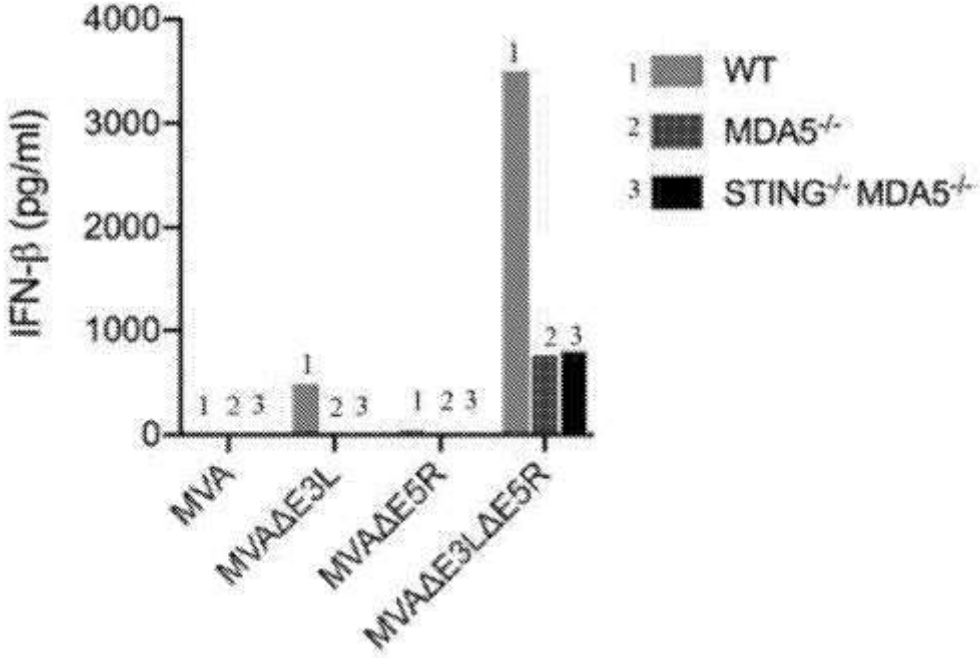


FIG. 138

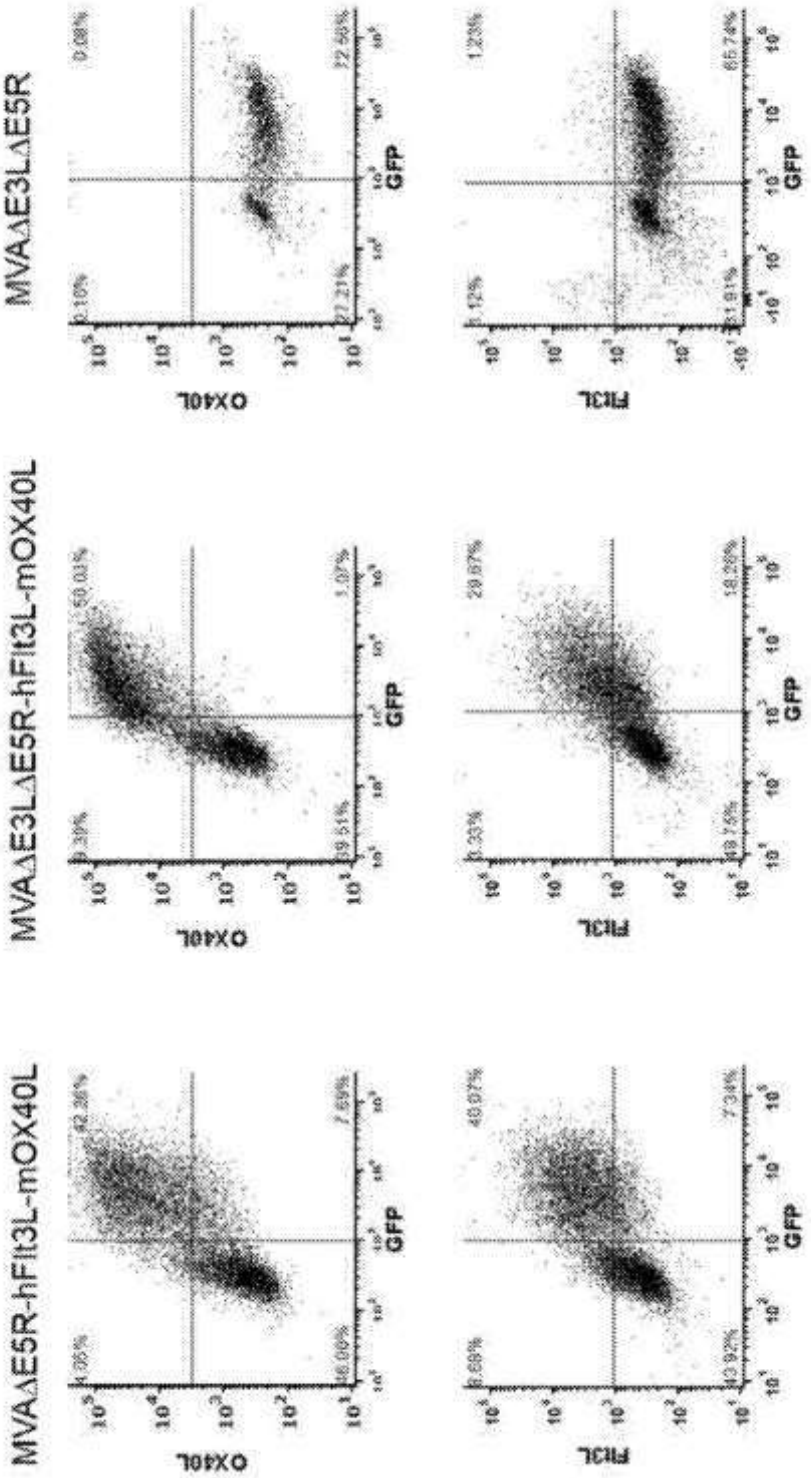

MVAΔE3LΔE5R
MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40L
MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L
OX40L
GFP
Flt3L
GFP

FIG. 139A

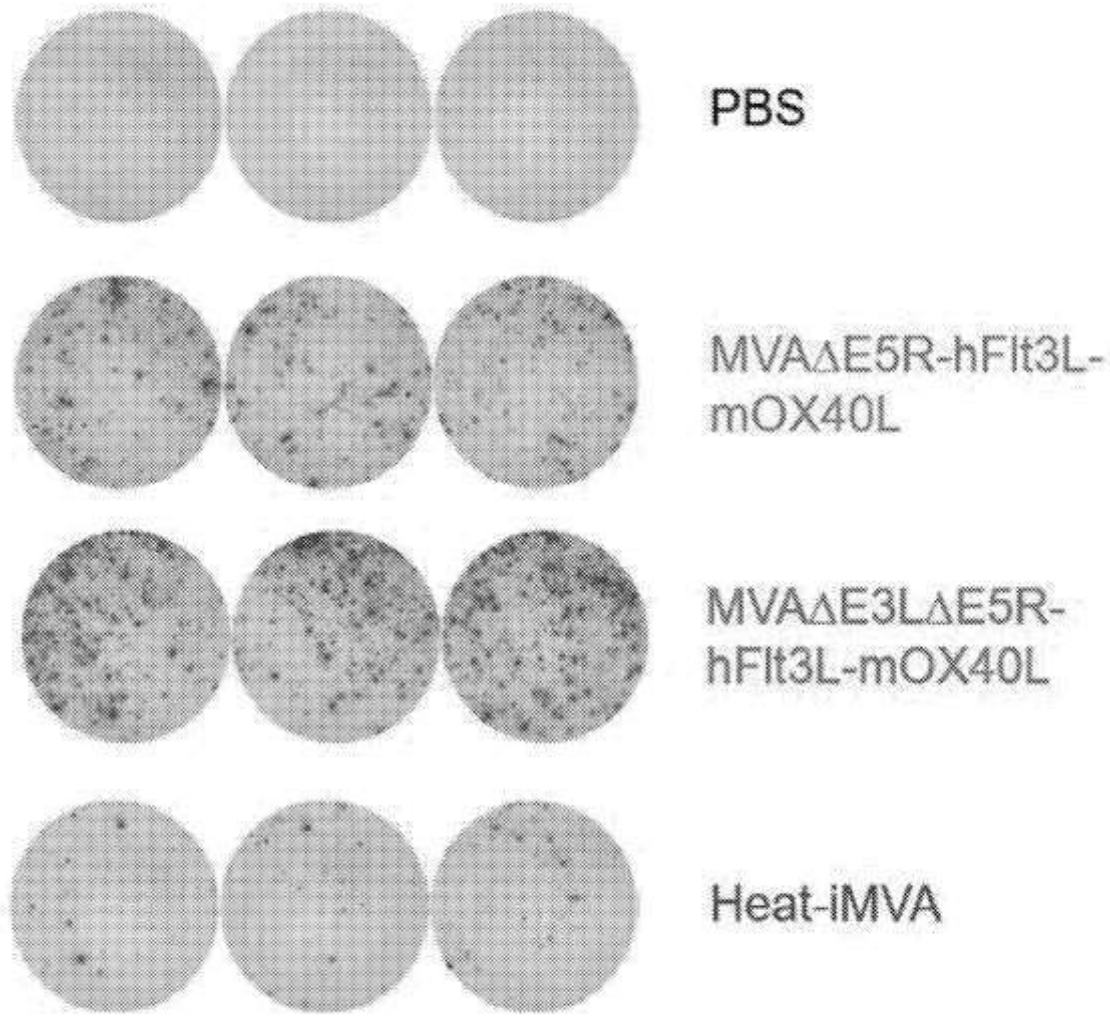

PBS
MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L
MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40L
Heat-iMVA

FIG. 139B

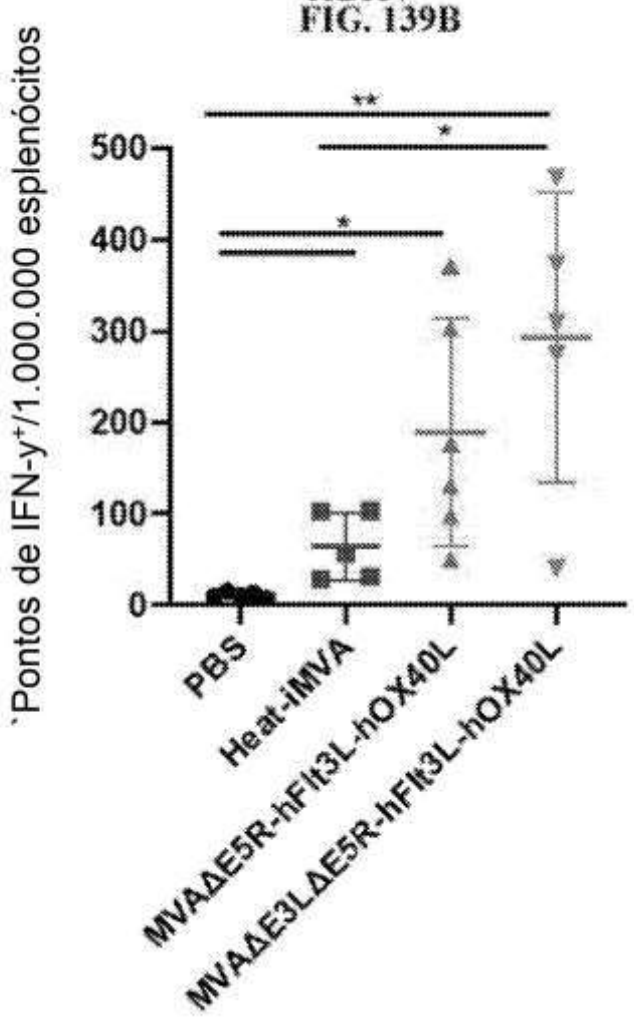

`Pontos de IFN-γ+/1.000.000 esplenócitos
500
400
300
200
100
0
**
*
*
PBS
Heat-iMVA
MVAΔE5R-hFlt3L-hOX40L
MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-hOX40L

FIG. 140

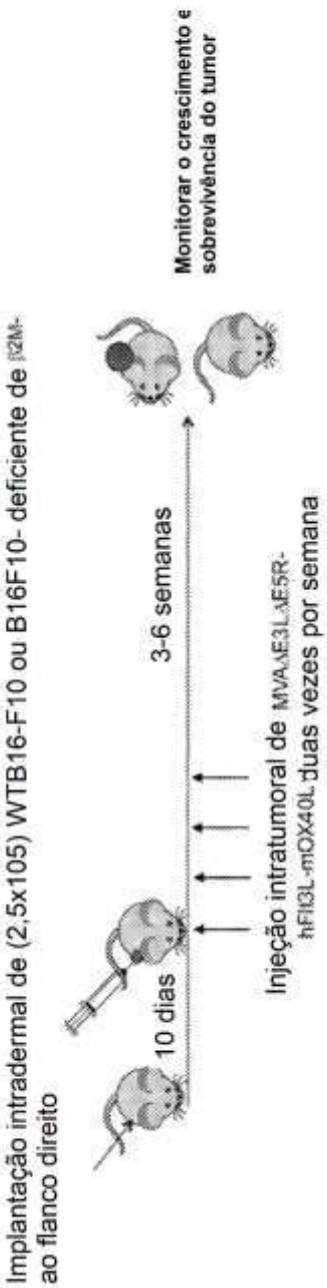

Implantação intradermal de (2,5x105) WTB16-F10 ou B16F10- deficiente de β2M- ao flanco direito
10 dias
3-6 semanas
Injeção intratumoral de MVAΔE3LΔE5R-hFl3L-mOX40L duas vezes por semana
Monitorar o crescimento e sobrevivência do tumor

FIG. 141A

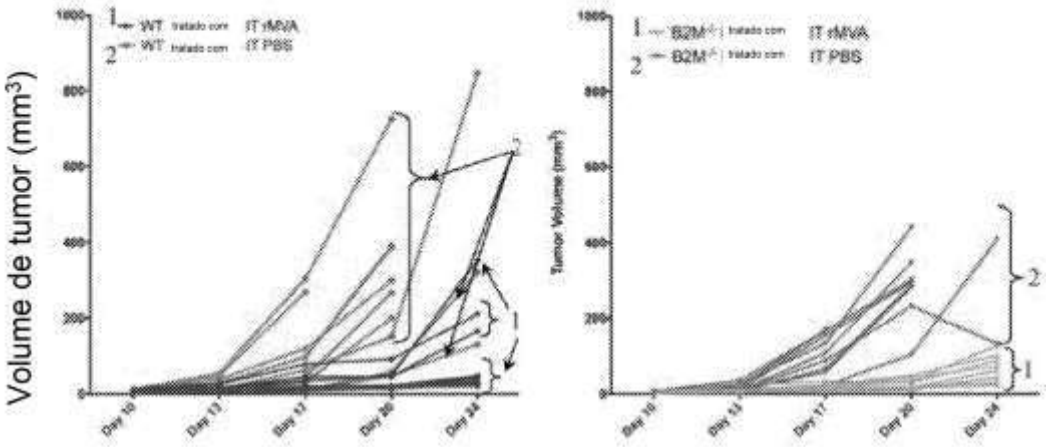


FIG. 141B

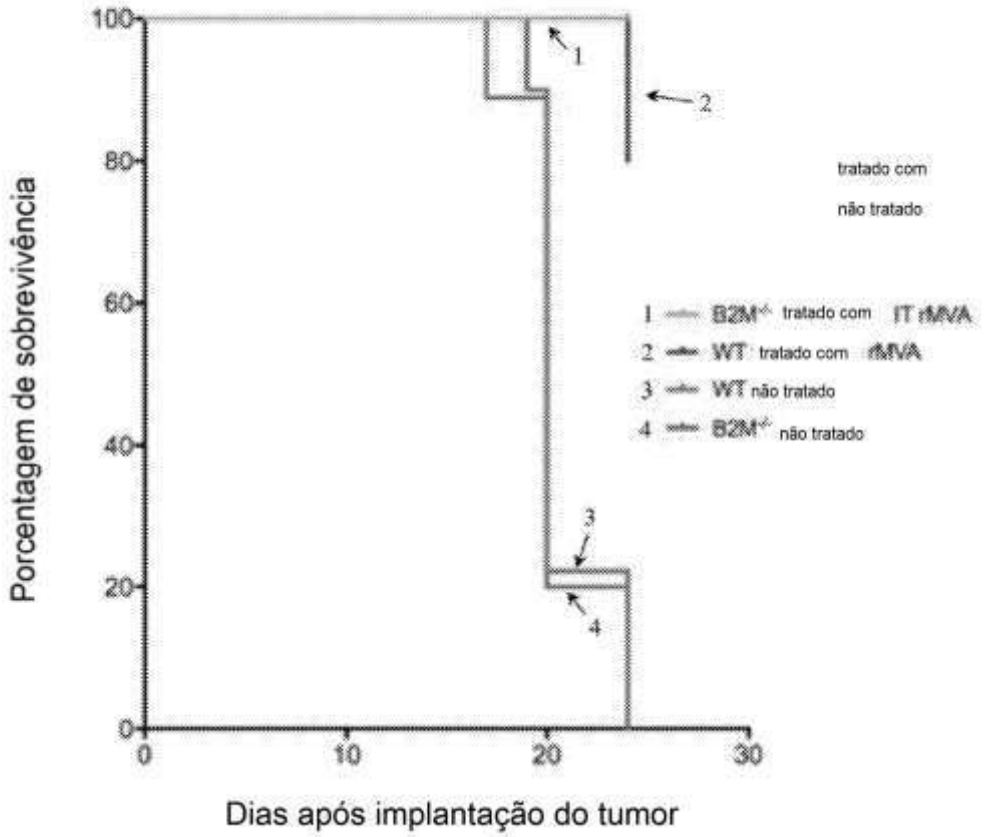


FIG. 142

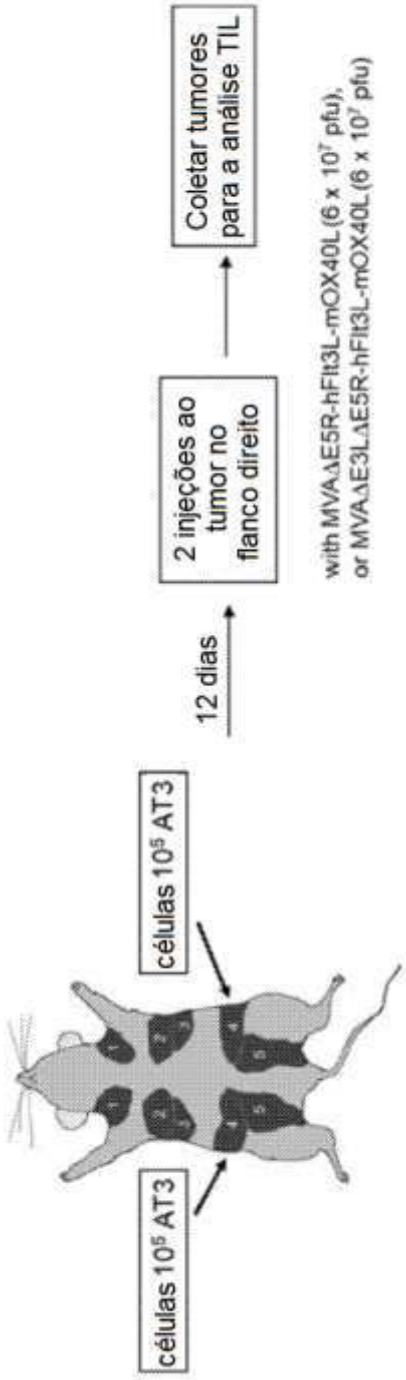

células 10^5 AT3
células 10^5 AT3
12 dias
2 injeções ao tumor no flanco direito
Coletar tumores para a análise TIL
with MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L(6 x 10^7 pfu),
or MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40L(6 x 10^7 pfu)

FIG. 143A

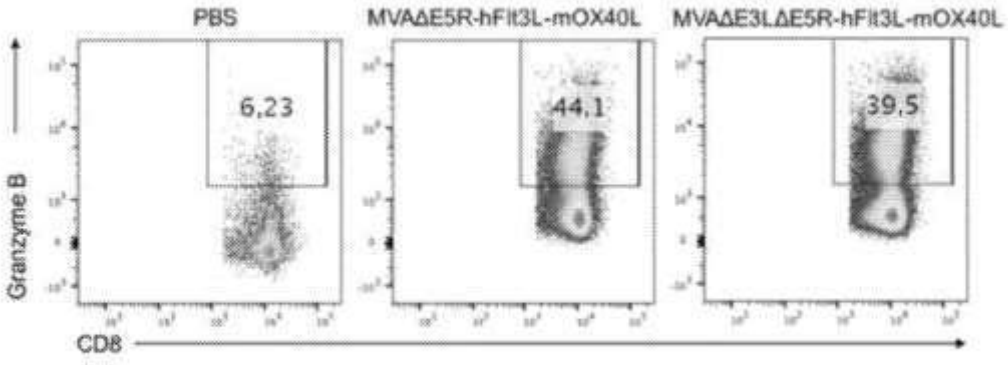


FIG. 143B

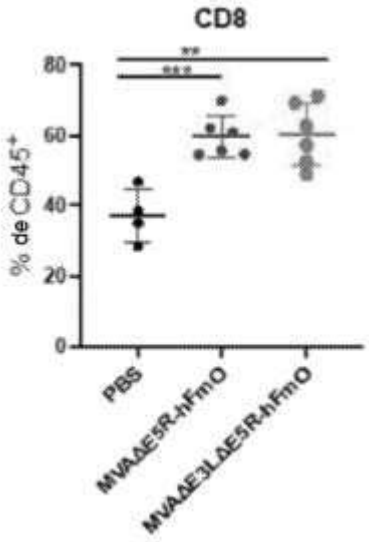


FIG. 143C

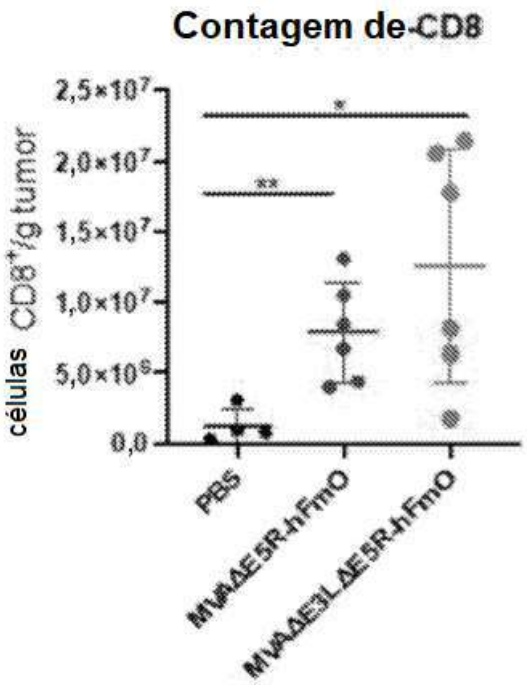


FIG. 143D

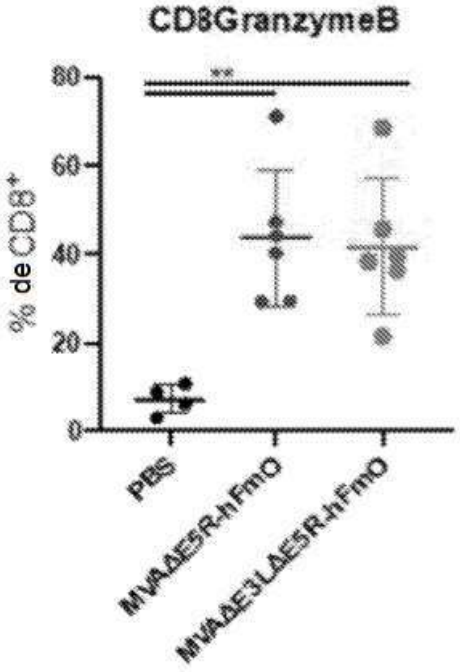


FIG. 143E

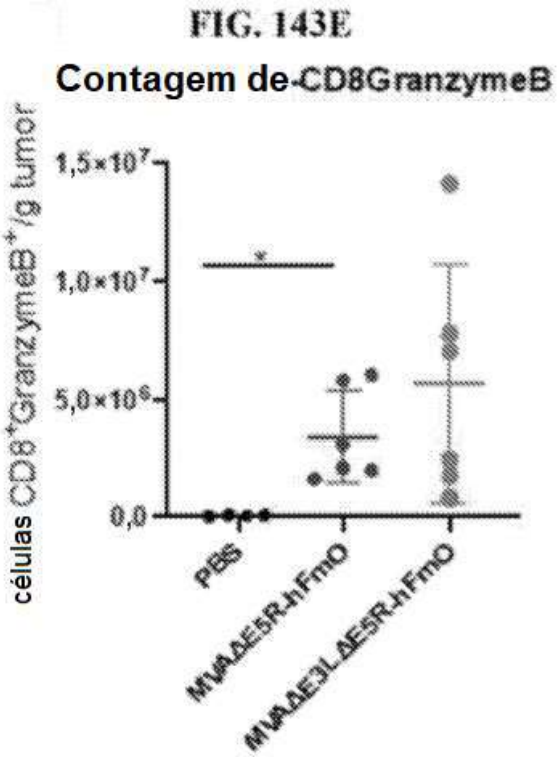

Contagem de-CD8GranzymeB
células CD8+GranzymeB+/g tumor
1,5×10^7
1,0×10^7
5,0×10^6
0,0
*
PBS
MVAΔE5R-hFmO
MVAΔE3LΔE5R-hFmO

FIG. 144A

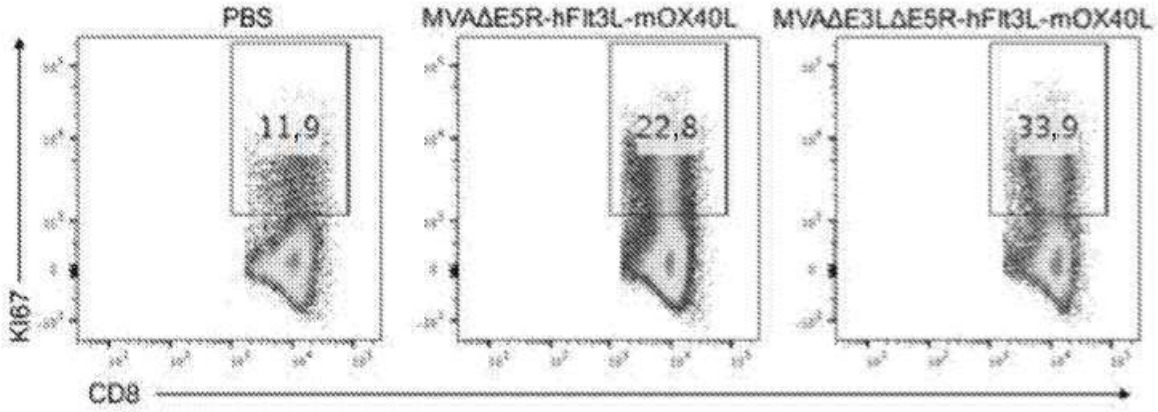


FIG. 144B

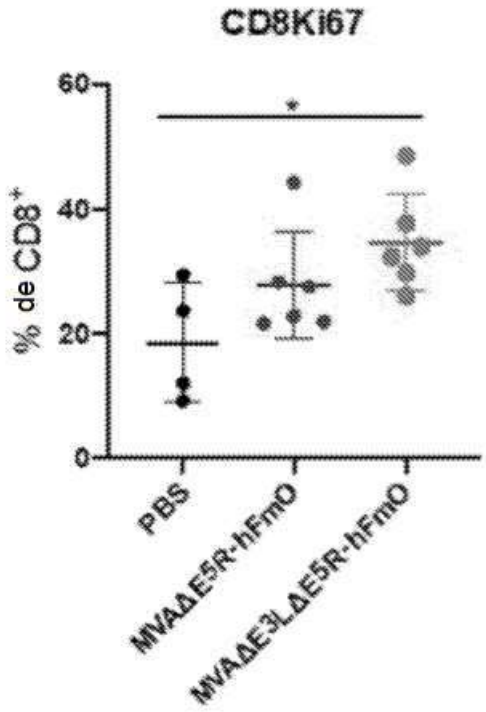


FIG. 144C

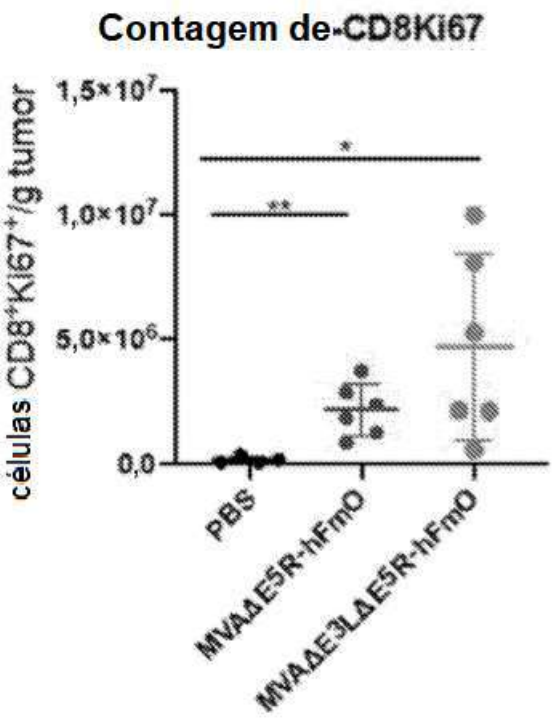

Contagem de-CD8Ki67
células CD8+Ki67+/g tumor
1,5×10^7
1,0×10^7
5,0×10^6
0,0
*
**
PBS
MVAΔE5R-hFmO
MVAΔE3LΔE5R-hFmO

FIG. 145A

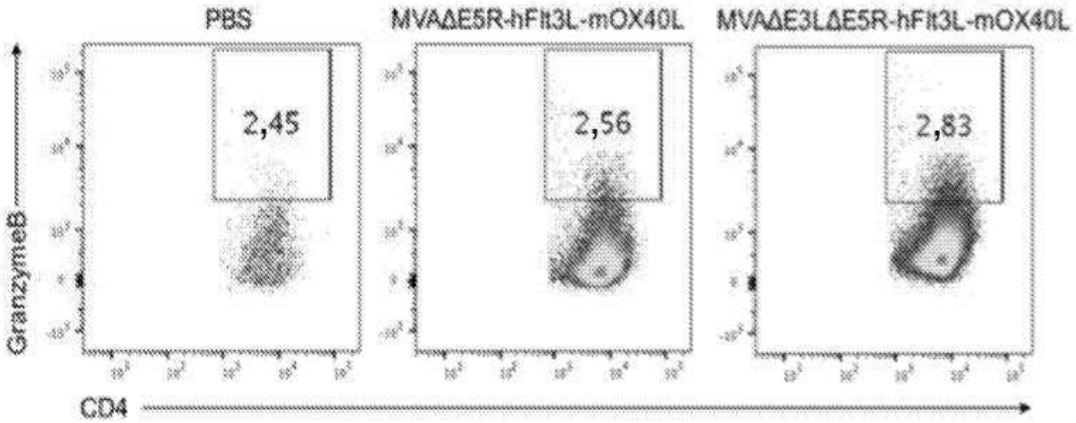


FIG. 145B

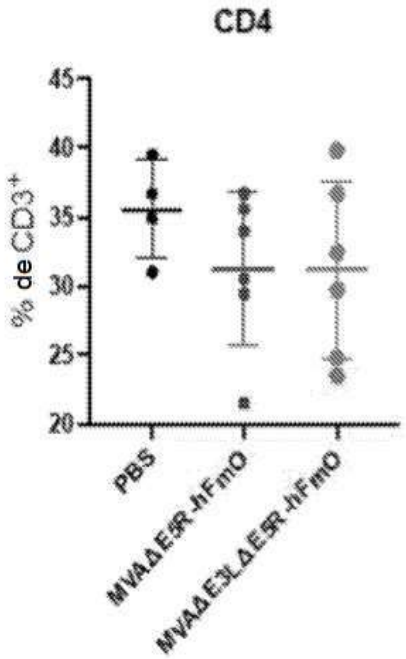


FIG. 145C

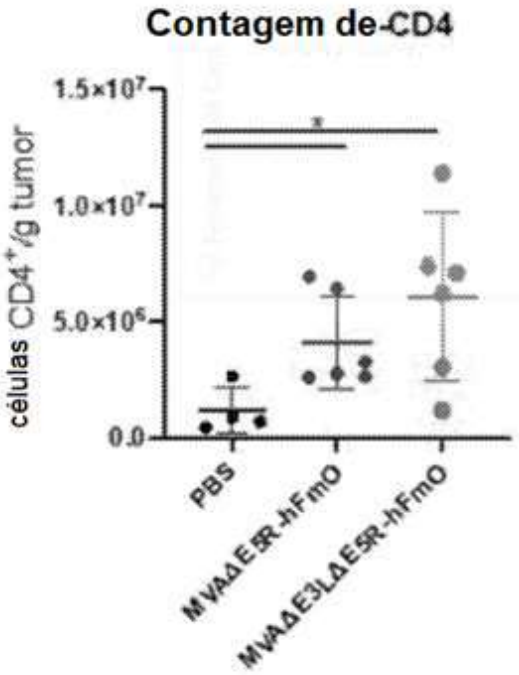


FIG. 145D

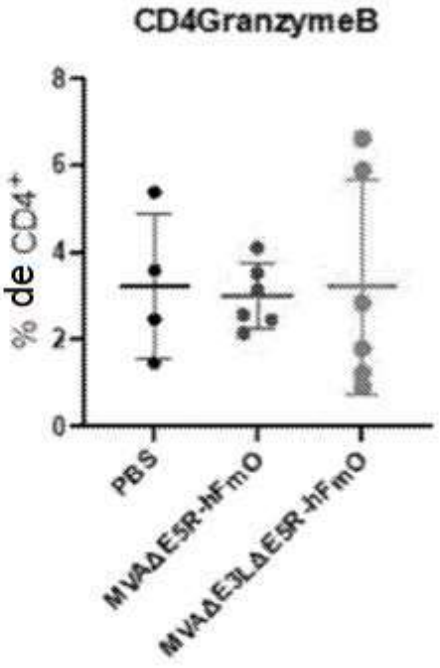


FIG. 145E

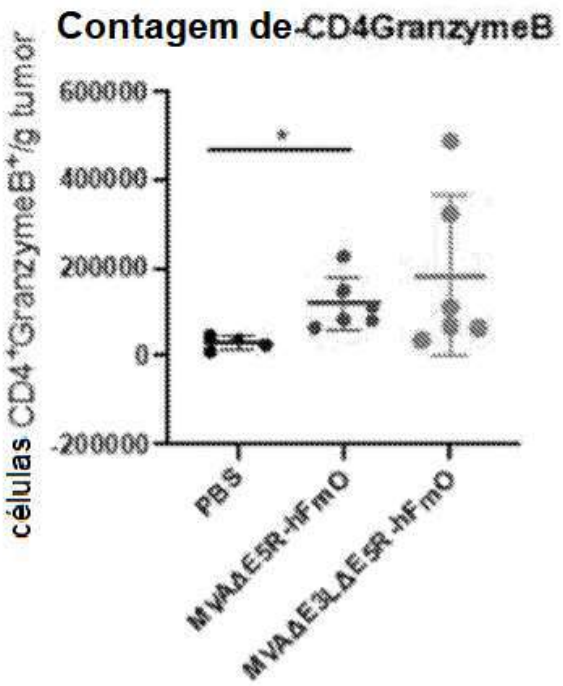

Contagem de-CD4GranzymeB
células CD4+GranzymeB+/g tumor
600000
400000
200000
0
-200000
*
PBS
MVAΔE5R-hFmO
MVAΔE3LΔE5R-hFmO

FIG. 146A

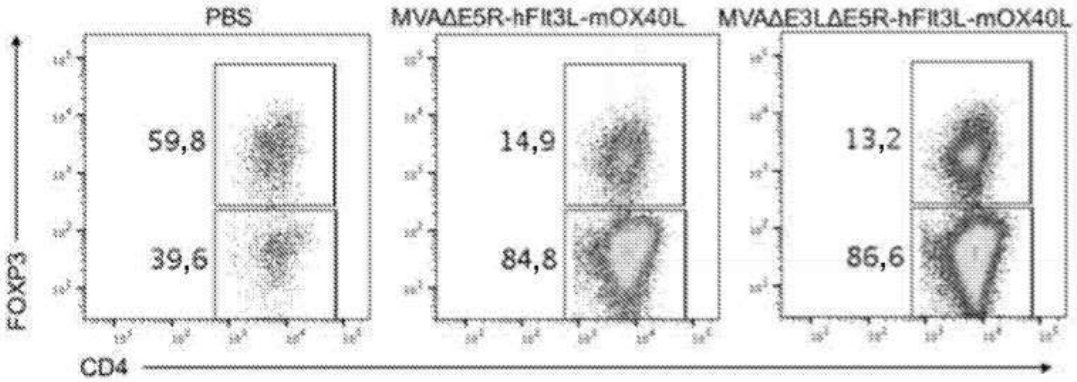

PBS
MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L
MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40L
59,8
39,6
14,9
84,8
13,2
86,6
FOXP3
CD4

FIG. 146B

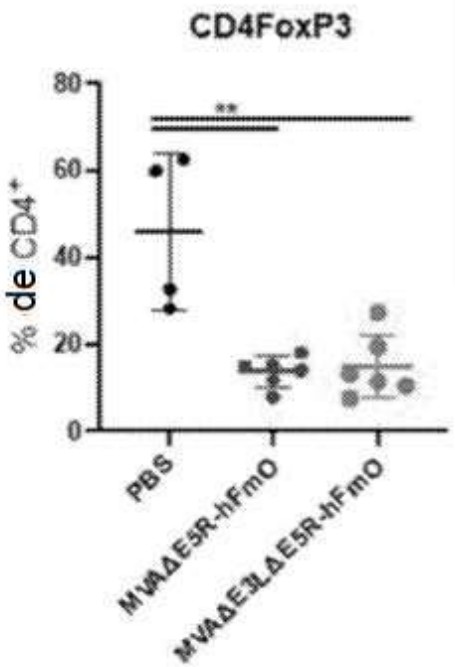


FIG. 146C

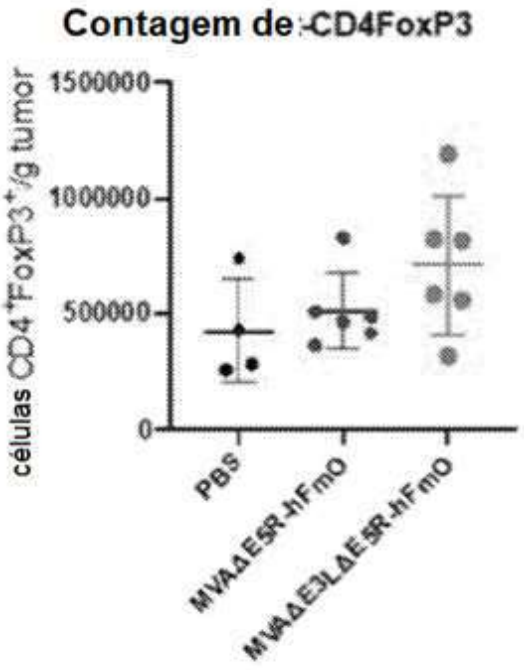


FIG. 147A

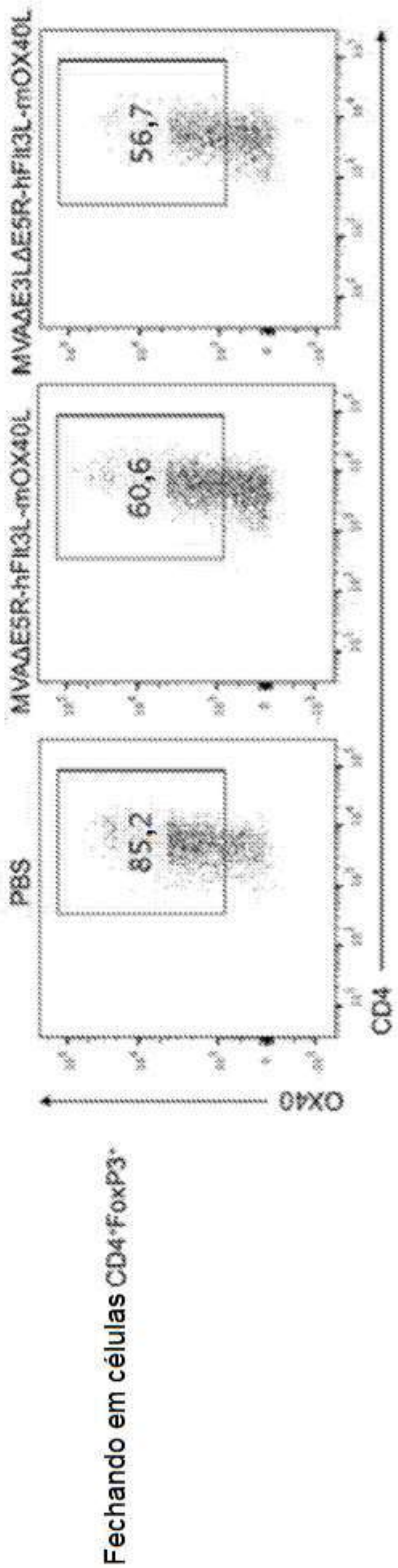

PBS
MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L
MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40L
85,2
60,6
56,7
OX40
CD4
Fechando em células CD4+FoxP3+

FIG. 147B

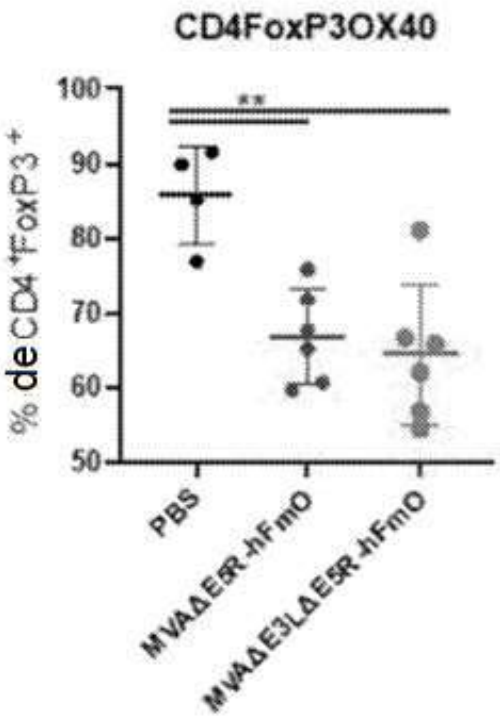


FIG. 147C

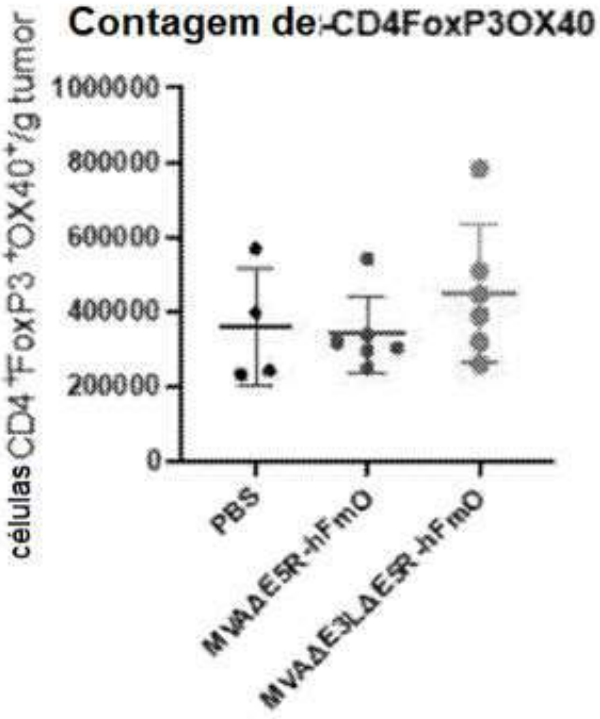


FIG. 148A

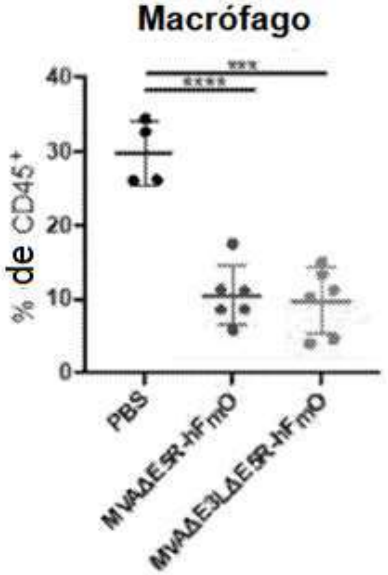


FIG. 148B

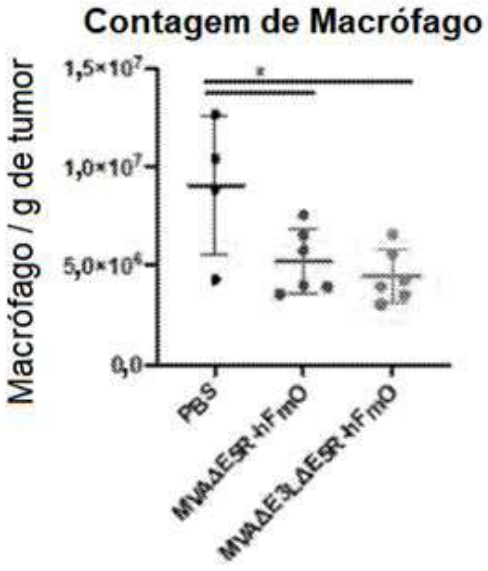


FIG. 148C

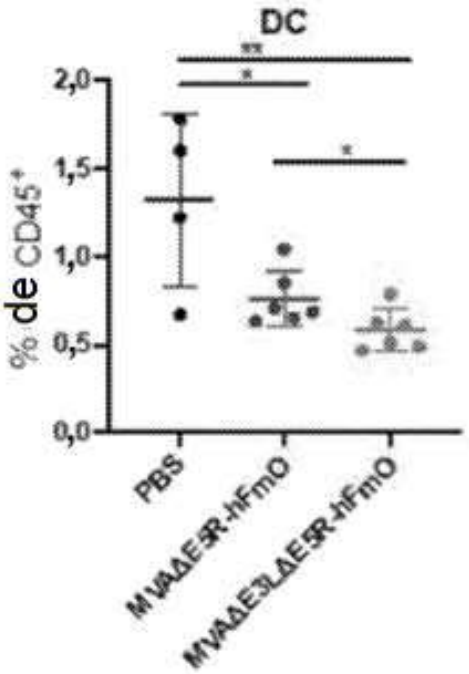


FIG. 148D

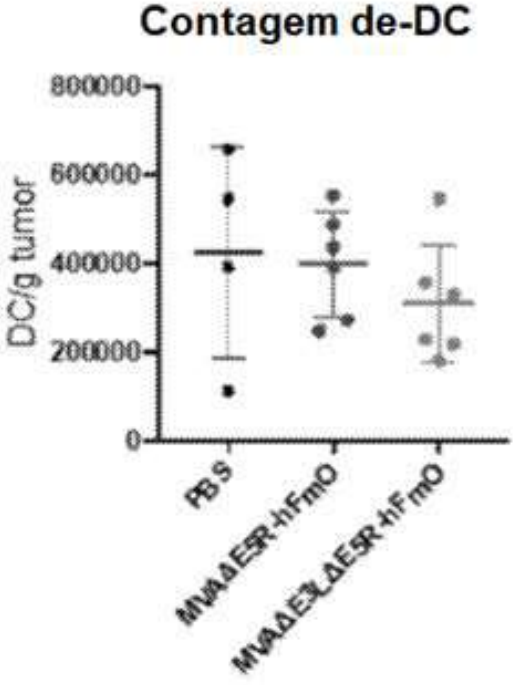


FIG. 148E

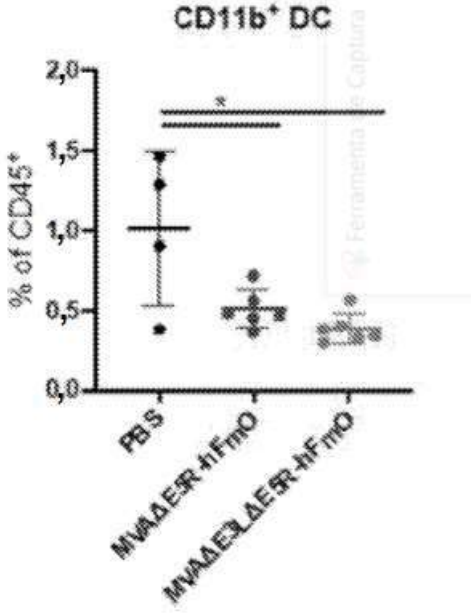


FIG. 148F

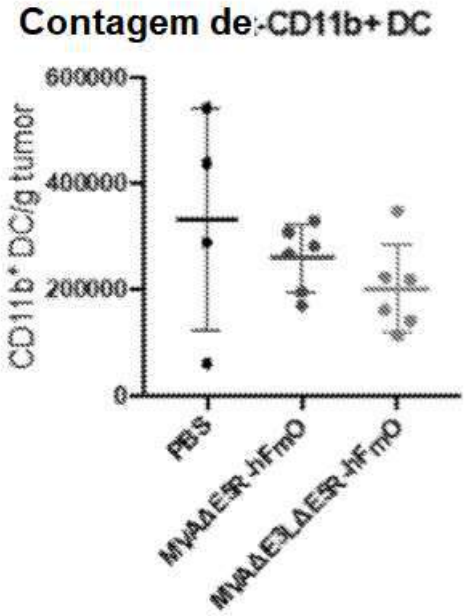


FIG. 148G

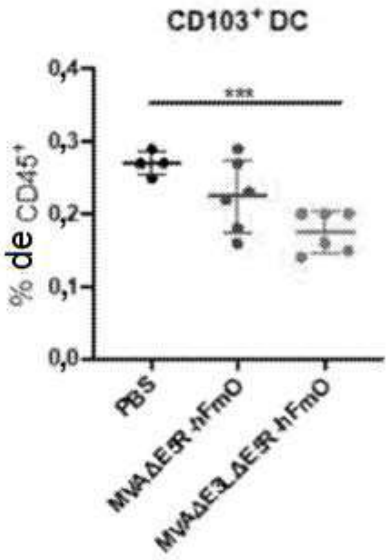


FIG. 148H

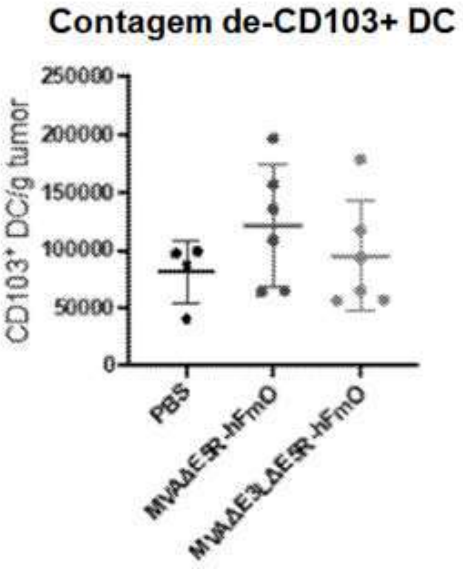


FIG. 149

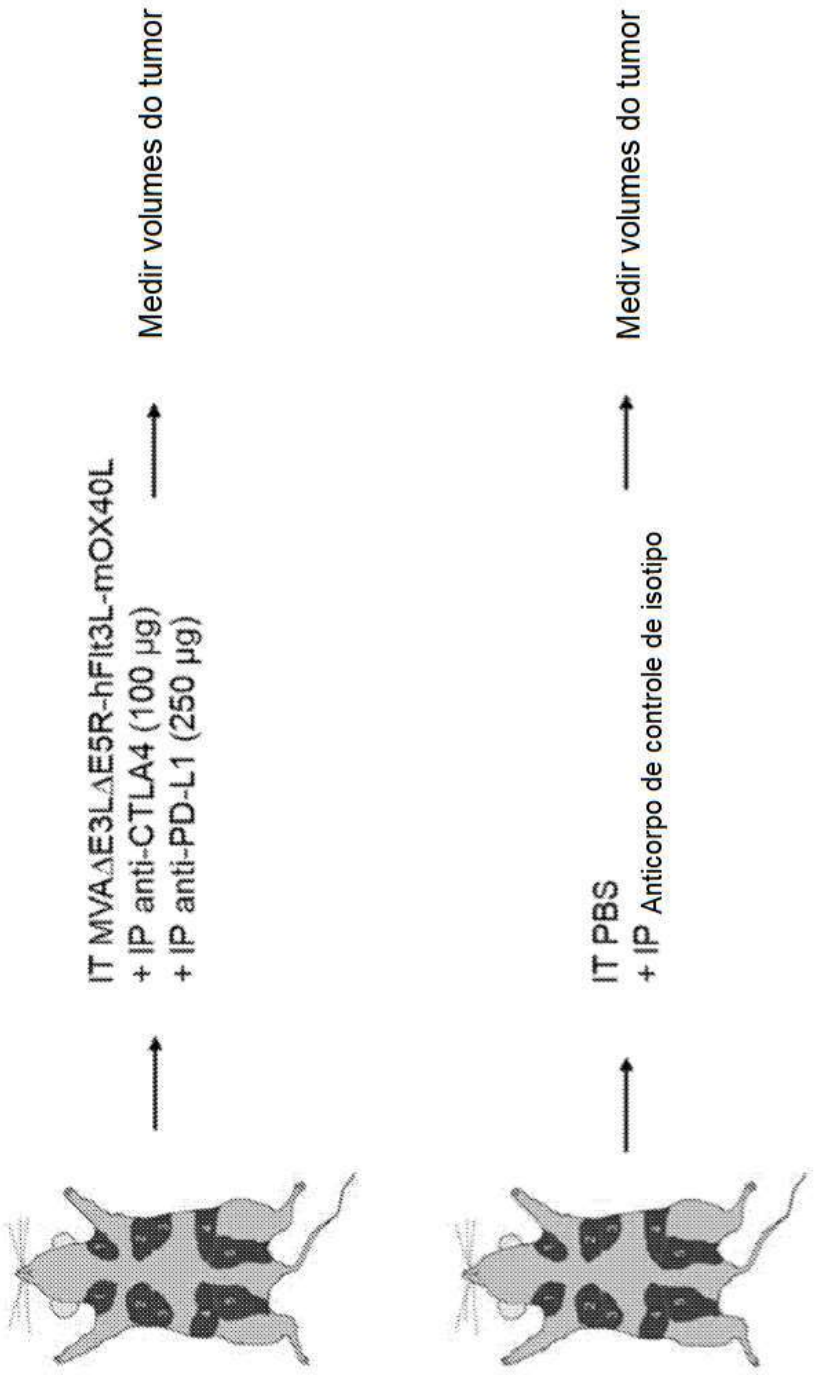
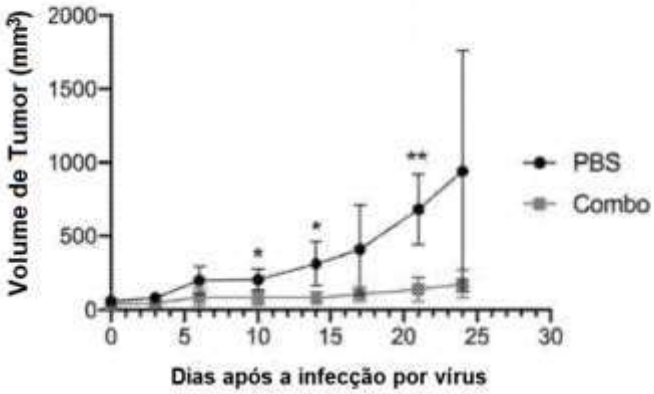

IT MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40L
+ IP anti-CTLA4 (100 µg)
+ IP anti-PD-L1 (250 µg)
Medir volumes do tumor
IT PBS
+ IP Anticorpo de controle de isotipo
Medir volumes do tumor

FIG. 150



Combo

IT MVAΔE3LΔE5R-hFlt3L-mOX40L
+ IP anti-CTLA4 (100 µg)
+ IP anti-PD-L1 (250 µg)

PBS

IT PBS
+ IP Anticorpo de controle de isotipo

FIG. 151

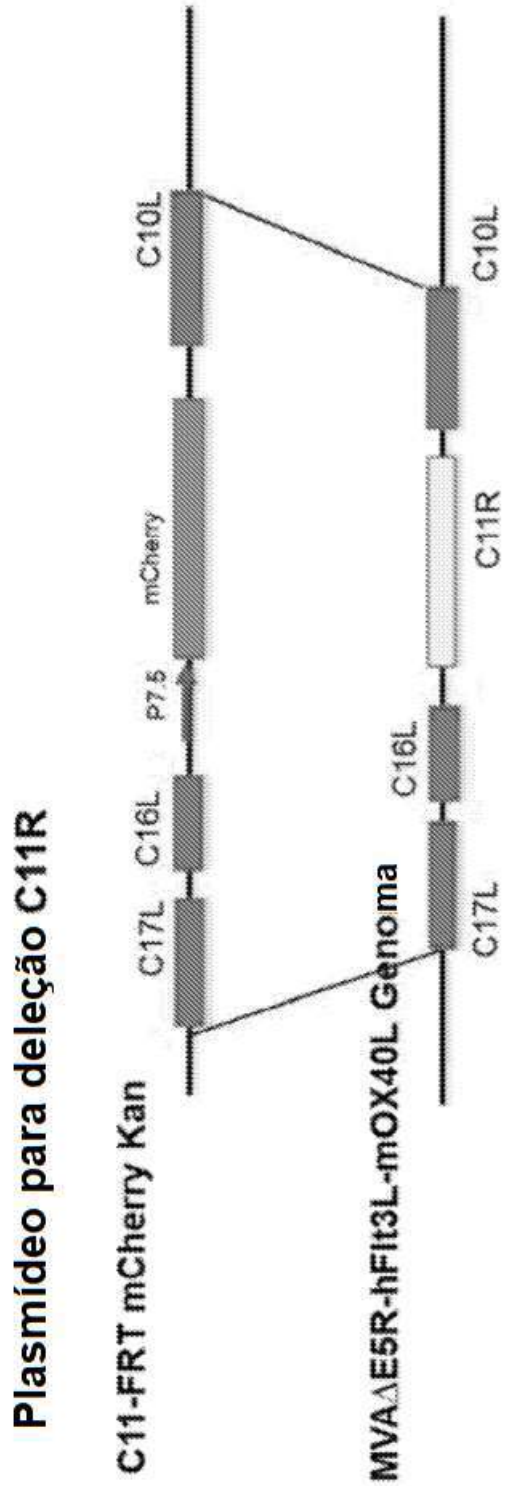

Plasmídeo para deleção C11R
C11-FRT mCherry Kan
C17L
C16L
P7.5
mCherry
C10L
MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L Genoma
C17L
C16L
C11R
C10L

FIG. 152A

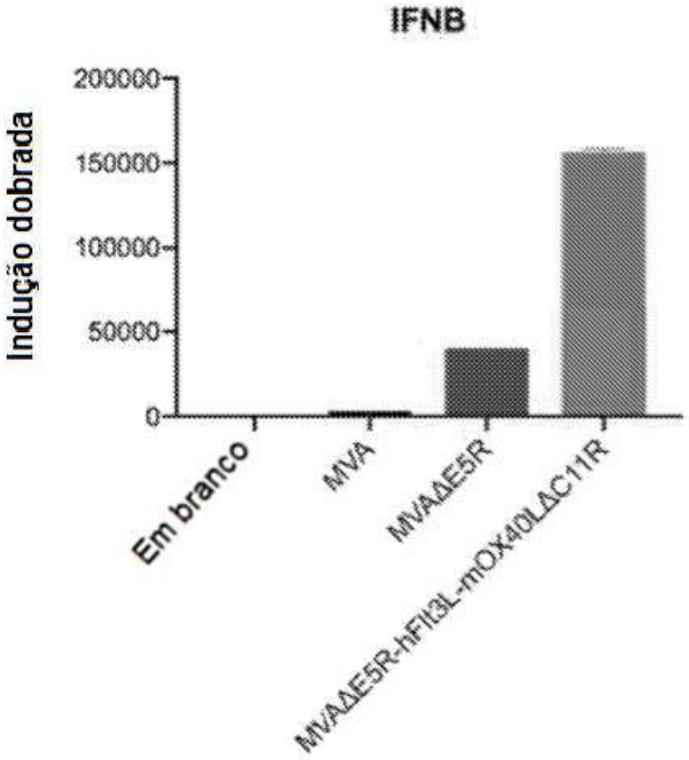


FIG. 152B

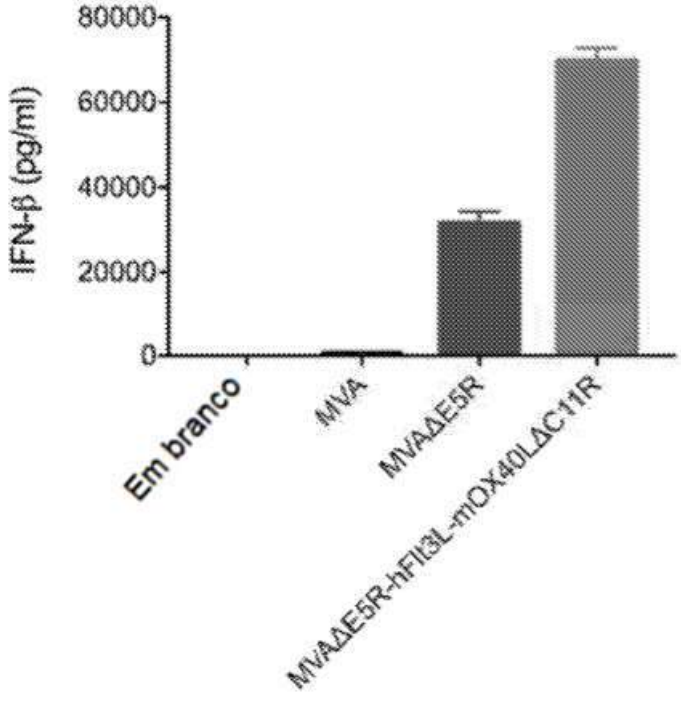


FIG. 153

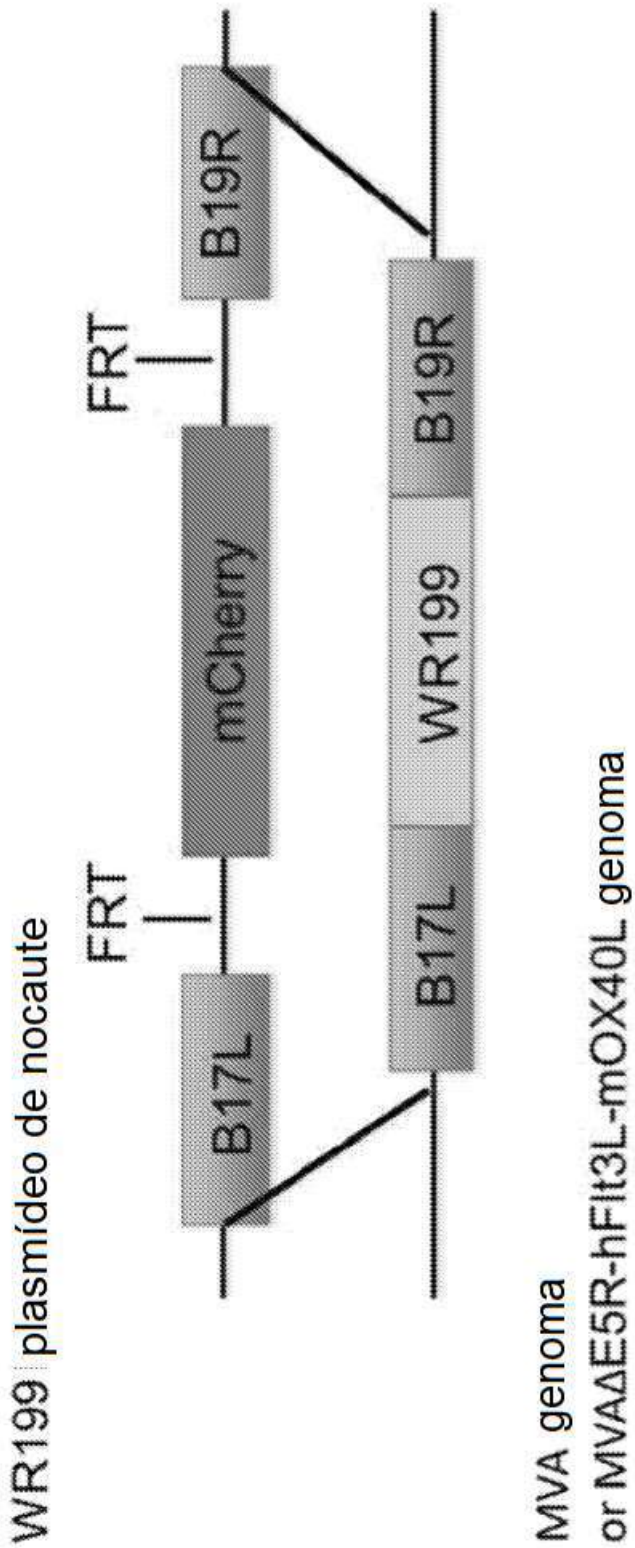

WR199 plasmídeo de nocaute
B17L
FRT
mCherry
FRT
B19R
MVA genoma
or MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40L genoma
B17L
WR199
B19R

FIG. 154A

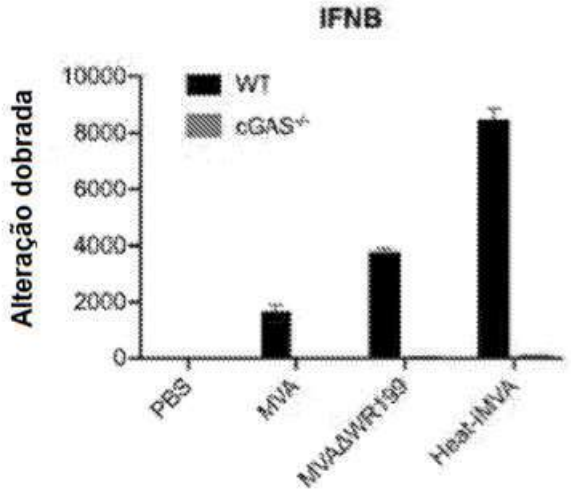


FIG. 154B

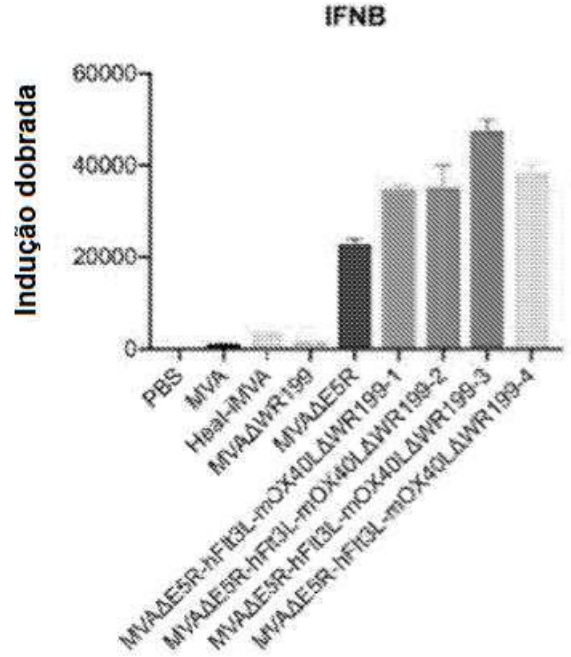


FIG. 154C

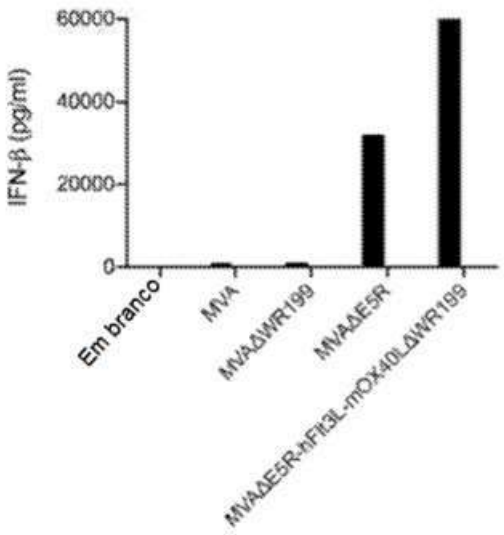

60000
40000
20000
0
IFN-β (pg/ml)
Em branco
MVA
MVAΔWR199
MVAΔE5R
MVAΔE5R-hFlt3L-mOX40LΔWR199

FIG. 155

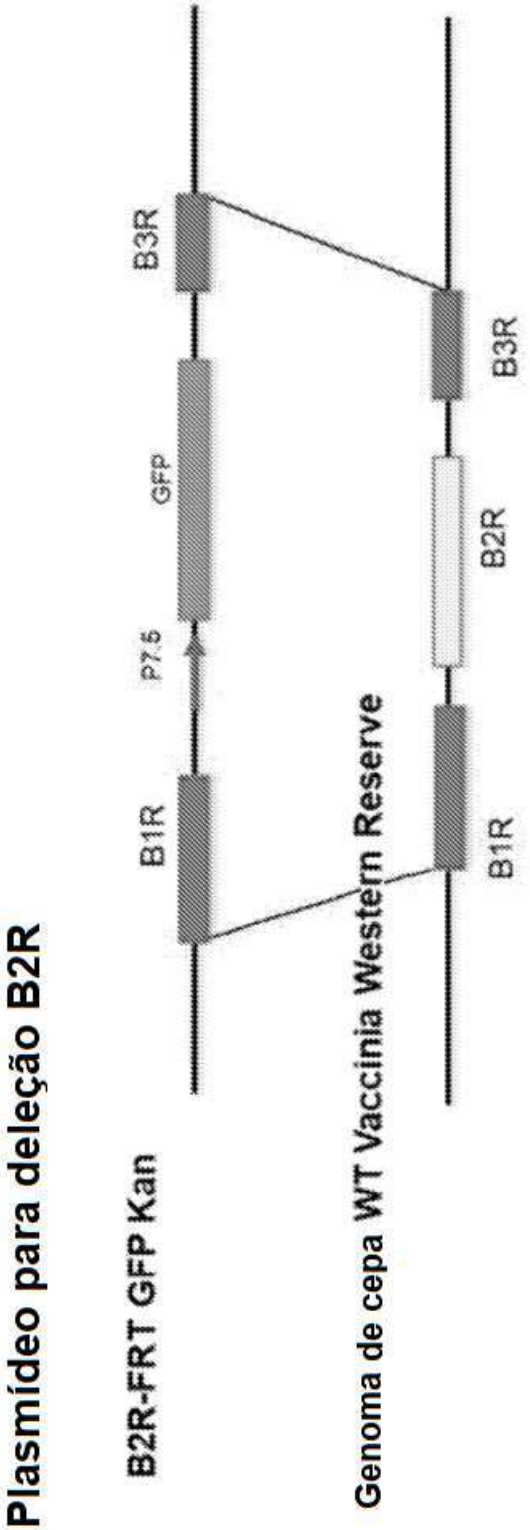
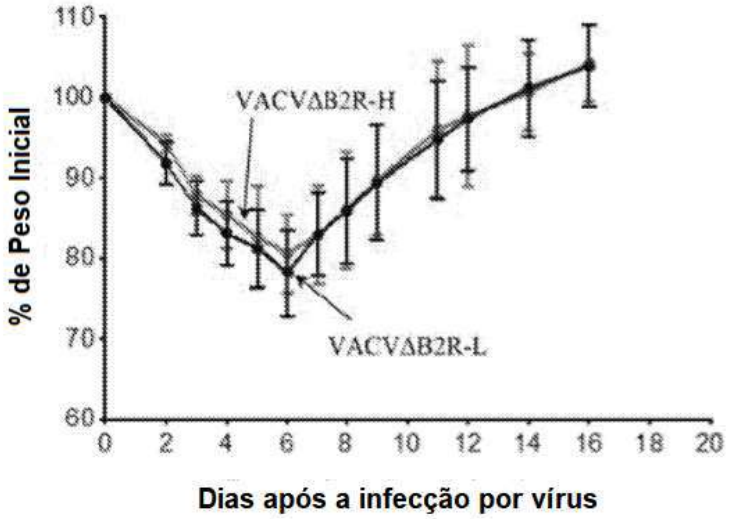

Plasmídeo para deleção B2R
B2R-FRT GFP Kan
B1R
P7.5
GFP
B3R
Genoma de cepa WT Vaccínia Western Reserve
B1R
B2R
B3R

FIG. 156A



VACVΔB2R-H: $2x10^7$ pfu/20ul
VACVΔB2R-L: $2x10^6$ pfu/20ul

FIG. 156B

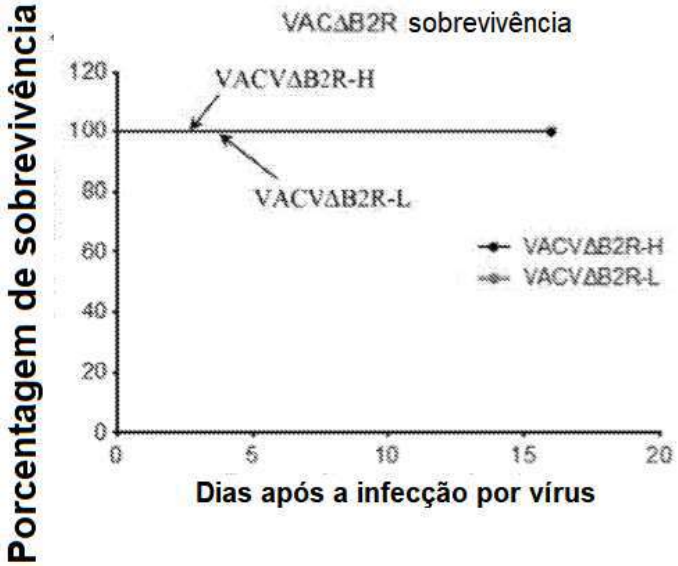


FIG. 157A

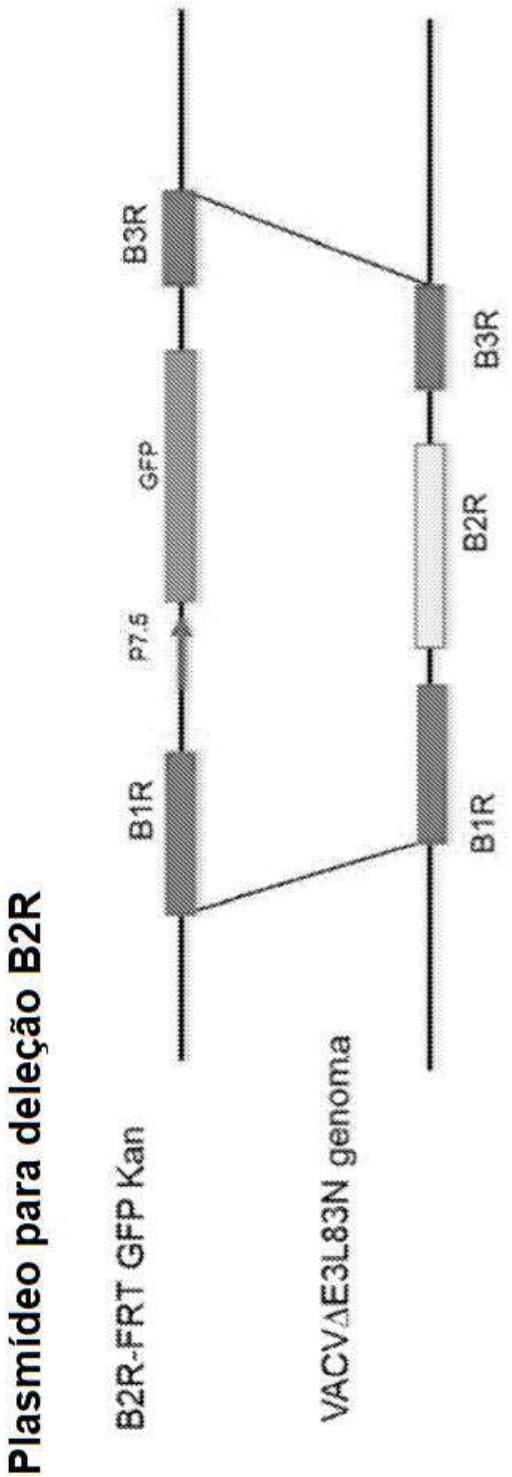

Plasmídeo para deleção B2R
B2R-FRT GFP Kan
B1R
P7.5
GFP
B3R
VACVΔE3L83N genoma
B1R
B2R
B3R

FIG. 157B

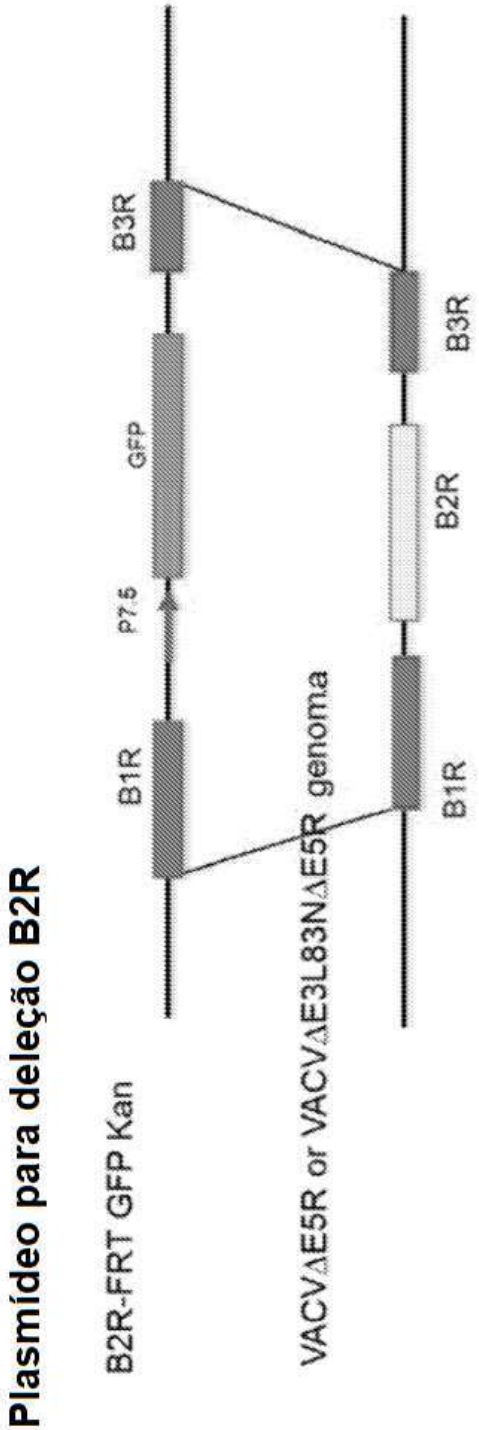
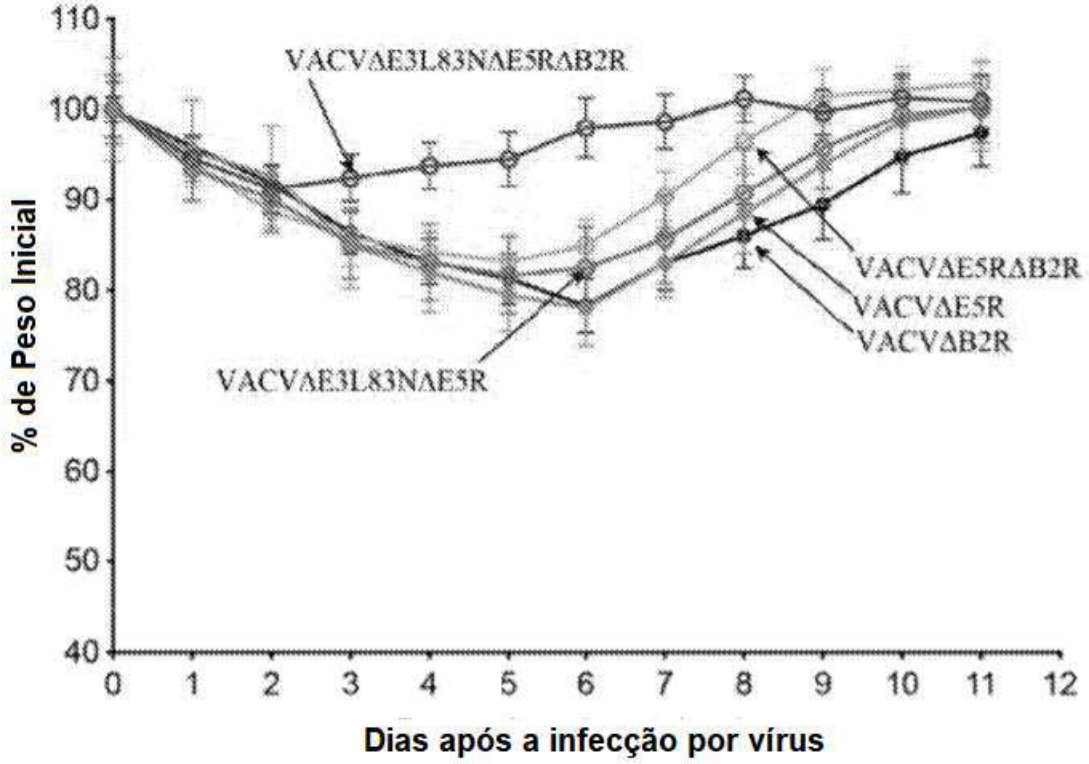

Plasmídeo para deleção B2R
B2R-FRT GFP Kan
B3R
GFP
P7.5
B1R
VACVΔE5R or VACVΔE3L83NΔE5R genoma
B3R
B2R
B1R

FIG. 158



Todos os Vírus: 2×10^7 pfu/20 µl

FIG. 159A

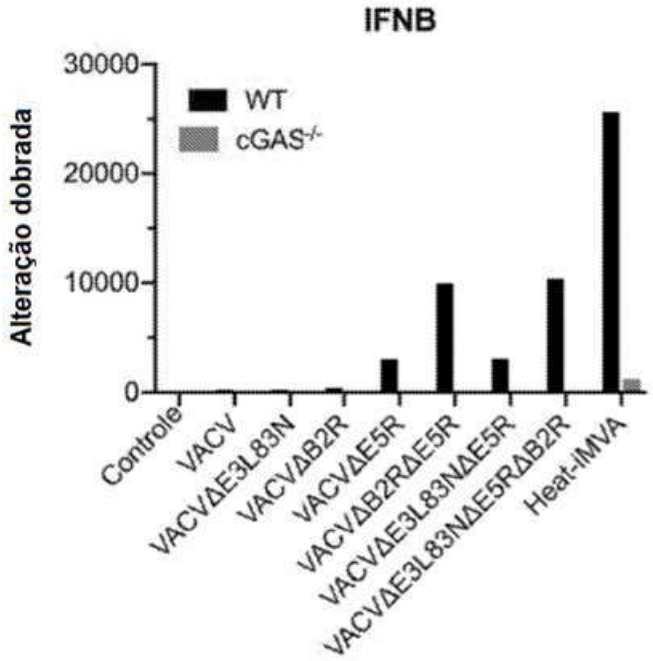


FIG. 159B

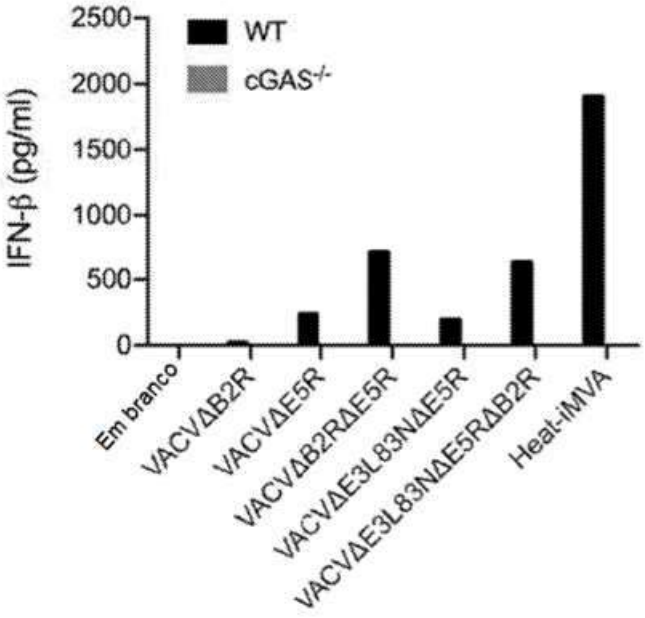


FIG. 160

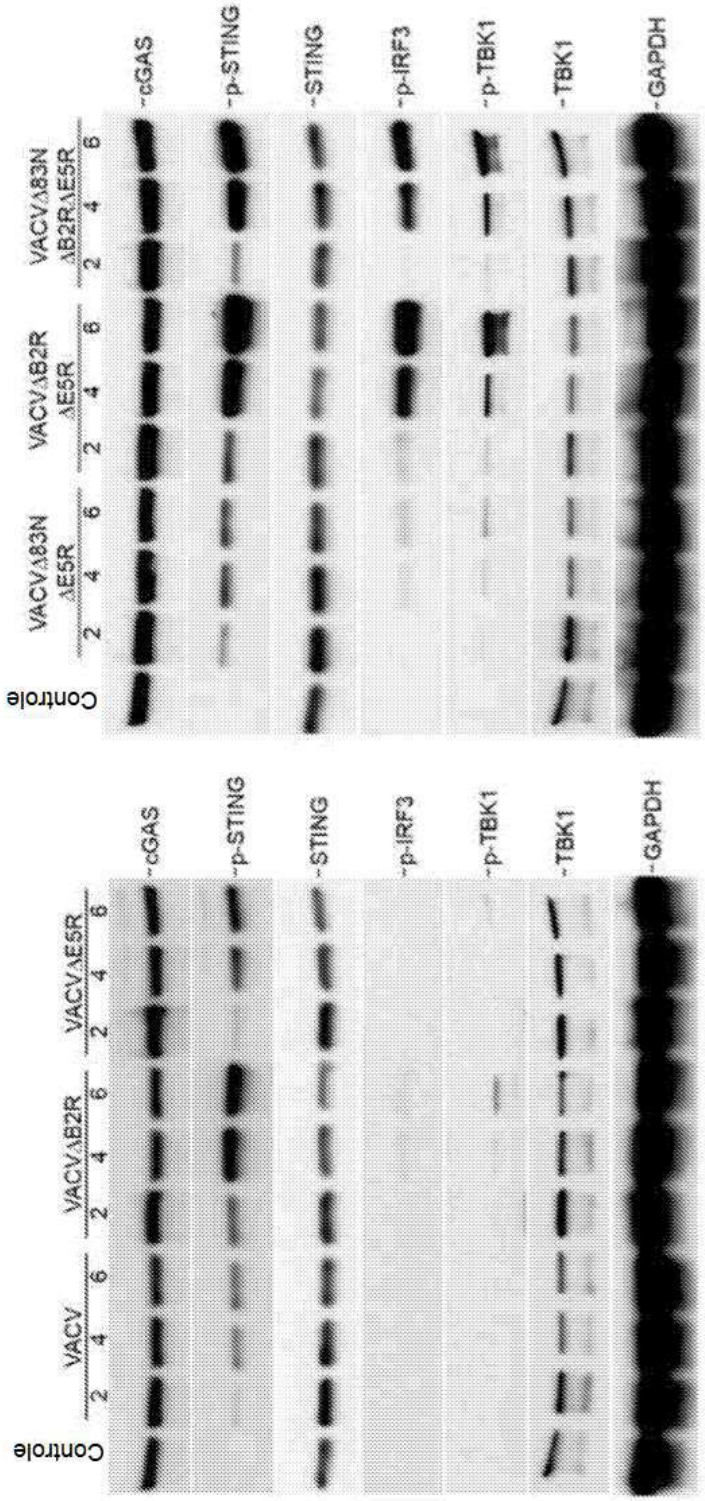

Control
VACV
2
4
6
VACVΔB2R
2
4
6
VACVΔE5R
2
4
6
VACVΔ83N ΔE5R
2
4
6
VACVΔB2R ΔE5R
2
4
6
VACVΔ83N ΔB2RΔE5R
2
4
6
-cGAS
-p-STING
-STING
-p-IRF3
-p-TBK1
-TBK1
-GAPDH

FIG. 161

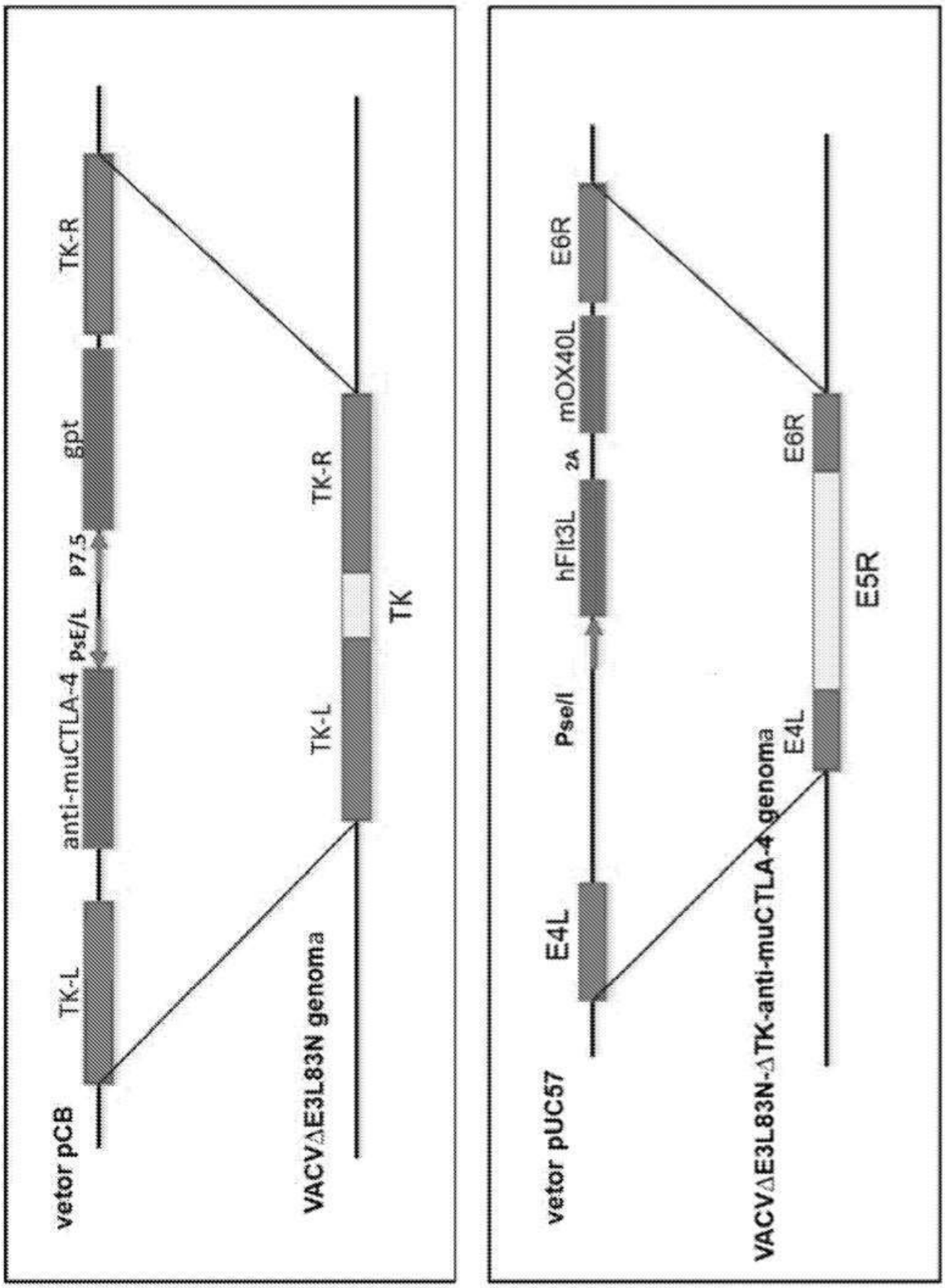

vetor pCB
TK-L
anti-muCTLA-4
PsE/L
P7.5
gpt
TK-R
VACVΔE3L83N genoma
TK-L
TK
TK-R
vetor pUC57
E4L
Pse/I
hFlt3L
2A
mOX40L
E6R
VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-muCTLA-4 genoma
E4L
E5R
E6R

FIG. 162

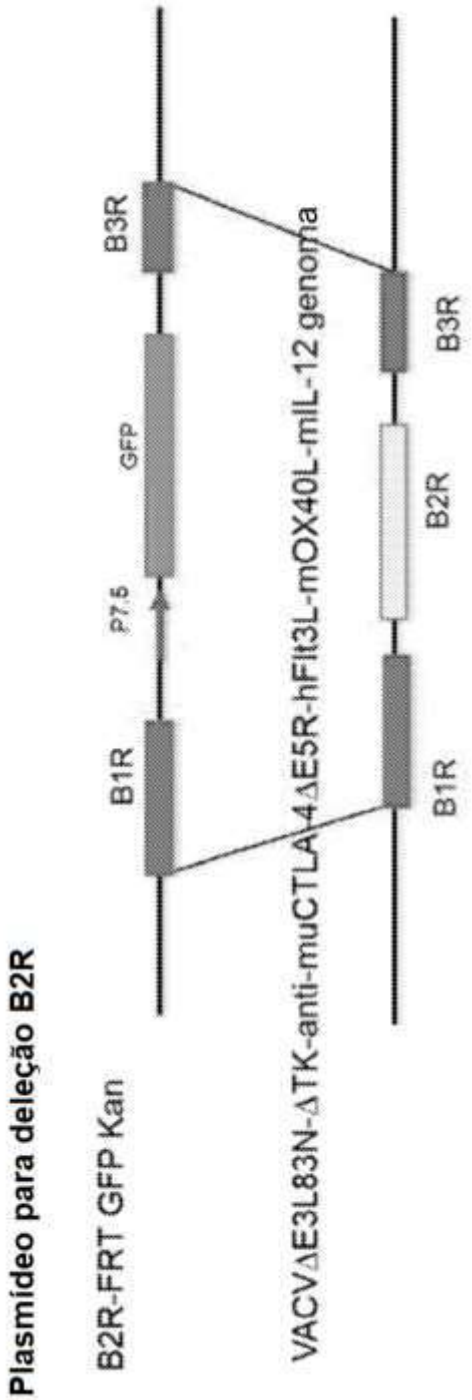
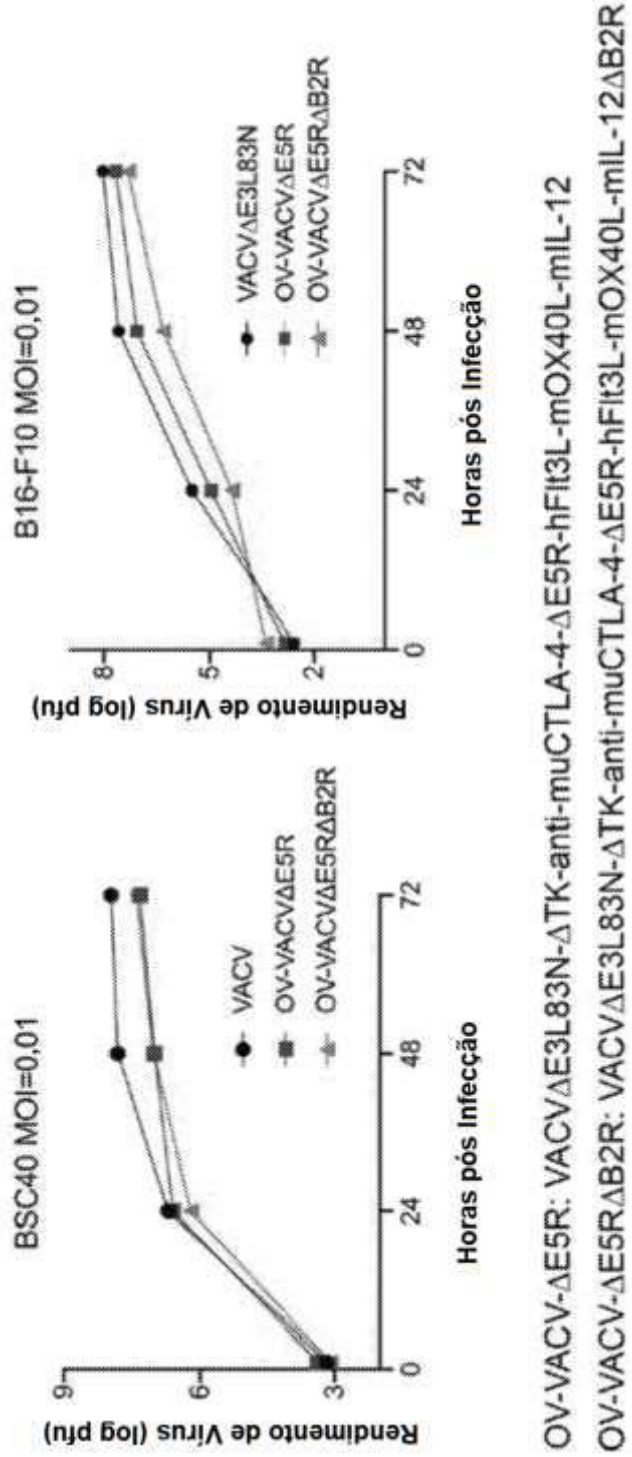

Plasmídeo para deleção B2R
B2R-FRT GFP Kan
B1R
P7.5
GFP
B3R
VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-muCTLA-4ΔE5R-hFlt3L-mOX40L-mIL-12 genoma
B1R
B2R
B3R

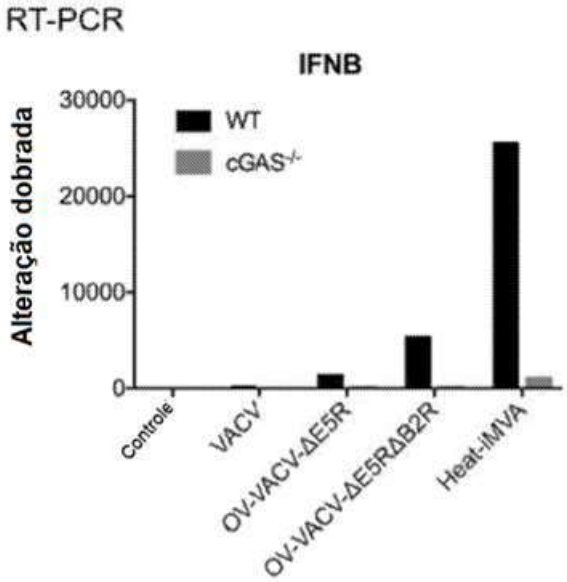
FIG. 163



OV-VACV-ΔE5R: VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-muCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-mOX40L-mIL-12

OV-VACV-ΔE5RΔB2R: VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-muCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-mOX40L-mIL-12ΔB2R

FIG. 164A



OV-VACV-ΔE5R: VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-muCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-mOX40L-mIL-12
OV-VACV-ΔE5RΔB2R: VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-muCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-mOX40L-mIL-12ΔB2R

FIG. 164B

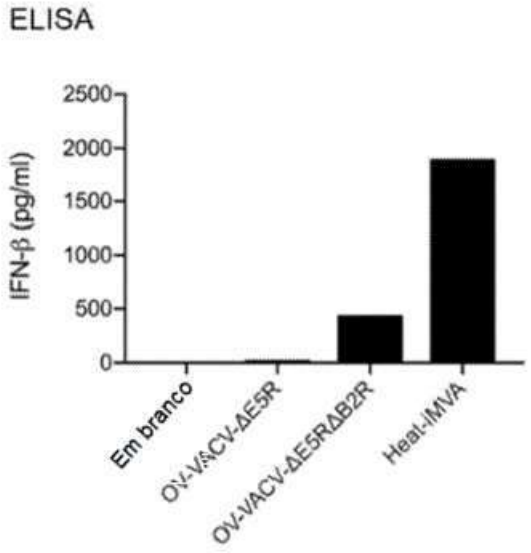


FIG. 165A

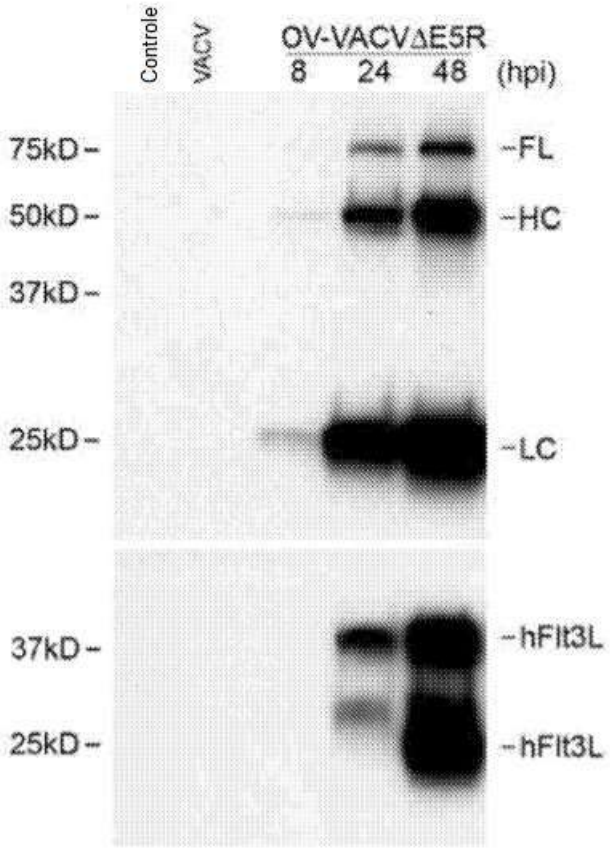


FIG. 165B

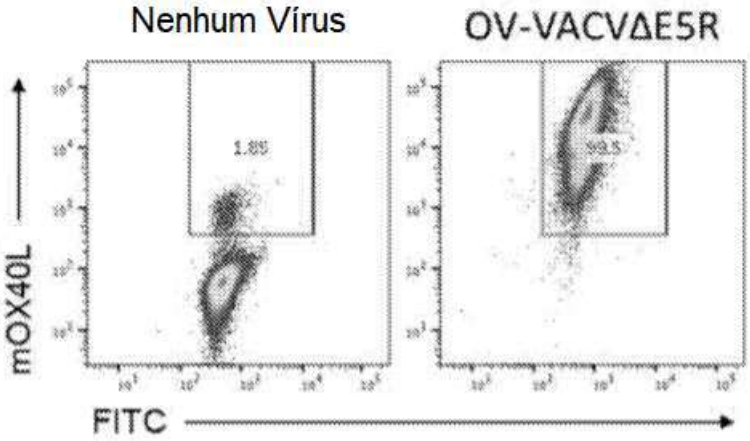


FIG. 165C

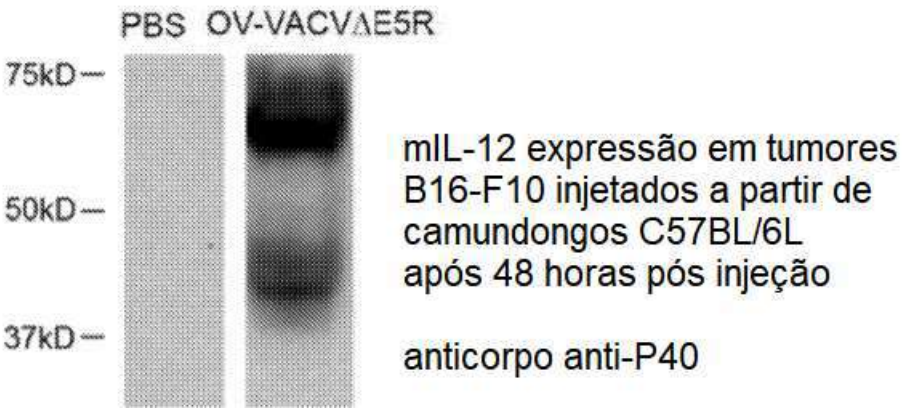

PBS
OV-VACVΔE5R
75kD
50kD
37kD
mIL-12 expressão em tumores B16-F10 injetados a partir de camundongos C57BL/6L após 48 horas pós injeção
anticorpo anti-P40

FIG. 166A

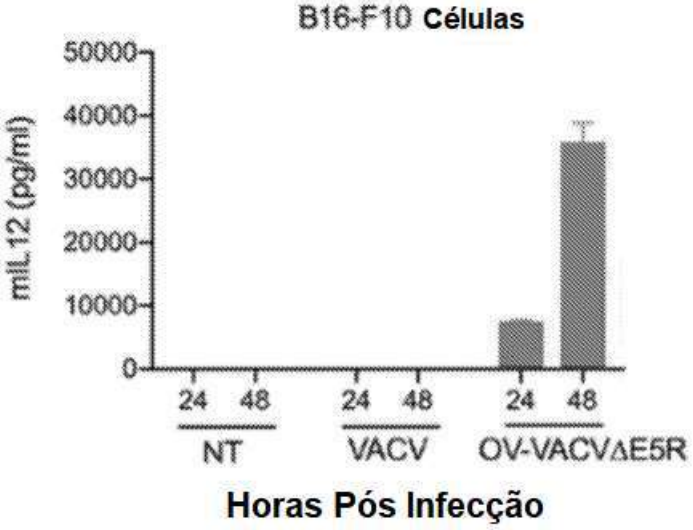


FIG. 166B

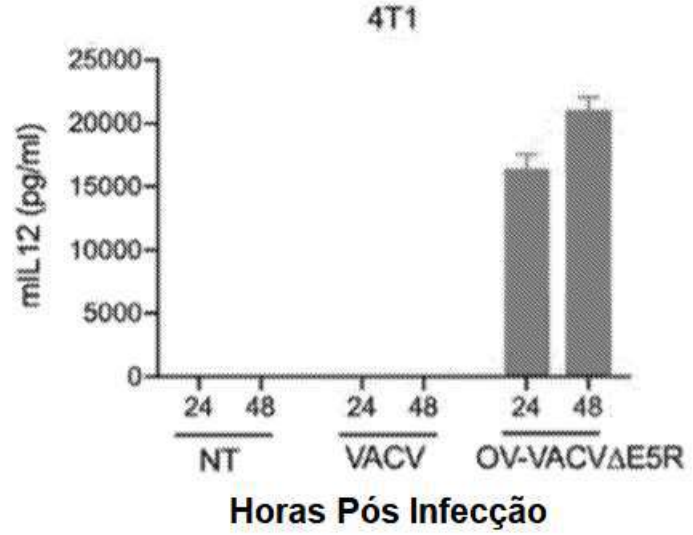


FIG. 166C

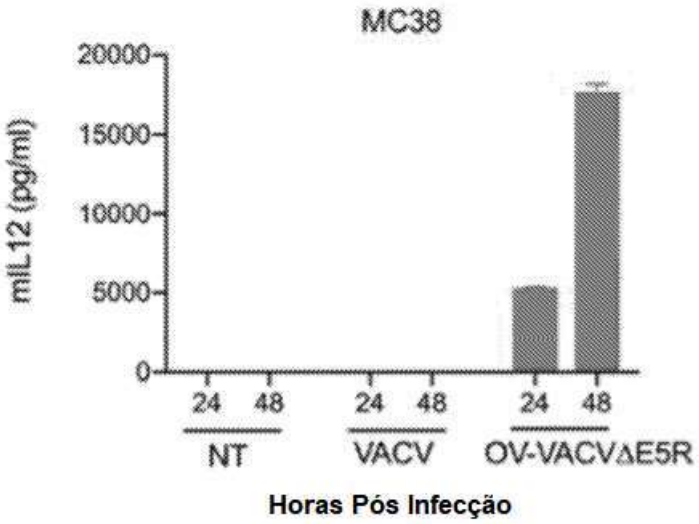


FIG. 166D

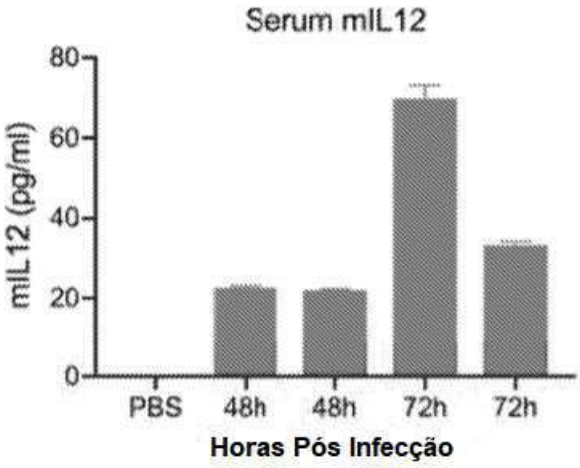


FIG. 167A

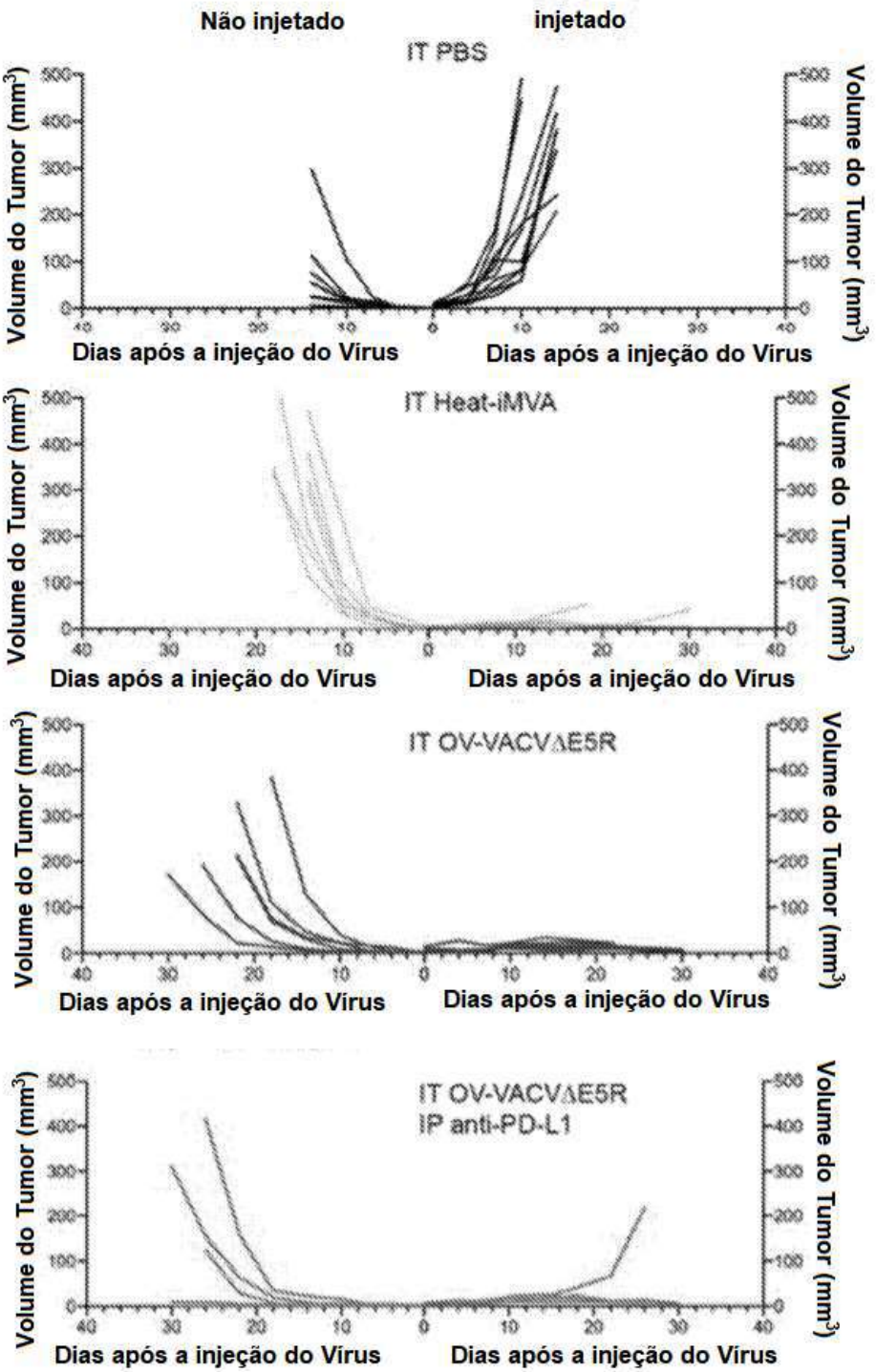

Não injetado
injetado
IT PBS
IT Heat-iMVA
IT OV-VACVΔE5R
IT OV-VACVΔE5R
IP anti-PD-L1
Volume do Tumor (mm3)
Dias após a injeção do Vírus

FIG. 167B

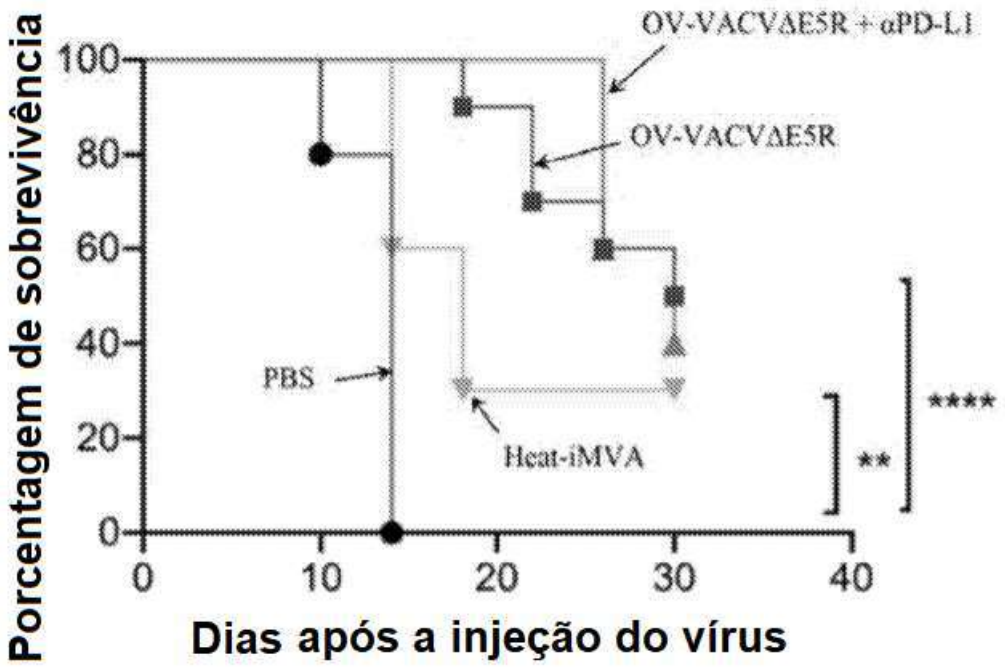
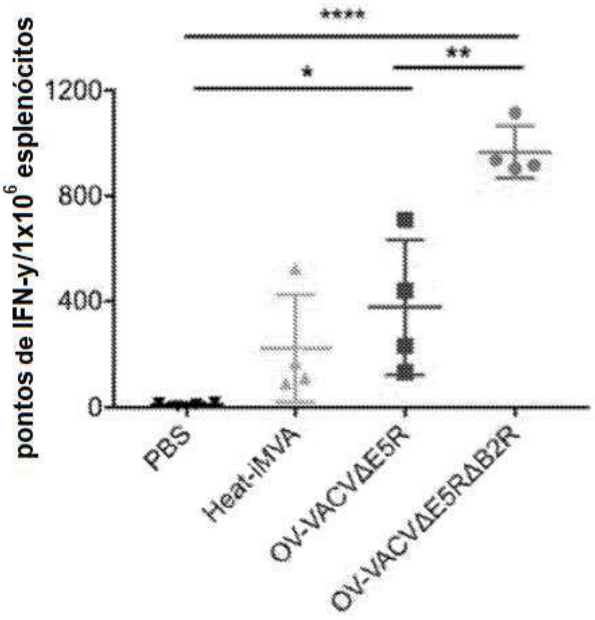

Porcentagem de sobrevivência
100
80
60
40
20
0
0
10
20
30
40
Dias após a injeção do vírus
OV-VACVΔE5R + aPD-L1
OV-VACVΔE5R
PBS
Heat-iMVA
**
****

FIG. 168A



OV-VACV-ΔE5R: VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-muCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-mOX40L-mIL-12
OV-VACV-ΔE5RΔB2R: VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-muCTLA-4-ΔE5R-hFlt3L-mOX40L-mIL-12ΔB2R

FIG. 168B

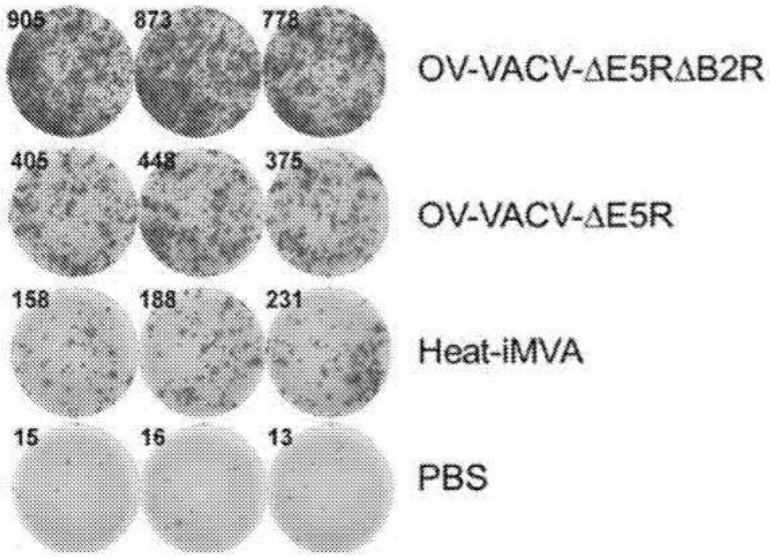


FIG. 169

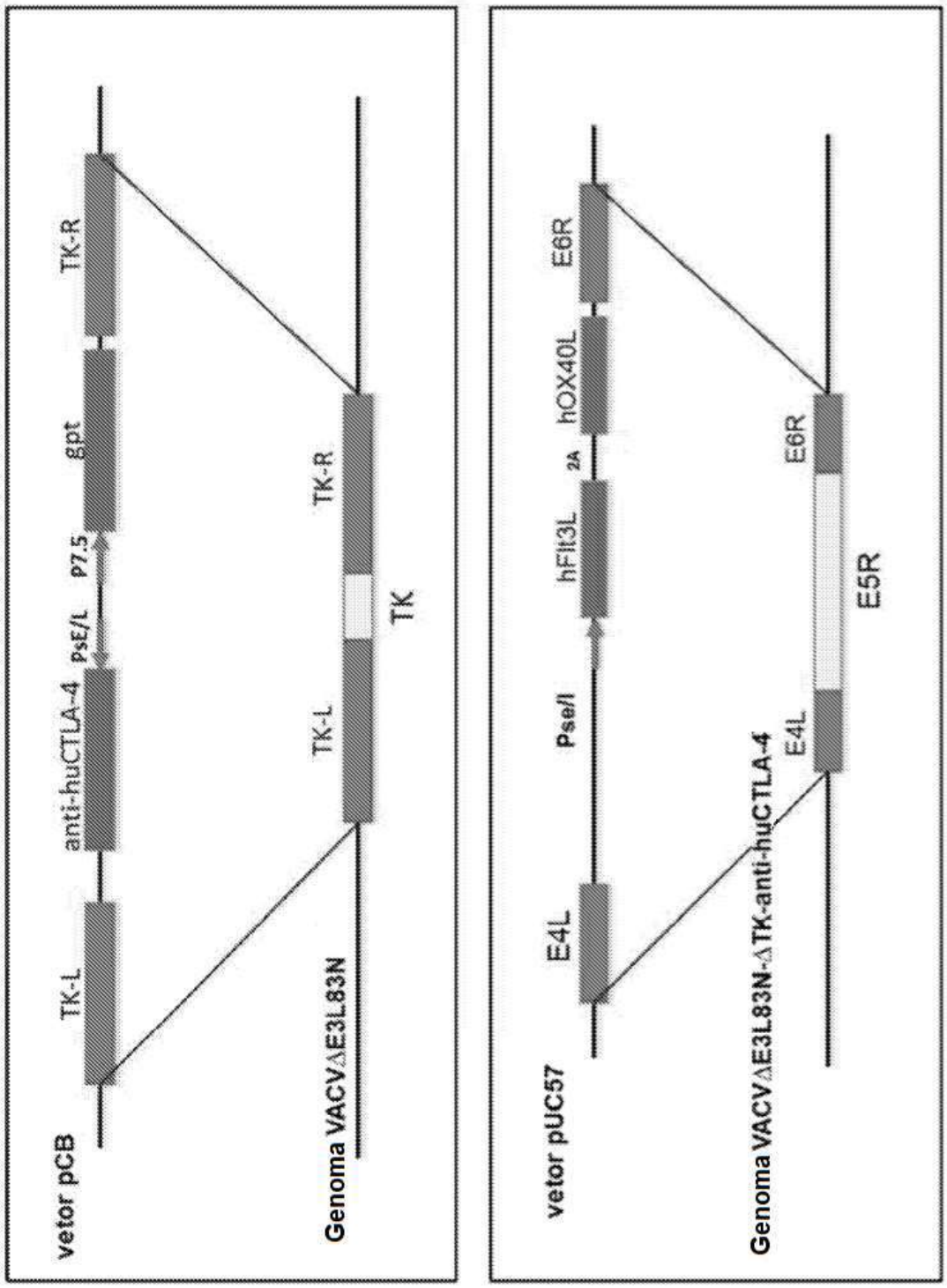

vetor pCB
TK-L
anti-huCTLA-4
PsE/L
P7.5
gpt
TK-R
Genoma VACVΔE3L83N
TK-L
TK-R
TK
vetor pUC57
E4L
PseI
hFl3L
2A
hOX40L
E6R
Genoma VACVΔE3L83N-ΔTK-anti-huCTLA-4
E4L
E6R
E5R

FIG. 170

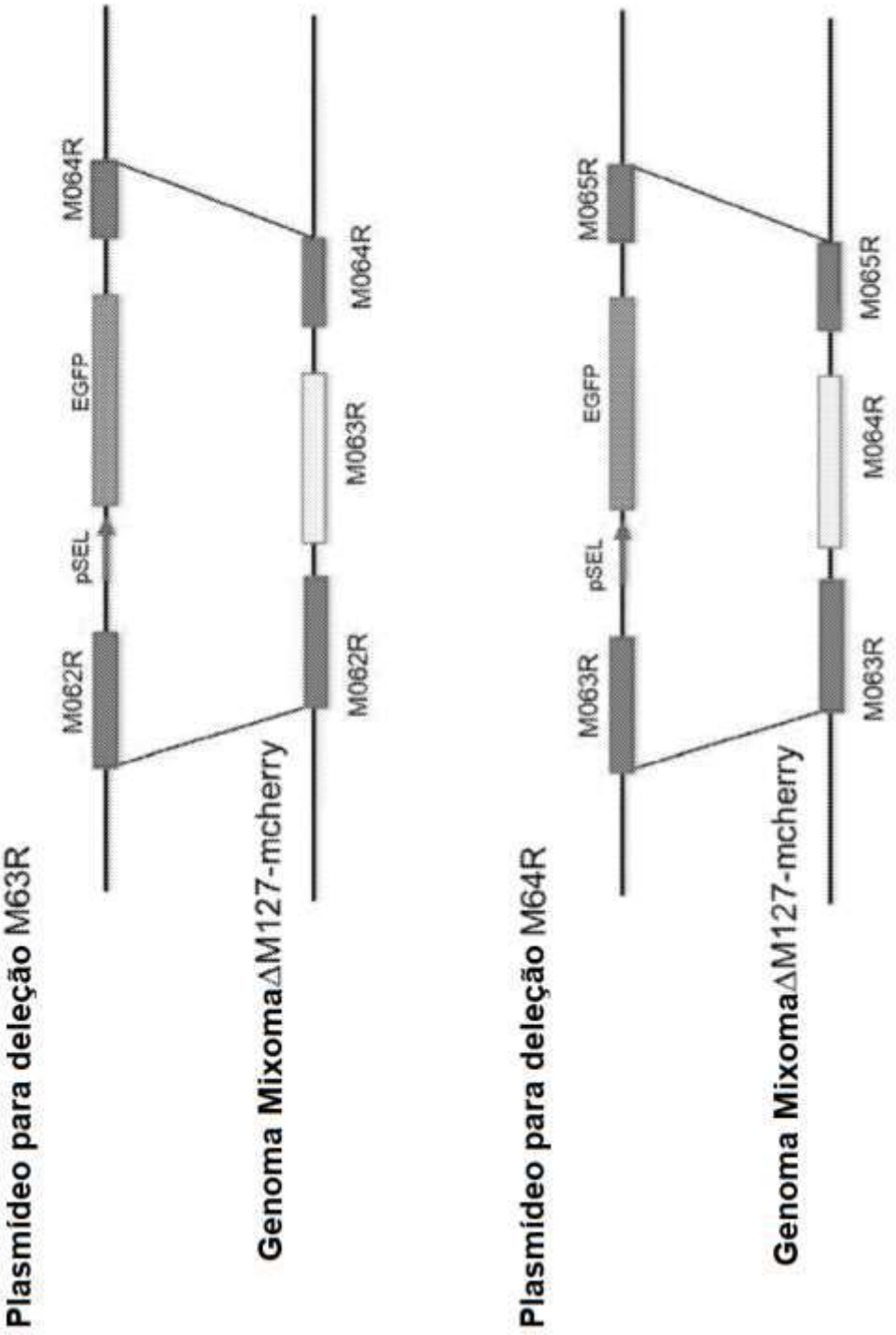

Plasmídeo para deleção M63R
M062R
pSEL
EGFP
M064R
Genoma MixomaΔM127-mcherry
M062R
M063R
M064R
Plasmídeo para deleção M64R
M063R
pSEL
EGFP
M065R
Genoma MixomaΔM127-mcherry
M063R
M064R
M065R

FIG. 171A

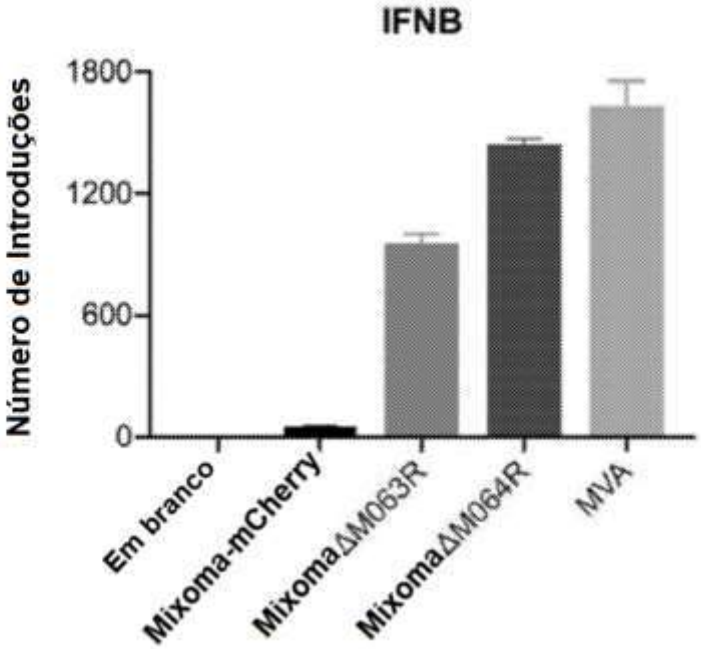


FIG. 171B

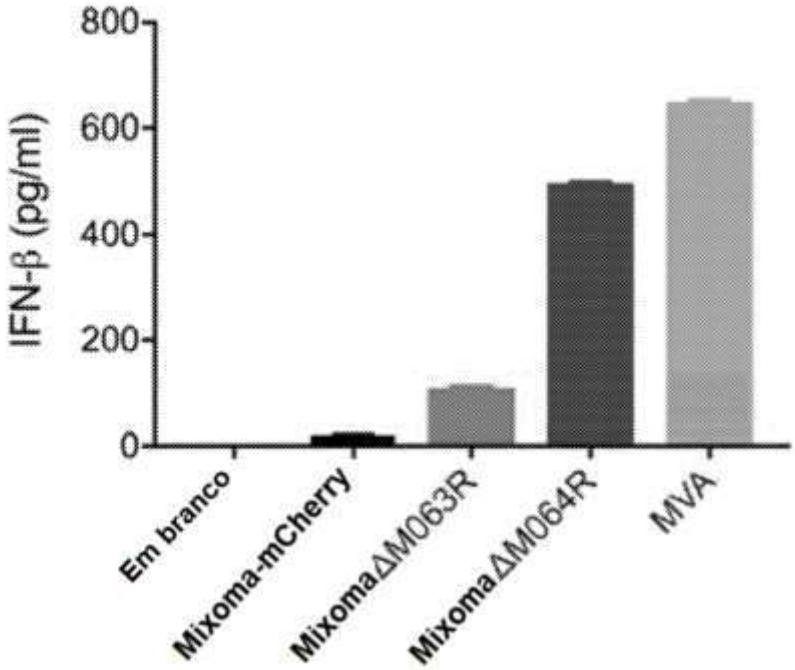


FIG. 172

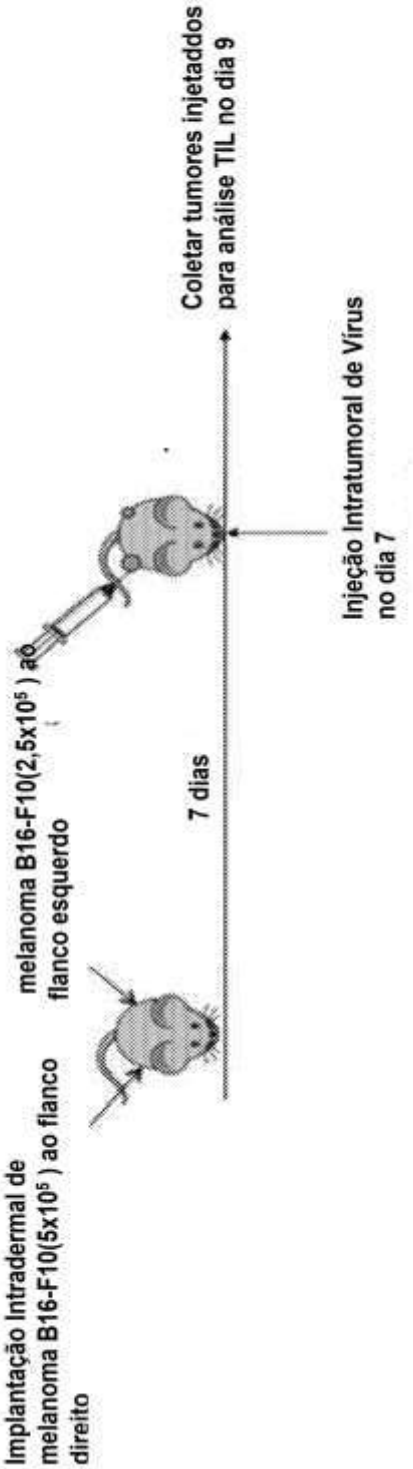

Implantação Intradermal de melanoma B16-F10(5x10^5) ao flanco direito
melanoma B16-F10(2,5x10^5) ao flanco esquerdo
7 dias
Injeção Intratumoral de Vírus no dia 7
Coletar tumores injetaddos para análise TIL no dia 9

FIG. 173A

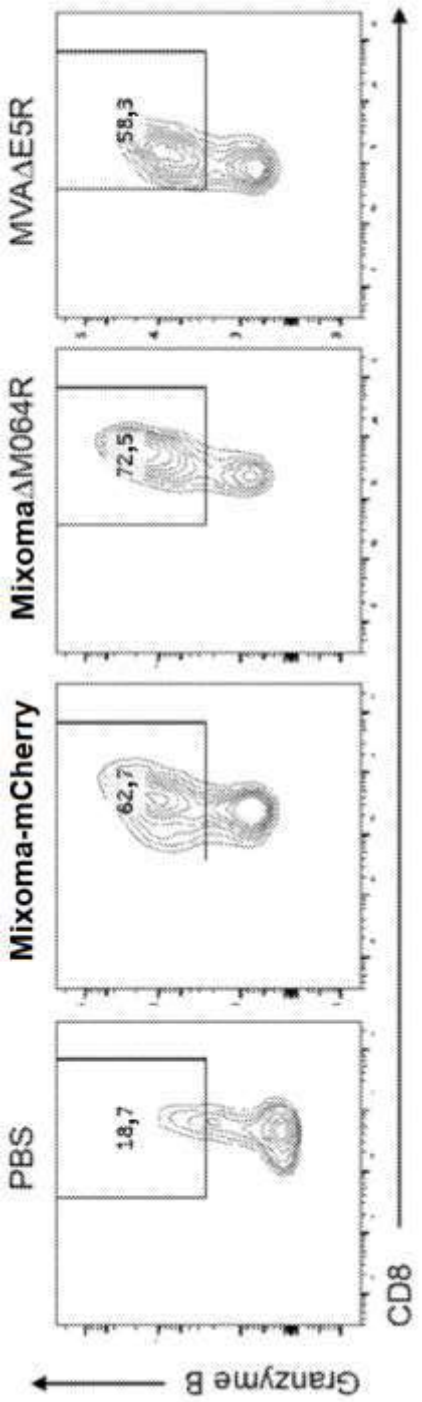

PBS
18,7
Mixoma-mCherry
62,7
MixomaΔM064R
72,5
MVAΔE5R
58,3
Granzyme B
CD8

FIG. 173B

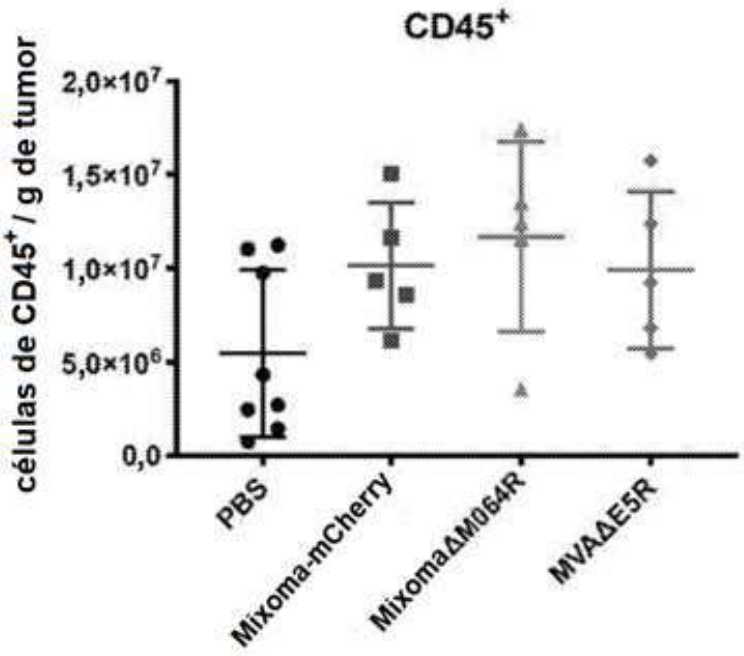


FIG. 173C

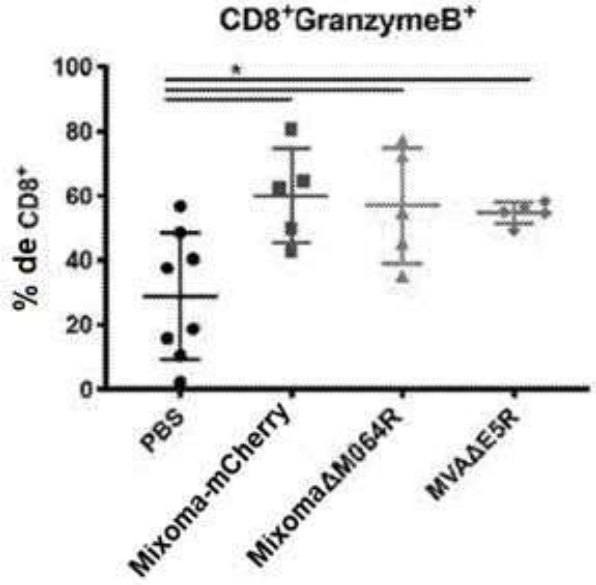


FIG. 174A

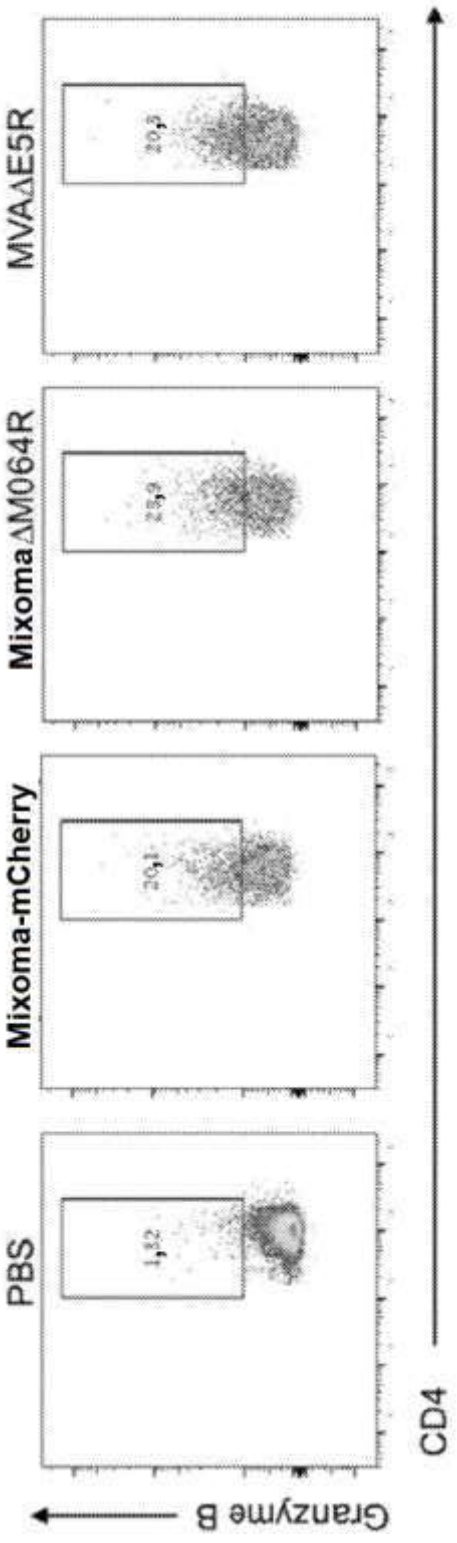
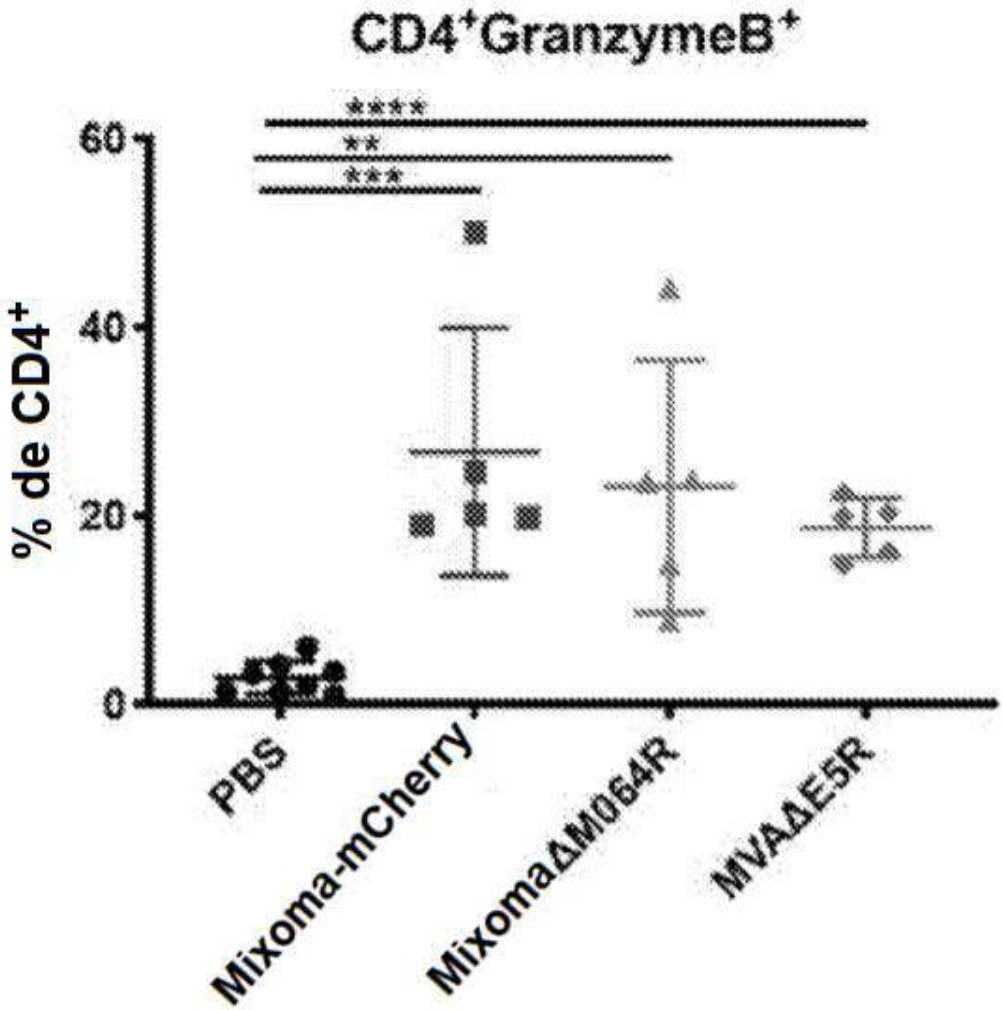


FIG. 174B


CD4+GranzymeB+
****
**
***
60
40
20
0
% de CD4+
PBS
Mixoma-mCherry
MixomaΔM064R
MVAΔE5R

RESUMO

“POXVÍRUS RECOMBINANTES PARA IMUNOTERAPIA CONTRA O CÂNCER”

São divulgados neste documento métodos e composições relacionadas ao tratamento, prevenção e/ou melhoria do câncer em um indivíduo em necessidade. Em aspectos particulares, a presente tecnologia se refere ao uso de poxvírus geneticamente modificados ou recombinantes, incluindo um vírus vaccinia Ankara (MVA) modificado compreendendo uma deleção de E3L (MVAΔE3L) projetado para expressar OX40L (MVAΔE3L-OX40L), um vírus MVA compreendendo um deleção de C7L (MVAΔC7L) projetado para expressar OX40L (MVAΔC7L-OX40L), um MVAΔC7L projetado para expressar OX40L e ligante de tirosina quinase 3 tipo Fms humano (hFlt3L) (MVAΔC7L-hFlt3L-OX40L), uma deleção de MVAΔC7L-OX40L), MVAΔE5R), um vírus vaccinia compreendendo uma deleção de C7L (VACVΔC7L) projetado para expressar OX40L (VACVΔC7L-OX40L), um VACVΔC7L projetado para expressar OX40L e hFlt3L (VACVΔC7L-hFlt3L-OX40L), um VACVΔC7L projetado para expressar OX40L e hFlt3L (VACVΔC7L-hFlt3L-OX40L)), um vírus mixoma (MYXV) que compreende uma deleção de M31R (MYXVΔM31R), ou combinações dos mesmos, sozinho ou em combinação com outros agentes, como uma composição oncolítica e imunoterapêutica.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas.

Código de Controle

Campo 1



Campo 2



Outras Informações:

- Nome do Arquivo: Listagem de Sequência.txt
- Data de Geração do Código: 10/05/2021
- Hora de Geração do Código: 07:48:22
- Código de Controle:
  - Campo 1: 174861E7E9EE20F4
  - Campo 2: 9F7E10E742AD4125