

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 841 300**

51 Int. Cl.:

C12N 7/00 (2006.01)

A61K 35/763 (2015.01)

C12N 15/86 (2006.01)

C07K 14/535 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA
TRAS OPOSICIÓN

T5

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.01.2017** **PCT/GB2017/050038**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.07.2017** **WO17118866**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.01.2017** **E 17700385 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea modificada tras oposición: **28.02.2024** **EP 3400291**

54 Título: **Virus modificado genéticamente**

30 Prioridad:

08.01.2016 GB 201600380

08.01.2016 GB 201600381

08.01.2016 GB 201600382

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente modificada:
06.08.2024

73 Titular/es:

REPLIMUNE LIMITED (100.0%)
69 Innovation Centre, Milton Park
Oxford, Oxfordshire OX14 4RQ, GB

72 Inventor/es:

COFFIN, ROBERT

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 841 300 T5

DESCRIPCIÓN

Virus modificado genéticamente

5 Campo de la invención

La invención se refiere a un agente inmunoterapéutico oncolítico y al uso del agente inmunoterapéutico oncolítico en el tratamiento del cáncer.

10 Antecedentes de la invención

Los virus tienen una capacidad única para entrar en las células con alta eficiencia. Después de entrar en las células, los genes víricos se expresan y el virus se replica. Esto habitualmente da como resultado la muerte de la célula infectada y la liberación de los componentes antigénicos de la célula a medida que la célula se rompe al morir. Como resultado, la muerte celular mediada por virus tiende a dar como resultado una respuesta inmunitaria a estos componentes celulares, incluyendo tanto los derivados de la célula hospedadora como los codificados o incorporados en el propio virus y está reforzada debido al reconocimiento por parte del hospedador de los llamados patrones moleculares asociados al daño (DAMP, por sus siglas en inglés) que ayudan en la activación de la respuesta inmunitaria.

Los virus también se acoplan con diversos mediadores de la respuesta inmunitaria innata como parte de la respuesta del hospedador al reconocimiento de una infección vírica a través de, por ejemplo, receptores tipo Toll, y señalización de cGAS/STING y el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP, por sus siglas en inglés) que dan como resultado la activación de respuestas de interferón y la inflamación que también son señales inmunogénicas para el hospedador. Estas respuestas inmunitarias pueden resultar en un beneficio inmunogénico para los pacientes con cáncer de tal manera que las respuestas inmunitarias a los antígenos tumorales proporcionan un beneficio general sistémico que da como resultado el tratamiento de tumores que no han sido infectados con el virus, incluyendo la enfermedad micro-metastásica y proporcionando vacunación contra la recaída.

Los efectos directos combinados ("oncolíticos") del virus y las respuestas inmunitarias contra los antígenos tumorales (incluyendo "neoantígenos" no propios, es decir, derivados de los genes mutados particulares en tumores individuales) se denominan "inmunoterapia oncolítica".

Los virus también pueden usarse como vehículos de administración ("vectores") para expresar genes heterólogos insertados en el genoma vírico en células infectadas. Estas propiedades hacen que los virus sean útiles para una diversidad de aplicaciones médicas y biotecnológicas. Por ejemplo, los virus que expresan genes terapéuticos heterólogos pueden usarse para terapia génica. En el contexto de la inmunoterapia oncolítica, los genes administrados pueden incluir los que codifican antígenos tumorales específicos, genes destinados a inducir respuestas inmunitarias o aumentar la inmunogenicidad de los antígenos liberados tras la replicación del virus y la muerte celular, genes destinados a dar forma a la respuesta inmunitaria que se genera, genes para aumentar el estado de activación inmunitaria general del tumor o genes para aumentar las propiedades oncolíticas directas (es decir, efectos citotóxicos) del virus. De manera importante, los virus tienen la capacidad de administrar moléculas codificadas que están destinadas a ayudar a iniciar, mejorar o dar forma a la respuesta inmunitaria antitumoral sistémica directa y selectivamente a los tumores, que puede tener beneficios de, por ejemplo, una toxicidad reducida o de centrar los efectos beneficiosos en los tumores (incluyendo aquellos no infectados por el virus) en lugar de los efectos fuera de la diana en los tejidos normales (es decir, no cancerosos) en comparación con la administración sistémica de estas mismas moléculas o administración sistémica de otras moléculas dirigidas a las mismas rutas.

Se ha demostrado que varios virus incluyendo, por ejemplo, el virus del herpes simple (VHS) tiene utilidad en el tratamiento oncolítico del cáncer. El VHS para su uso en el tratamiento oncolítico del cáncer debe desactivarse de tal manera que ya no sea patógeno, pero aún puede entrar y destruir células tumorales. Varias mutaciones inhabilitantes del VHS, incluyendo la alteración de los genes que codifican ICP34.5, ICP6 y/o timidina quinasa, se han identificado, que no impiden que el virus se replique en cultivo o en tejido tumoral *in vivo*, pero que previenen una replicación significativa en el tejido normal. Los VHS en los que solo se han alterado los genes ICP34.5 se replican en muchos tipos de células tumorales *in vitro* y se replican selectivamente en tejido tumoral, pero no en el tejido circundante, en modelos de tumores de ratón. Los ensayos clínicos de VHS con ICP34.5 eliminado o con ICP34.5 e ICP6 eliminados, también han mostrado seguridad y replicación selectiva en tejido tumoral en seres humanos.

Como se ha analizado anteriormente, un virus oncolítico, incluyendo VHS, también puede usarse para administrar un gen terapéutico en el tratamiento del cáncer. Un virus con ICP34.5 eliminado de este tipo adicionalmente eliminado para ICP47 y que codifica un gen heterólogo para GM-CSF también se ha probado en ensayos clínicos, incluyendo un ensayo de fase 3 en melanoma en el cual se demostró la seguridad y efectividad en el hombre. La GM-CSF es una citocina proinflamatoria que tiene múltiples funciones que incluyen la estimulación de monocitos para salir a la circulación y migrar hacia tejido en donde proliferan y maduran a macrófagos y células dendríticas. La GM-CSF es

importante para la proliferación y maduración de células presentadoras de antígeno, cuya actividad es necesaria para la activación de una respuesta inmunitaria antitumoral. Los datos del ensayo demostraron que podían observarse respuestas tumorales en tumores inyectados y, en menor medida, en tumores no inyectados. Las respuestas tendían a ser muy duraderas (meses-años) y parecía que se lograba un beneficio de supervivencia en los pacientes que respondían. Cada uno de ellos indicó la participación del sistema inmunológico en el tratamiento del cáncer, además del efecto oncolítico directo. Sin embargo, este y otros datos con virus oncolíticos generalmente mostraron que no todos los tumores responden al tratamiento y que no todos los pacientes logran una ventaja de supervivencia. Por lo tanto, las mejoras para la técnica de terapia oncolítica son claramente necesarias.

Recientemente se ha demostrado que la inmunoterapia oncolítica puede producir efectos terapéuticos aditivos o sinérgicos junto con el bloqueo del punto de control inmunológico (es decir, inhibición o 'antagonismo' de las vías del punto de control inmunitario, también denominado vías inmunitarias co-inhibitorias). El bloqueo del punto de control (ruta inmunitaria inhibidora) pretende bloquear los mecanismos inmunitarios inhibidores del hospedador que normalmente sirven para prevenir la aparición de autoinmunidad. Sin embargo, en pacientes con cáncer, estos mecanismos también pueden servir para inhibir la inducción o bloquear los efectos potencialmente beneficiosos de cualquier respuesta inmunitaria inducida a los tumores.

El bloqueo sistémico de estas vías por agentes dirigidos a CTLA-4, PD-1 o PD-L1 ha demostrado eficacia en varios tipos de tumores, incluidos el melanoma y el cáncer de pulmón. Sin embargo, como era de esperar, según el mecanismo de acción, puede producirse una toxicidad fuera de la diana debido a la inducción de autoinmunidad. Incluso así, estos agentes son suficientemente tolerables para proporcionar una utilidad clínica considerable. Otras vías inmuno-inhibidoras y dianas relacionadas para las que se están desarrollando agentes (principalmente anticuerpos) incluyen LAG-3, TIM-3, VISTA, CSF1R, IDO, CEACAM1, CD47. La actividad clínica óptima de estos agentes, por ejemplo, PD1, PDL1, LAG-3, TIM-3, VISTA, CSF1R, IDO, CD47, CEACAM1, puede requerir la administración sistémica o la presencia en todos los tumores debido al mecanismo de acción, es decir, incluido el direccionamiento de la superficie de contacto de las células efectoras inmunes con tumores u otros mecanismos inhibidores inmunitarios en/de tumores. En algunos casos, una presencia más localizada en por ejemplo solo algunos tumores o en algunos ganglios linfáticos también pueden ser óptimamente eficaces, por ejemplo, agentes dirigidos a CTLA-4.

Un enfoque alternativo para aumentar la respuesta inmunitaria antitumoral en pacientes con cáncer es direccionar (activar) las vías inmunoestimuladoras, es decir, en contraste con la inhibición de las vías inmunitarias co-inhibidoras. Estas vías envían señales de activación a los linfocitos T y otras células inmunitarias, generalmente como resultado de la interacción de los ligandos relevantes en las células presentadoras de antígeno (CPA) y los receptores relevantes en la superficie de los linfocitos T y otras células inmunitarias. Estas señales, dependiendo del ligando/receptor, pueden dar como resultado un aumento de la activación de linfocitos T y/o CPA y/o células NK y/o linfocitos B, incluidos subtipos particulares, mayor diferenciación y proliferación de linfocitos T y/o CPA y/o células NK y/o linfocitos B, incluyendo subtipos particulares, o supresión de la actividad de linfocitos T inmunoinhibidores tales como linfocitos T reguladores. Por lo tanto, se esperaría que la activación de estas vías produzca respuestas inmunes antitumorales mejoradas, pero también podría esperarse que la activación sistémica de estas vías, es decir, la activación de respuestas inmunes en general en lugar de respuestas inmunes antitumorales específica o selectivamente, diese como resultado una considerable toxicidad fuera de la diana en tejido no tumoral, el grado de tal toxicidad fuera de la diana depende de la vía coestimuladora inmunitaria particular a la que se dirige. No obstante, los agentes (principalmente anticuerpos agonistas, o con menos frecuencia el ligando soluble del receptor en cuestión) que se dirigen a las vías coestimuladoras inmunitarias, incluidos los agentes que se dirigen a GITR, 4-1-BB, OX40, CD40 o ICOS, y destinados a uso sistémico (es decir, administración intravenosa) están o se han propuesto para el desarrollo clínico.

Para que muchos de estos enfoques que se dirigen a las vías inmunitarias co-inhibidoras o co-inhibidoras tengan éxito, se necesitan respuestas inmunitarias preexistentes a los tumores, es decir, de tal manera que se pueda potenciar una respuesta inmunitaria preexistente o se pueda aliviar un bloqueo de una respuesta inmunitaria antitumoral. La presencia de un microambiente tumoral inflamado, lo que es indicativo de una respuesta en curso, también es necesaria. Las respuestas inmunitarias preexistentes a los neoantígenos tumorales parecen ser particularmente importantes para la actividad del bloqueo de la ruta inmunitaria co-inhibidora y fármacos relacionados. Solo algunos pacientes pueden tener una respuesta inmunitaria continua a los antígenos tumorales, incluyendo los neoantígenos y/o un microambiente tumoral inflamado, ambos de los cuales son necesarios para la actividad óptima de estos fármacos. Por lo tanto, los agentes oncolíticos que pueden inducir respuestas inmunitarias a los antígenos tumorales, incluyendo los neoantígenos y/o que pueden inducir un microambiente tumoral inflamado son atractivos para su uso en combinación con el bloqueo de la ruta inmunitaria co-inhibidora y fármacos potenciadores del sistema inmunitario. Esto probablemente explica los prometedores efectos antitumorales combinados de los agentes oncolíticos y el bloqueo de la ruta inmunitaria co-inhibitoria en ratones y seres humanos que se han observado hasta ahora.

Liu et al. (2003, Gene Therapy, 10 (4): 292-303) describe virus del herpes simple con ICP34.5 deletado con propiedades oncolíticas, estimuladoras del sistema inmunitario y antitumorales mejoradas.

Senzer et al. (2009, Journal of Clinical Oncology, 27 (34): 5763-5771) describe un ensayo clínico de fase II de un virus del herpes oncolítico de segunda generación que codifica el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos en pacientes con melanoma metastásico no extirpable.

- 5 Simpson et al. (2006, Cancer Research, 66 (9): 4853-4842) describe la combinación de una glicoproteína fusogénica, activación de profármacos y virus del herpes simple oncolítico para mejorar el control local de tumores.

Piasecki et al. revela que Talimogene laherparepvec aumenta la eficacia antitumoral del bloqueo de puntos de control inmunológico anti-PD-1 (2015, URL: <http://www.abstractsonline.com/Plan/ViewAbstract.aspx?mlD=3682&sKey=ebc7290a-af22-4fa6-9436-c276011fb181&cKey=b61c1150-5517-456bacd3-2f8048807587&mKey=19573a54-ae8f-4e00-9c23-bd6d62268424>).

10 Sokolowski et al. (2015, Oncolytic virotherapy, 4:207-219) revisa hasta dónde hemos llegado en la viroterapia oncolítica utilizando el virus del herpes simple.

15 El documento WO 2006/002394 desvela cepas de virus herpes oncolítico avirulentas diseñadas para contrarrestar la respuesta innata del hospedador.

20 El análisis anterior demuestra que todavía hay mucho margen para mejorar los agentes oncolíticos y las terapias contra el cáncer utilizando agentes oncolíticos y respuestas antitumorales y fármacos que se dirigen hacia las vías inmunitarias coestimuladoras o coestimuladoras.

Sumario de la invención

25 La invención se refiere a virus oncolíticos que expresan GM-CSF y al menos una molécula que se dirige hacia la vía coestimuladora. GM-CSF ayuda en la inducción de un microambiente tumoral inflamatorio y estimula la proliferación y maduración de células presentadoras de antígeno, incluyendo células dendríticas, que ayudan en la inducción de respuestas inmunes antitumorales. Estas respuestas inmunes se amplifican a través de la activación de una vía o vías inmunitarias coestimuladoras usando una molécula activadora de la vía inmunitaria coestimuladora o moléculas también administradas por el virus oncolítico.

30 El uso de un virus oncolítico para administrar moléculas de direccionamiento a las vías inmunitarias coestimuladoras se centra en la amplificación de efectos inmunológicos sobre las respuestas inmunitarias antitumorales, y reduce la amplificación de respuestas inmunitarias a antígenos no tumorales. Por tanto, las células inmunitarias en los tumores y los ganglios linfáticos que drenan los tumores son activadas selectivamente por las moléculas activadoras de las vías inmunitarias coestimuladoras en lugar de las células inmunitarias en general. Esto da como resultado una mayor eficacia de la activación de la vía inmunitaria coestimuladora y la amplificación de la respuesta inmunitaria antitumoral, y también puede dar como resultado una reducción de la toxicidad fuera de la diana. También es importante direccionar los efectos del bloqueo sistémico combinado de la vía inmunitaria coestimuladora y la activación de la vía inmunitaria coestimuladora en los tumores, es decir, de manera que las respuestas inmunitarias amplificadas de las que se liberan los bloqueos coestimuladores sean respuestas inmunitarias antitumorales en lugar de respuestas a antígenos no tumorales.

45 La invención utiliza el hecho de que, cuando es administrado por un virus oncolítico, el sitio de acción de la activación de la vía coestimuladora y de la expresión de GM-CSF está en el tumor y/o en el ganglio linfático que drena el tumor, pero los resultados de dicha activación (una respuesta inmunitaria antitumoral sistémica amplificada) son sistémicos. Esto se dirige a los tumores en general, y no solo a los tumores a los que el virus oncolítico ha administrado la molécula o moléculas que se dirigen a una vía o vías inmunitarias coestimuladoras y GM-CSF. Los virus oncolíticos de la invención, por tanto, proporcionan un tratamiento mejorado del cáncer mediante la generación de respuestas inmunitarias mejoradas centradas en el tumor. El virus oncolítico de la invención también ofrece efectos inmunoestimulantes antitumorales mejorados, de manera que se potencian los efectos inmunomediados sobre los tumores que no son destruidos por la oncólisis, incluida la enfermedad micrometastásica, lo que da como resultado una destrucción más eficaz de estos tumores, y vacunación antitumoral a largo plazo más eficaz para prevenir futuras recaídas y mejorar la supervivencia general.

55 La efectividad antitumoral mejora cuando un virus oncolítico de la invención se usa como agente único y también cuando el virus se usa en combinación con otras modalidades anticáncer, incluyendo quimioterapia, tratamiento con agentes dirigidos, radiación y, en realizaciones preferidas, fármacos de bloqueo de puntos de control inmunológico (es decir, antagonistas de una vía inmunitaria coestimuladora) y/o agonistas de una vía inmunitaria coestimuladora.

60 En consecuencia, la presente invención proporciona un virus del herpes simple (VHS) oncolítico que comprende: (i) un gen que codifica una GM-CSF heteróloga; y (ii) un gen que codifica la molécula activadora de la vía inmunitaria coestimuladora heteróloga, en donde el virus es competente de replicación selectiva en tejido tumoral y cada gen está bajo el control de una secuencia promotora, y la molécula activadora de la vía inmunitaria coestimuladora es un ligando de CD40 (CD40L), un ligando de ICOS, un ligando de GITR, un ligando de 4-1BB, un ligando de OX40, TL1A, un ligando de CD30, CD27, un ligando de flt3 o un inhibidor de CTLA-4. El virus puede codificar más de un

gen de molécula activadora de la vía inmunitaria coestimuladora.

La molécula activadora de la vía inmunitaria coestimuladora es preferentemente GITRL, 4-1-BBL, OX40L, ICOSL o CD40L o una proteína capaz de bloquear la señal a través de CTLA-4, por ejemplo, un anticuerpo que se une a CTLA-4. Los ejemplos de ligandos de CD40, ICOS, GITR, 4-1-BB y OX40 incluyen versiones modificadas de GITRL, 4-1-BBL, OX40L, ICOSL o CD40L que se secretan en lugar de estar unidos a la membrana y/o que se modifican de manera que se formen multímeros de la proteína.

El virus puede ser un aislado clínico modificado, tal como un aislado clínico modificado de un virus, en donde el aislado clínico mata dos o más líneas de células tumorales más rápidamente y/o a una dosis más baja *in vitro* de uno o más aislados clínicos de referencia de la misma especie de virus.

El virus es un virus del herpes simple (VHS), tales como VHS1. El VHS no expresa típicamente ICP34.5 funcional y/o ICP47 funcional y/o expresa el gen US11 como un gen temprano inmediato.

La invención también proporciona:

- una composición farmacéutica que comprende un virus de la invención y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable;
- el virus de la invención para su uso en un método de tratamiento del cuerpo humano o animal mediante terapia; y
- el virus de la invención para su uso en un método de tratamiento de cáncer, en donde el método opcionalmente comprende administrar un agente anticáncer adicional.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 representa la estructura de un virus ejemplar de la invención que comprende un gen que codifica GM-CSF y un gen que codifica CD40L.

La Figura 2 muestra las capacidades diferenciales de las ocho cepas aisladas clínicas de VHS1 de mayor rango evaluadas mediante tinción con violeta cristal 24 horas o 48 horas después de la infección con una MOI de 0,1, 0,01 o 0,001 como se indica en la Figura para matar líneas de células tumorales humanas Fadu, SK-mel-28, A549, HT1080, MIA-PA-CA-2, HT29 y MDA-MB-231. Se indican las cepas de virus clasificadas en primer y segundo lugar en cada línea celular. El virus RH018A ocupó el primer lugar en cada una de las líneas celulares Fadu, HT1080, MIA-PA-CA-2 y HT29 y el segundo en cada una de las líneas celulares SK-mel-28, A549 y MDA-MB-231. RH004A ocupó el primer lugar junto con RH018A y RH015A en la línea celular HT29, el primero en las líneas celulares SK-mel-28 y A549 y el segundo en la línea celular Fadu. RH023A ocupó el primer lugar en la línea celular MDA-MB-231 y el segundo en la línea celular HT1080. RH031A ocupó el segundo lugar en cada una de las líneas celulares MIA-PA-CA-2 y HT29. RH040A ocupó el segundo lugar en la línea celular HT29.

La Figura 3 muestra una comparación entre la cepa RH018A, la cepa que ocupó el primer lugar entre todas las cepas probadas, con una deformación "promedia" de la detección (es decir, la cepa RH065A). Se necesitó aproximadamente 10 veces menos de la cepa RH018A para matar una proporción igual de células que la de la cepa RH065A, como se muestra en la tinción con violeta cristal 24 o 48 horas después de la infección con MOI de 0,1, 0,01 y 0,001 en líneas celulares SK-mel-28, HT1080, MDA-MB-231, Fadu, MIA-PA-CA-2 y A549.

Las figuras 4 y 5 representan las estructuras de los virus VHS1 modificados por la delección de ICP34.5 e ICP47 de manera que el gen US11 está bajo el control del promotor temprano inmediato ICP457 y contiene genes heterólogos en el locus ICP34.5. Los virus se construyeron usando la cepa RH018A a menos que se indique lo contrario en la Figura.

La Figura 6 muestra los resultados de un ELISA para detectar la expresión de GM-CSF humano o de ratón en sobrenadantes de células BHK infectadas con el virus 16 (mGM-CSF y GALVR-), el virus 17 (hGM-CSF y GALVR-) y el virus 19 (mGM-CSF).

La Figura 7 es una comparación entre las capacidades de destrucción de células de la cepa RH018A en la que se elimina ICP34.5 y que expresa GALVR- y GFP (virus 10) con un virus que expresa solo GFP (virus 12) según lo determinado por tinción con violeta cristal en tres líneas celulares a bajo aumento.

La Figura 8 es una comparación entre las capacidades de destrucción celular de la cepa RH018A en la que se eliminan ICP34.5 e ICP47 y que expresa GALVR- y GM-CSF (virus 17) con una cepa de la técnica anterior con las mismas modificaciones determinadas por tinción con cristal violeta en cuatro líneas celulares.

La Figura 9 muestra la eficacia del Virus 16 (ICP34.5 e ICP47 eliminados que expresa GALVR- y mGM-CSF) en el tratamiento de ratones que albergan tumores de linfoma A20 en ambos flancos. A los tumores de los flancos derechos se les inyectó el virus o vehículo y se observaron los efectos sobre el tamaño del tumor durante 30 días. El virus fue eficaz tanto contra tumores inyectados como contra tumores no inyectados.

La Figura 10 demuestra los efectos del Virus 15 (ICP34.5 e ICP47 eliminados que expresa GALVR- y GFP) y el Virus 24 (ICP34.5 e ICP47 eliminados que expresa GFP) en células 9L de rata *in vitro* según lo evaluado por tinción con violeta cristal. El virus que expresa GALV (Virus 15) mostró una mayor destrucción de células 9L de rata *in vitro* en comparación con un virus que no expresa GALV (Virus 24).

La Figura 11 muestra los efectos antitumorales del Virus 16 en ratones Balb/c que albergan tumores CT26 de ratón en los flancos izquierdo y derecho. Después se trataron grupos de 10 ratones con: Vehículo (3 inyecciones en los tumores del flanco derecho cada dos días); 5x10exp6 ufp de Virus 16 (mRP1) inyectados en el tumor del

flanco derecho cada dos días; anti-PD1 de ratón solo (10 mg/kg i.p. cada tres días, clon RMP1-14 de BioXCell); anti-CTLA-4 de ratón (3 mg/kg i.p. cada tres días, clon 9D9 de BioXCell); anti-PD1 de ratón junto con Virus 16; anti-CTLA4 de ratón junto con Virus 16; 1-metil tripotófano (IMT; Inhibidor de IDO (5 mg/ml en agua para beber)); anti-PD1 de ratón junto con 1-metil tripotófano; o anti-PD1 de ratón junto con 1-metil tripotófano y Virus 16. Se observaron los efectos sobre el tamaño del tumor durante 30 días más. Se observó una mayor reducción del tumor en los animales tratados con combinaciones de virus y bloqueo del punto de control que con los grupos de tratamiento únicos. La Figura 11A muestra que el uso de Virus 16 y anti-PD1 en combinación tiene un mejor efecto antitumoral que el uso de anti-PD1 o el virus solo. La Figura 11B muestra que el efecto antitumoral del Virus 16 en combinación con anti-CTLA-4 fue mejor que el efecto antitumoral del Virus 16 o del anti-CTLA-4 solo. La Figura 11C muestra que se observó una mayor reducción del tumor usando el Virus 16 junto con la inhibición tanto de anti-PD1 como de IDO en comparación con la inhibición de anti-PD1 y 1-MT en ausencia del virus.

La Figura 12 muestra la actividad antitumoral potenciada del Virus 16 en combinación con el bloqueo del punto de control inmunitario en tumores A20 de ratón en ambos flancos de ratones Balb/c en comparación con el virus solo o el bloqueo del punto de control solo (anti-PD1).

La Figura 13 muestra la estructura de los virus ICP34.5 e ICP47 eliminados que expresan construcciones de anticuerpos anti-CTLA-4 anti-ratón o anti-humano GALVR-, GM-CSF y optimizados por codones (moléculas scFv secretadas enlazadas a regiones Fc de IgG1 humana o de ratón). Los scFv contienen las cadenas variables ligeras y pesadas ([G₄S]₃) enlazadas del anticuerpo 9D9 (documento US2011044953: versión para ratón) y de ipilimumab (documento US20150283234; versión humana). También se muestra la estructura resultante del inhibidor de CTLA-4.

La Figura 14 muestra los efectos antitumorales del Virus 16 y del Virus 19 en un modelo de xenoinjerto humano (A549). Hubo tres inyecciones de Virus 16, Virus 19 o del vehículo durante una semana a tres niveles de dosis diferentes (N = 10/grupo). Se indican las dosis de los virus usados. Los efectos antitumorales del Virus 16 que expresa GALV fueron mejores que los del Virus 19 que no expresa GALV.

La Figura 15 demuestra los efectos de los virus de la invención que expresan GALVR- en células 9L en los flancos de ratas Fischer 344. Los siguientes tratamientos se administraron a grupos de ratas (diez por grupo), en un flanco de cada rata solo tres veces por semana durante tres semanas: 50 µl de vehículo; 50 µl de 10⁷ ufp/ml de Virus 19 (expresa mGM-CSF pero no GALV R-); o 50 µl de 10⁷ ufp/ml de Virus 16 (expresa tanto GM-CSF de ratón como GALV-R-). A continuación, se observaron los efectos sobre el crecimiento tumoral durante 30 días más. Se observó un control y una contracción superiores del tumor con el virus que expresa GM-CSF y GALV-R- en comparación con el virus que expresa GM-CSF solo.

La Figura 16 muestra los efectos antitumorales de virus que expresan anti-mCTLA-4 (virus 27), mCD40L (virus 32), mOX4OL (virus 35), m4-2BBL (virus 33), cada uno también con mGM-CSF y GALV- R- en comparación con el virus 16 (expresa GALV y mGM-CSF).

Breve descripción del listado de secuencias

SEQ ID NO: 1 es la secuencia de nucleótidos de GM-CSF de ratón.

SEQ ID NO: 2 es la secuencia de nucleótidos de una versión de codones optimizados de GM-CSF de ratón.

SEQ ID NO: 3 es la secuencia de nucleótidos de GM-CSF de humano.

SEQ ID NO: 4 es la secuencia de nucleótidos de una versión de codones optimizados de GM-CSF de humano.

SEQ ID NO: 5 es la secuencia de aminoácidos de GM-CSF de ratón.

SEQ ID NO: 6 es la secuencia de aminoácidos de GM-CSF de humano.

SEQ ID NO: 7 es la secuencia de nucleótidos de GALV-R-.

SEQ ID NO: 8 es la secuencia de nucleótidos de una versión de codones optimizados de GALV-R- (los primeros tres nucleótidos son opcionales)

SEQ ID NO: 9 es la secuencia de aminoácidos de GALV-R-.

SEQ ID NO: 10 es la secuencia de nucleótidos de una versión de codones optimizados de una versión de CD40L unida a la membrana humana.

SEQ ID NO: 11 es la secuencia de aminoácidos de una versión de CD40L unida a la membrana humana.

SEQ ID NO: 12 es la secuencia de nucleótidos de una versión de codones optimizados de una versión secretada multimérica de CD40L de humano.

SEQ ID NO: 13 es la secuencia de aminoácidos de una versión secretada multimérica de CD40L de humano.

SEQ ID NO: 14 es la secuencia de nucleótidos de una versión de codones optimizados de una versión secretada multimérica de CD40L de ratón.

SEQ ID NO: 15 es la secuencia de aminoácidos de una versión secretada multimérica de CD40L de ratón.

SEQ ID NO: 16 es una versión de codones optimizados de la secuencia de nucleótidos de CD40L humano de tipo silvestre.

SEQ ID NO: 17 es la secuencia de aminoácidos de CD40L humano de tipo silvestre.

SEQ ID NO: 18 es una versión de codones optimizados de la secuencia de nucleótidos de CD40L de ratón de tipo silvestre.

SEQ ID NO: 19 es la secuencia de aminoácidos de CD40L de ratón de tipo silvestre.

SEQ ID NO: 20 es la secuencia de nucleótidos de una versión de codones optimizados de 4-1BBL murino.

SEQ ID NO: 21 es la secuencia de nucleótidos de una versión de codones optimizados de 4-1BBL de humano.

SEQ ID NO: 22 es la secuencia de nucleótidos de una versión de codones optimizados de 4-1BBL de ratón secretado.

SEQ ID NO: 23 es la secuencia de nucleótidos de una versión de codones optimizados de 4-1BBL secretado humano.

SEQ ID NO: 24 es la secuencia de nucleótidos de una versión de codones optimizados de GITRL murino.

SEQ ID NO: 25 es la secuencia de nucleótidos de una versión de codones optimizados de GITRL de humano.

SEQ ID NO: 26 es la secuencia de nucleótidos de una versión de codones optimizados de GITRL murino secretado.

SEQ ID NO: 27 es la secuencia de nucleótidos de una versión de codones optimizados de GITRL humano secretado.

SEQ ID NO: 28 es la secuencia de nucleótidos de una versión de codones optimizados de OX40L murino.

SEQ ID NO: 29 es la secuencia de nucleótidos de una versión de codones optimizados de OX40L de humano.

SEQ ID NO: 30 es la secuencia de nucleótidos de una versión de codones optimizados de OX40L murino secretado.

SEQ ID NO: 31 es la secuencia de nucleótidos de una versión de codones optimizados de OX40L de humano secretado.

SEQ ID NO: 32 es la secuencia de nucleótidos de una versión de codones optimizados de ICOSL murino.

SEQ ID NO: 33 es la secuencia de nucleótidos de una versión de codones optimizados de ICOSL de humano.

SEQ ID NO: 34 es la secuencia de nucleótidos de un anticuerpo scFv CTLA-4 murino. Los primeros seis y los últimos ocho nucleótidos son sitios de restricción añadidos con fines de clonación.

SEQ ID NO: 35 es la secuencia de nucleótidos de un anticuerpo scFv CTLA-4 murino. Los primeros seis y los últimos ocho nucleótidos son sitios de restricción añadidos con fines de clonación.

SEQ ID NO: 36 es la secuencia de nucleótidos del promotor de CMV.

SEQ ID NO: 37 es la secuencia de nucleótidos del promotor de RSV.

SEQ ID NO: 38 es la secuencia de nucleótidos de poliA de BGH.

SEQ ID NO: 39 es la secuencia de nucleótidos de la poliA tardía de SV40.

SEQ ID NO: 40 es la secuencia de nucleótidos del promotor potenciador de SV40.

SEQ ID NO: 41 es la secuencia de nucleótidos de poliA de beta-globulina (RBG) de conejo.

SEQ ID NO: 42 es la secuencia de nucleótidos de GFP.

SEQ ID NO: 43 es la secuencia de nucleótidos del promotor LTR de MoMuLV.

SEQ ID NO: 44 es la secuencia de nucleótidos del promotor de EF1a.

SEQ ID NO: 45 es la secuencia de nucleótidos de poliA de HGH.

Descripción detallada de la invención

Virus oncolítico

El virus de la invención es oncolítico. Un virus oncolítico es un virus que infecta y se replica en las células tumorales, de tal manera que las células tumorales mueran. El virus tiene capacidad de replicación selectiva en tejido tumoral. Un virus es selectivamente competente para la replicación en tejido tumoral si se replica más eficazmente en tejido tumoral que en tejido no tumoral. La capacidad de un virus para replicarse en diferentes tipos de tejidos puede determinarse usando técnicas convencionales en la técnica.

El virus de la invención es un virus del herpes simple. Los virus de la invención pueden basarse en un virus de tipo silvestre (es decir, inalterado de la especie de virus parental), o un virus con alteraciones de genes o adiciones de genes. El virus es una cepa de VHS, incluyendo cepas de VHS1 y VHS2 y lo más preferentemente es una cepa de VHS1. En realizaciones particularmente preferidas, el virus de la invención se basa en un aislado clínico de la especie de virus que se va a usar. El aislado clínico puede haberse seleccionado basándose en que tiene propiedades ventajosas particulares para el tratamiento del cáncer.

El aislado clínico puede tener efectos antitumorales sorprendentemente buenos en comparación con otras cepas del mismo virus aisladas de otros pacientes, en donde un paciente es un individuo que alberga la especie de virus que se va a probar. Las cepas de virus usadas para la comparación para identificar virus de la invención pueden aislarse de un paciente o de un voluntario por lo demás sano (es decir, distinto de albergar la especie de virus a probar), preferentemente un voluntario saludable. Las cepas de VHS1 usadas para identificar un virus de la invención se aíslan típicamente del herpes labial de individuos que albergan VHS1, típicamente tomando un hisopo usando, por ejemplo, hisopo/recipiente de la marca Virocult (Sigma) que contiene el medio de transporte seguido de transporte a la instalación para usarse para más pruebas.

Después del aislamiento de los virus para compararlos de los individuos, normalmente se preparan reservas de virus, por ejemplo, cultivando los virus aislados en células BHK o vero. Preferentemente, esto se hace después de no más de 3 ciclos de congelación y descongelación entre la toma de la muestra y el cultivo, por ejemplo, células BHK o vero para preparar la reserva de virus para su uso adicional. Más preferentemente, la muestra de virus se ha sometido a 2 o menos de 2 ciclos de congelación descongelación antes de la preparación de la reserva para su uso adicional, más preferentemente un ciclo de congelación descongelación, lo más preferentemente sin ciclos de congelación descongelación. Se comparan los lisados de las líneas celulares infectadas con los virus preparados de esta manera después del aislamiento, típicamente probando la capacidad del virus para matar líneas de células tumorales *in vitro*. Como alternativa, las reservas víricas pueden almacenarse en condiciones adecuadas, por

ejemplo congelando, antes de las pruebas. Los virus de la invención tienen efectos antitumorales sorprendentemente buenos en comparación con otras cepas del mismo virus aisladas de otros individuos, preferentemente en comparación con los aislados de >5 individuos, más preferentemente >10 individuos distintos, lo más preferentemente >20 individuos distintos.

Las reservas de los aislados clínicos identificados para su modificación para producir virus de la invención (es decir, que tienen propiedades sorprendentemente buenas para matar células tumorales en comparación con otras cepas víricas con las que se compararon) se pueden almacenar en condiciones adecuadas, antes o después de la modificación, y se usan para generar más reservas según sea apropiado.

Un aislado clínico es una cepa de una especie de virus que se ha aislado de su hospedador natural. El aislado clínico se ha aislado preferentemente con el propósito de probar y comparar el aislado clínico con otros aislamientos clínicos de esa especie de virus para una propiedad deseada, que en el caso de los virus de la invención es la capacidad de matar células tumorales humanas. Los aislados clínicos que pueden usarse para la comparación también incluyen los de muestras clínicas presentes en repositorios clínicos, es decir, recopilados previamente para diagnóstico clínico u otros fines. En cualquier caso los aislados clínicos usados para la comparación e identificación de virus de la invención preferentemente se habrán sometido a un cultivo mínimo *in vitro* antes de ser probado para la propiedad deseada, preferentemente habiendo sido sometido solamente a un cultivo suficiente para permitir la generación de suficientes reservas para fines de pruebas comparativas. Como tal, los virus usados para la comparación para identificar virus de la invención también pueden incluir cepas depositadas, en donde la cepa depositada se ha aislado de un paciente, preferentemente una cepa de VHS1 aislada del herpes labial de un paciente.

El virus puede ser un aislado clínico modificado, en donde el aislado clínico mata dos o más líneas de células tumorales más rápidamente y/o a una dosis más baja *in vitro* de uno o más aislados clínicos de referencia de la misma especie de virus. Normalmente, el aislado clínico matará dos o más líneas de células tumorales en 72 horas, preferentemente en 48 horas, más preferentemente en 24 horas, de infección en multiplicidades de infección (MOI) menores o iguales a 0,1, preferentemente menor o igual a una MOI de 0,01, más preferentemente menor o igual a una MOI de 0,001. Preferentemente, el aislado clínico matará un amplio intervalo de líneas de células tumorales, tales como 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o, por ejemplo, todas de las siguientes líneas de células tumorales humanas: U87MG (glioma), HT29 (colorrectal), LNCaP (próstata), MDA-MB-231 (mama), SK-MEL-28 (melanoma), Fadu (carcinoma de células escamosas), MCF7 (mama), A549 (pulmón), MIAPACA-2 (páncreas), CAPAN-1 (páncreas), HT1080 (fibrosarcoma).

Por lo tanto, el virus de la invención puede ser capaz de matar células de dos o más, tales como 3, 4, 5, 6, 7 o más, tipos diferentes de tumores tales como dos o más, tales como 3, 4, 5, 6, 7 o más, tumores sólidos, incluyendo pero no limitado a células de tumor colorrectal, células de tumor de próstata, células de tumor de mama, células de tumor de ovario, células de melanoma, células de carcinoma de células escamosas, células de tumor de pulmón, células de tumor pancreático, células de sarcoma y/o células de fibrosarcoma.

La muerte de la línea de células tumorales puede determinarse mediante cualquier método adecuado. Normalmente, una muestra se aísla primero de un paciente, preferentemente, en el caso de VHS1, de un herpes labial, se usa para infectar células BHK u otra línea celular adecuada tal como las células vero. Las muestras positivas se identifican típicamente por la presencia de un efecto citopático (CPE) 24-72 horas después de la infección, tal como 48 horas después de la infección, y se confirman que es la especie vírica diana mediante, por ejemplo, inmunohistoquímica o PCR. Después se generan reservas víricas a partir de las muestras positivas. Normalmente se prueba una muestra de la reserva vírica y se compara con otras muestras generadas de la misma manera usando hisopos de diferentes pacientes. Las pruebas pueden llevarse a cabo determinando el nivel de CPE alcanzado en un intervalo de multiplicidad de infecciones (MOI) y en diversos momentos después de la infección.

Por ejemplo, las líneas celulares al 80 % de confluencia pueden infectarse con la muestra vírica a MOI de 1, 0,1, 0,01 y 0,001 y las placas duplicadas se incuban durante 24 y 48 horas a 37 °C, 5 % de CO₂ antes de la determinación del grado de destrucción de las células víricas. Esto puede determinarse mediante, por ejemplo, fijación de las células con glutaraldehído y tinción con violeta cristal usando métodos convencionales. El nivel de lisis celular puede evaluarse mediante métodos convencionales tales como la observación general, microscopía (recuento de células) y fotografía. El método puede repetirse incubando las células durante períodos de tiempo más cortos, tales como 8, 12 o 16 horas, o períodos de tiempo más largos, tales como 72 horas, antes de que se determine la muerte celular, o a MOI adicionales tales como 0,0001 o menos.

También pueden realizarse experimentos de curva de crecimiento para evaluar la capacidad de diferentes aislados clínicos para replicarse en líneas de células tumorales *in vitro*. Por ejemplo, las líneas celulares al 80 % de confluencia pueden infectarse con la muestra vírica a MOI de 1, 0,1, 0,01 y 0,001, incubada a 37 °C, 5 % de CO₂ y las células lisadas, típicamente por congelación/descongelación, a 0, 8, 16, 24 y 48 horas después de la infección antes de determinar el grado de muerte de las células víricas. Esto puede determinarse mediante, por ejemplo, evaluación de los títulos víricos mediante un ensayo en placa convencional.

Un aislado clínico de la invención puede matar líneas de células tumorales infectadas más rápidamente y/o a una menor MOI que los otros aislados clínicos con los que se compara, preferentemente 2, 3, 4, 5 o 10 o más, aislados clínicos distintos de la misma especie de virus. El aislado clínico de la invención normalmente mata a una proporción un 10 %, 25 % o 50 % mayor de las células tumorales presentes a una MOI y un punto de tiempo particulares que al menos uno, preferentemente 2, 3, 4, 5 o 10 o más, aislados clínicos distintos del mismo tipo de virus a la misma MOI y punto de tiempo con el que se comparó. El aislado clínico de la invención normalmente mata la misma o una mayor proporción de células tumorales a una MOI que es la mitad o menos de la mitad de la MOI en el que uno o más, preferentemente 2, 3, 4, 5, 10 o 15 o más, aislados clínicos distintos de la misma especie de virus usados para la comparación en el mismo momento, típicamente a las 12, 24 y/o 48 horas, mata la misma proporción de células tumorales. Preferentemente, un aislado clínico de la invención normalmente mata la misma o una mayor proporción de células tumorales a una MOI que es la 5 o 10 veces menor que la MOI en la cual uno o más, preferentemente 2, 3, 4, 5, 10 o 15 o más, aislados clínicos distintos del mismo virus usados para la comparación en el mismo momento, típicamente a las 12, 24 y/o 48 horas mata la misma proporción de células tumorales. Las capacidades mejoradas de muerte de células tumorales de un virus de la invención se logran típicamente en comparación con al menos el 50 %, el 75 % o el 90 % de los otros aislamientos clínicos de la misma especie vírica usada para la comparación. El virus se compara preferentemente con al menos 4 cepas distintas de virus, tales como, por ejemplo, 7, 9, 19, 39 o 49 cepas distintas de virus de la misma especie.

Las cepas aisladas pueden probarse en lotes, por ejemplo, de 4-8 cepas víricas a la vez, en, por ejemplo, 4-8 de las líneas de células tumorales a la vez. Para cada lote de experimentos, el grado de muerte alcanzado se clasifica en cada línea celular de la mejor (es decir, menos células supervivientes en cada punto temporal/MOI) a la peor (es decir, la mayoría de células supervivientes para cada punto temporal/MOI) para los virus que se comparan en ese experimento. Las cepas de virus de cada experimento que se desempeñan mejor en toda la gama de líneas de células tumorales probadas (es decir, que se clasificaron consistentemente como una de las mejores para matar las líneas celulares) pueden luego compararse directamente en experimentos adicionales usando otros aislados clínicos y/u otras líneas de células tumorales para identificar las mejores cepas de virus en el total de, por ejemplo, > 20 cepas de virus muestreadas.

En una realización preferida, el virus de la invención deriva de una cepa seleccionada de:

cepa RH018A que tiene el número de registro ECCAC 16121904;
 cepa RH004A que tiene el número de registro ECCAC 16121902;
 cepa RH031A que tiene el número de registro ECCAC 16121907;
 cepa RH040B que tiene el número de registro ECCAC 16121908;
 cepa RH015A que tiene el número de registro ECCAC 16121903;
 cepa RH021A que tiene el número de registro ECCAC 16121905;
 cepa RH023A que tiene el número de registro ECCAC 16121906; y
 cepa RH047A que tiene el número de registro ECCAC 16121909.

Más preferentemente, el virus de la invención deriva de una cepa seleccionada de:

cepa RH018A que tiene el número de registro ECCAC 16121904;
 cepa RH004A que tiene el número de registro ECCAC 16121902;
 cepa RH031A que tiene el número de registro ECCAC 16121907;
 cepa RH040B que tiene el número de registro ECCAC 16121908; y
 cepa RH015A que tiene el número de registro ECCAC 16121903;

Lo más preferentemente, el virus de la invención deriva de la cepa RH018A que tiene el número de registro EACC 16121904.

Un VHS de la invención es capaz de replicarse selectivamente en tumores, tales como tumores humanos. Normalmente, el VHS se replica eficazmente en tumores diana pero no se replica eficazmente en tejido no tumoral. Este VHS puede comprender una o más mutaciones en uno o más genes víricos que inhiben la replicación en tejido normal pero aún permiten la replicación en tumores. La mutación puede, por ejemplo, ser una mutación que impide la expresión de ICP34.5 funcional, ICP6 y/o timidina quinasa por el VHS.

En una realización preferida, los genes que codifican ICP34.5 se mutan para conferir actividad oncolítica selectiva al VHS. Las mutaciones de los genes que codifican ICP34.5 que impiden la expresión de ICP34.5 funcional se describen en Chou *et al.* (1990) Science 250:1262-1266, Maclean *et al.* (1991) J. Gen. Virol. 72:631-639 y Liu *et al.* (2003) Gene Therapy 10:292-303. El gen que codifica ICP6 y/o el gen que codifica la timidina quinasa también pueden estar inactivados, al igual que otros genes, siempre que dicha inactivación no evite que el virus infecte o se replique en los tumores.

El VHS puede contener una mutación o mutaciones adicionales que potencian la replicación del VHS en tumores. La mejora resultante de la replicación vírica en tumores no solo da como resultado una mejor destrucción directa de las células tumorales 'oncolíticas' por el virus, sino que también mejora el nivel de expresión génica heteróloga (es decir,

un gen insertado en el virus, en el caso de virus de la invención, genes que codifican GM-CSF y molécula o moléculas activadoras de la vía coestimuladora) y aumenta la cantidad de antígeno tumoral liberado cuando las células tumorales mueren, ambos de los cuales pueden también mejorar las propiedades inmunogénicas de la terapia para el tratamiento del cáncer. Por ejemplo, en una realización preferida de la invención, la delección del gen que codifica ICP47 de una manera que coloca el gen US11 bajo el control del promotor temprano inmediato que normalmente controla la expresión del gen que codifica ICP47 conduce a una replicación mejorada en tumores (véase Liu *et al.*, 2003).

Otras mutaciones que colocan la secuencia codificante de US11, que es un gen tardío del VHS, bajo el control de un promotor que no depende de la replicación vírica también puede introducirse en un virus de la invención. Tales mutaciones permiten la expresión de US11 antes de que se produzca la replicación del VHS y mejoran la replicación vírica en tumores. En particular, tales mutaciones potencian la replicación de un VHS que carece de genes que codifican ICP34.5 funcionales.

En consecuencia, en una realización el VHS de la invención comprende un gen US11 unido operativamente a un promotor, en donde la actividad del promotor no depende de la replicación vírica. El promotor puede ser un promotor temprano inmediato (IE) o un promotor distinto del VHS que sea activo en mamíferos, preferentemente en, células tumorales de seres humanos. El promotor puede, por ejemplo, ser un promotor eucariota, tal como un promotor derivado del genoma de un mamífero, preferentemente un ser humano. El promotor puede ser un promotor ubicuo (tal como un promotor de β -actina o tubulina) o un promotor específico de célula, tal como un promotor específico de tumor. El promotor puede ser un promotor vírico, tales como el promotor de repetición terminal larga del virus de la leucemia murina de Moloney (LTR MMLV) o el promotor IE de citomegalovirus (CMV) humano o de ratón. Los promotores tempranos inmediatos (IE) de VHS son bien conocidos en la técnica. El promotor IE de VHS puede ser el promotor que impulsa la expresión de ICP0, ICP4, ICP22, ICP27 o ICP47.

Los genes mencionados anteriormente, cuya inactivación funcional proporciona la propiedad de selectividad tumoral al virus, puede volverse funcionalmente inactivo por cualquier método adecuado, por ejemplo, por delección o sustitución de todo o parte del gen y/o secuencia de control del gen o por inserción de uno o más ácidos nucleicos en o en lugar del gen y/o la secuencia de control del gen. Por ejemplo, los métodos de recombinación homóloga, que son convencionales en la técnica, pueden usarse para generar el virus de la invención. Alternativamente, pueden usarse enfoques basados en cromosomas artificiales bacterianos (BAC, por sus siglas en inglés).

Como se usa en el presente documento, el término "gen" significa la secuencia de nucleótidos que codifica una proteína, es decir, la secuencia codificante del gen. Los diversos genes mencionados anteriormente pueden volverse no funcionales mutando el propio gen o las secuencias de control que flanquean el gen, por ejemplo, la secuencia promotora. Las delecciones pueden eliminar una o más porciones del gen, el gen completo o el gen completo y todas o algunas de las secuencias de control. Por ejemplo, puede hacerse la delección de un solo nucleótido dentro del gen, dando como resultado un desplazamiento de marco. Sin embargo, puede realizarse una supresión más grande, por ejemplo, al menos aproximadamente el 25 %, más preferentemente al menos aproximadamente el 50 % de la secuencia codificante y/o no codificante total. En una realización preferida, el gen que se vuelve funcionalmente inactivo se elimina. Por ejemplo, el gen completo y, opcionalmente, algunas de las secuencias flanqueantes pueden eliminarse del virus. Cuando dos o más copias del gen están presentes en el genoma vírico, ambas copias del gen se vuelven funcionalmente inactivas.

Un gen puede inactivarse sustituyendo otras secuencias, por ejemplo, sustituyendo todo o parte del gen endógeno por un gen heterólogo y opcionalmente una secuencia promotora. Cuando no se sustituye ninguna secuencia promotora, el gen heterólogo puede insertarse de manera que esté controlado por el promotor del gen que se vuelve no funcional. En un VHS de la invención, se prefiere que los genes que codifican ICP34.5 se vuelvan no funcionales mediante la inserción de un gen o genes heterólogos y una secuencia promotora o secuencias unidas operativamente al mismo, y opcionalmente otros elementos reguladores tales como secuencias de poliadenilación, en cada uno de los loci génicos que codifican ICP34.5.

Un virus de la invención se usa para expresar GM-CSF y una molécula activadora de la vía inmunitaria coestimuladora, seleccionada de un ligando de CD40 (CD40L), un ligando de ICOS, un ligando de GITR, un ligando de 4-1-BB, un ligando de OX40, TL1A, un ligando de CD30, CD27, un ligando de *flt3* y un inhibidor de CTLA-4 en tumores. Esto se logra insertando un gen heterólogo que codifica la GM-CSF y un gen heterólogo que codifica la molécula activadora de la vía inmunitaria coestimuladora en el genoma de virus competente para la replicación en el que cada gen está bajo el control de una secuencia promotora. Como la replicación de dicho virus se producirá de forma selectiva en el tejido tumoral, la expresión de la GM-CSF y la proteína activadora de la vía inmunitaria coestimuladora por parte del virus también se mejora en el tejido tumoral en comparación con el tejido no tumoral en el cuerpo. La expresión mejorada se produce cuando la expresión es mayor en los tumores en comparación con otros tejidos del cuerpo. También se esperaría que las proteínas expresadas por el virus oncolítico estén presentes en los ganglios linfáticos de drenaje de tumores infectados por virus oncolíticos, incluso debido al tráfico de proteínas expresadas y de virus en y sobre las células presentadoras de antígenos del tumor. En consecuencia, la invención proporciona beneficios de expresión tanto de una GM-CSF como de la molécula activadora de la vía inmunitaria coestimuladora de forma selectiva en tumores y nódulos linfáticos que drenan tumores combinados con el efecto

antitumoral proporcionado por la replicación del virus oncolítico.

El virus de la invención comprende un gen que codifica la GM-CSF heteróloga. La secuencia del gen que codifica la GM-CSF puede ser optimizada por codón para aumentar los niveles de expresión de las respectivas proteínas en células diana en comparación con si se usa la secuencia no alterada.

El virus de la invención comprende un gen heterólogo que comprende una molécula activadora de la vía inmunitaria coestimuladora. La molécula activadora de la vía inmunitaria coestimuladora es un ligando de CD40 (CD40L), un ligando de ICOS, un ligando de GITR, un ligando de 4-1-BB, un ligando de OX40, TL1A, un ligando de CD30, CD27, un ligando de flt3 o un inhibidor de CTLA-4. Las moléculas activadoras de la vía inmunitaria coestimuladora incluyen proteínas y moléculas de ácido nucleico (por ejemplo, secuencias de aptámero). Los ejemplos de moléculas activadoras de la vía inmunitaria coestimuladora incluyen el ligando de CD40, el ligando de GITR, el ligando de 4-1-BB, el ligando de OX40, el ligando de ICOS, el ligando de flt3, TL1A, el ligando de CD30, CD70 y los anticuerpos monocatenarios que se dirigen a los respectivos receptores para estas moléculas (CD40, GITR, 4-1-BB, OX40, ICOS, flt3, DR3, CD30, CD27). Esta molécula activadora de la vía inmunitaria coestimuladora puede ser una versión soluble de CD40L, GITRL, 4-1-BBL, OX40L, ICOSL, flt3L, TL1A, CD30L o CD70L.

Los activadores de las vías inmunitarias coestimuladoras incluyen ligandos mutantes o de tipo silvestre, solubles, ligandos secretados y/o unidos a la membrana y anticuerpos agonistas que incluyen anticuerpos monocatenarios. Los virus de la invención codifican preferentemente una o más de CD40L, ICOSL, 4-1-BBL, GITRL u OX40L.

El inhibidor de una ruta co-inhibidora puede ser un inhibidor de CTLA-4. El inhibidor de CTLA-4 es típicamente una molécula tales como un péptido o proteína que se une a CTLA-4 y reduce o bloquea la señalización a través de CTLA-4, por ejemplo, reduciendo la activación por B7. Al reducir la señalización CTLA-4, el inhibidor reduce o retira el bloqueo de las vías inmunoestimulantes por CTLA-4.

El inhibidor de CTLA-4 es preferentemente un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo. El término "anticuerpo" como se hace referencia en el presente documento incluye anticuerpos completos y cualquier fragmento de unión a antígeno (es decir, la "porción de unión a antígeno") o cadenas sencillas de los mismos. Un anticuerpo se refiere a una glucoproteína que comprende al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (kappa) (L) interconectadas por enlaces disulfuro o una porción de unión a antígeno de las mismas. Cada cadena pesada está compuesta por una región variable de cadena pesada (abreviada en el presente documento como VH) y una región constante de cadena pesada. Cada cadena ligera está formada por una región variable de cadena ligera (abreviada en el presente documento como VL) y una región constante de cadena ligera. Las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras contienen un dominio de unión que interacciona con un antígeno. Las regiones VH y VL pueden subdividirse además en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco (FR). Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar la unión de la inmunoglobulina a los tejidos o factores del hospedador, incluyendo diversas células del sistema inmunitario (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema del complemento clásico.

El anticuerpo es típicamente un anticuerpo monoclonal. El anticuerpo puede ser un anticuerpo quimérico. El anticuerpo es preferentemente un anticuerpo humanizado y más preferentemente un anticuerpo humano.

La frase "fragmento de unión a antígeno" de un anticuerpo se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que retienen la capacidad de unirse específicamente a CTLA-4. El fragmento de unión al antígeno también conserva la capacidad de inhibir CTLA-4 y, por lo tanto, de reducir o retirar el bloqueo de CTLA-4 de una respuesta inmunitaria estimulante. Los ejemplos de fragmentos de adecuados incluyen un fragmento Fab, un fragmento F(ab')₂, un fragmento Fab', un fragmento Fd, un fragmento Fv, un fragmento dAb y una región determinante de complementariedad (CDR) aislada. Los anticuerpos monocatenarios como scFv y los anticuerpos de cadena pesada como VHH y los anticuerpos de camello también pretenden incluirse dentro del término "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo. En una realización preferida, el anticuerpo es un scFv. Se desvelan ejemplos de moléculas scFv adecuadas en, por ejemplo, el documento WO2007/123737 y el documento WO2014/066532. El scFv puede estar codificado por la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 34 la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 35.

Los virus de la invención pueden codificar una o más moléculas activadoras de la vía inmunitaria coestimuladora, preferentemente 1, 2, 3 o 4 moléculas activadoras de la vía inmunitaria coestimuladora, más preferentemente 1 o 2 moléculas activadoras de la vía inmunitaria coestimuladora.

Por ejemplo, el virus puede comprender genes que codifican:

- CD40L y una o más de ICOSL, 4-1-BBL, GITRL, OX40L y un inhibidor de CTLA-4;
- ICOSL y una o más de CD40L, 4-1-BBL, GITRL, OX40L y un inhibidor de CTLA4;
- 4-1-BBL y una o más de CD40L, ICOSL, GITRL, OX40L y un inhibidor de CTLA-4;
- GITRL y una o más de CD40L, ICOSL, 4-1-BBL, OX40L y un inhibidor de CTLA-4;

- OX40L y uno o más de CD40L, ICOSL, 4-1-BBL, OX40L y un inhibidor de CTLA-4;
- un inhibidor de CTLA-4 y uno o más de CD40L, ICOSL, 4-1-BBL, GITRL y OX40L.

La secuencia del gen que codifica la molécula activadora de la vía inmunitaria coestimuladora puede tener un codón optimizado para aumentar los niveles de expresión de las proteínas respectivas en las células diana en comparación con si se usa la secuencia inalterada.

El virus de la invención puede comprender uno o más genes heterólogos adicionales a GM-CSF y una molécula activadora de la vía inmunitaria coestimuladora incluyen, en una realización preferida, una proteína fusogénica tal como GALV-.

La proteína fusogénica puede ser cualquier proteína heteróloga capaz de promover la fusión de una célula infectada con el virus de la invención con otra célula. Una proteína fusogénica, preferentemente una glucoproteína vírica modificada o de tipo silvestre (es decir, modificada para aumentar sus propiedades fusogénicas), es una proteína que es capaz de inducir la fusión de célula a célula (formación de sincitios) de las células en las que se expresa. Ejemplos de glucoproteínas fusogénicas incluyen VSV-G, sincitina-1 (del retrovirus endógeno humano W (HERV-W)) o sincitina-2 (de HERVFRDE1), paramixovirus SV5-F, virus del sarampión-H, virus del sarampión-F, RSV -F, la glucoproteína de un retrovirus o lentivirus, como el virus de la leucemia del mono gibbon (GALV), el virus de la leucemia murina (MLV), el virus del mono Mason-Pfizer (MPMV) y el virus de la anemia infecciosa equina (VAIE) con el péptido transmembrana R eliminado (Versiones R). En una realización preferida, la proteína fusogénica es de GALV y tiene el péptido R eliminado (GALV-R-).

El virus de la invención puede comprender opcionalmente múltiples copias del gen que codifica la proteína fusogénica, preferentemente 1 o 2 copias. El virus puede comprender dos o más proteínas fusogénicas diferentes, incluida cualquiera de las proteínas fusogénicas enumeradas anteriormente.

La proteína o proteínas fusogénicas expresadas opcionalmente por un virus de la invención pueden ser idénticas a una proteína de origen natural o pueden ser una proteína modificada.

El gen que codifica la proteína fusogénica (gen fusogénico) puede tener una secuencia de ácido nucleico de origen natural o una secuencia modificada. La secuencia del gen fusogénico puede, por ejemplo, modificarse para aumentar las propiedades fusogénicas de la proteína codificada o para proporcionar optimización de codones y, por tanto, aumentar la eficacia de expresión de la proteína codificada.

El virus de la invención, preferentemente VHS1, puede expresar al menos tres genes heterólogos, en donde cada uno de los tres genes heterólogos está impulsado por un promotor diferente seleccionado del promotor de CMV, el promotor de RSV, el promotor de EF1a, el promotor de SV40 y un promotor de LTR retroviral. El virus puede, por ejemplo, expresar cuatro genes heterólogos, en donde cada uno de los cuatro genes heterólogos está impulsado por un promotor diferente seleccionado del promotor de CMV, el promotor de RSV, el promotor de EF1a, el promotor de SV40 y un promotor de LTR retroviral. El promotor retroviral de LTR es preferentemente de MMLV (SEQ ID NO: 43), también conocido como MoMuLV. Los genes heterólogos pueden terminarse mediante secuencias de poliadenilación. Las secuencias de poliadenilación pueden ser iguales o diferentes. Preferentemente cada gen heterólogo está terminado por una secuencia de poliadenilación diferente, que se selecciona preferentemente de secuencias de poliadenilación de BGH, SV40, HGH y RBG.

El virus de la invención, preferentemente VHS1, puede expresar al menos tres genes heterólogos, en donde cada uno de los tres genes heterólogos está terminado por una secuencia de poliadenilación diferente seleccionada de las secuencias de poliadenilación de BGH, SV40, HGH y RBG. El virus puede, por ejemplo, expresar cuatro genes heterólogos terminados por cada una de las secuencias de poliadenilación de BGH, SV40, HGH y RBG, respectivamente.

Producción de virus

Los virus de la invención se pueden construir usando métodos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, plásmidos o BAC que codifican el genoma vírico que se va a empaquetar, incluidos los genes que codifican las moléculas fusogénicas e inmunoestimulantes bajo un control regulador adecuado, se pueden construir mediante técnicas convencionales de biología molecular y se pueden transfectar en células permisivas de las que se pueden recuperar virus recombinantes.

Alternativamente, en una realización preferida, se pueden construir plásmidos que contienen regiones de ADN que flanquean el sitio de inserción pretendido y luego cotransfectar en células permisivas con ADN genómico vírico de manera que la recombinación homóloga entre las regiones flanqueantes del sitio de inserción diana en el plásmido y las mismas regiones en el virus parental. A continuación, los virus recombinantes se pueden seleccionar y purificar mediante la pérdida o adición de una función insertada o delecionada por el plásmido utilizado para la modificación, por ejemplo, inserción o deleción de un gen marcador como GFP o lacZ del virus parental en el sitio de inserción previsto. En una realización más preferida, el sitio de inserción es el locus ICP34.5 de HSV y, por lo tanto, el

plásmido usado para la manipulación contiene secuencias de VHS que flanquean este sitio de inserción, entre las cuales se encuentran un casete de expresión que codifica GM-CSF y la molécula activadora de la vía inmunitaria coestimuladora. En este caso, el virus parental puede contener un casete que codifica GFP en lugar de ICP34.5 y las placas de virus recombinantes se seleccionan mediante la pérdida de expresión de GFP. En una realización más preferida, el gen US11 de VHS también se expresa como un gen IE. Esto se puede lograr mediante la delección de la región que codifica ICP47 o por otros medios.

Las secuencias que codifican GM-CSF y las secuencias que codifican la molécula activadora de la vía inmunitaria coestimuladora se insertan en el genoma vírico bajo un control regulador apropiado. Esto puede estar bajo el control regulador de los promotores naturales de las especies de virus de la invención utilizadas, dependiendo de la especie y el sitio de inserción, o preferentemente bajo el control de promotores heterólogos. Los promotores heterólogos adecuados incluyen promotores de mamíferos, tales como el promotor IEF2a o el promotor de actina. Son más preferidos los promotores víricos fuertes tales como el promotor CMVIE, el RSVLTR, el MMLVLTR, otros promotores retrovíricos LTR o promotores derivados de SV40. Preferiblemente, cada gen exógeno (por ejemplo, que codifica el GM-CSF y la molécula activadora de la vía inmunitaria coestimuladora) estará bajo un control de promotor separado, pero también puede expresarse a partir de una única transcripción de ARN, por ejemplo, mediante la inserción de un sitio interno de entrada de ribosoma (IRES) entre secuencias codificantes de proteínas. El ARN derivado de cada promotor normalmente se termina utilizando una secuencia de poliadenilación (por ejemplo, secuencias de mamíferos como la secuencia poli A de la hormona del crecimiento bovino (BGH), secuencias de poliadenilación sintética, secuencia de poliadenilación de betaglobina de conejo o secuencias víricas como la secuencia de poliadenilación temprana o tardía de SV40).

Composiciones farmacéuticas

La invención proporciona una composición farmacéutica que comprende el virus y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. Los vehículos y diluyentes adecuados incluyen soluciones salinas isotónicas, por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato. La composición puede comprender además otros constituyentes tales como azúcares o proteínas para mejorar propiedades tales como la estabilidad del producto. Alternativamente puede usarse una formulación liofilizada, que se reconstituye en un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable antes de su uso.

La elección del vehículo, si se requiere, es frecuentemente una función de la vía de administración de la composición. Dentro de esta invención, las composiciones pueden formularse para cualquier vía y medio de administración adecuados. Los vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables son los que se usan en composiciones adecuadas para administración intratumoral, administración intravenosa/intraarterial, administración en el cerebro o administración en una cavidad corporal (por ejemplo, vejiga, cavidad pleural o por administración intraperitoneal). La composición puede administrarse en cualquier forma adecuada, preferentemente como un líquido.

El virus de la invención puede estar incluido en un vial, ampolla o jeringa estériles como un producto de fabricación.

Usos médicos

La invención proporciona el virus de la invención para su uso en el tratamiento de un cuerpo humano o animal mediante terapia, particularmente para su uso en un método de tratamiento de cáncer. El cáncer está normalmente en un mamífero, preferentemente en un ser humano. El virus mata las células tumorales infectadas mediante lisis y provocando que las células tumorales infectadas se fusionen entre sí. El virus de la invención también provoca una respuesta inmunitaria antitumoral sistémica, aumentada a través de la expresión de GM-CSF y la molécula activadora de la vía inmunitaria coestimuladora seleccionada de ligando de CD40 (CD40L), ligando de ICOS, ligando de GITR, ligando de 4-1-BB, ligando de OX40, TL1A, ligando de CD30, CD27, ligando de flt3 y un inhibidor de CTLA-4, que también mata las células cancerosas.

El virus de la invención es particularmente útil en el tratamiento de cualquier tumor sólido incluyendo cualquier adenocarcinoma, carcinoma, melanoma o sarcoma. Por ejemplo, el virus de la invención es útil para el tratamiento de cánceres de cabeza y cuello, próstata, mama, ovario, pulmón, hígado, endometrio, vejiga, vesícula biliar, páncreas, colon, riñón, estómago/gástrico, esófago o cuello uterino, mesotelioma, melanoma u otro cáncer de piel, linfoma, glioma u otro cáncer del sistema nervioso, o sarcomas tales como sarcoma de tejidos blandos.

El virus de la invención se puede usar para tratar tumores malignos, incluyendo tumores que han hecho metástasis desde el sitio del tumor original. En esta realización, el virus puede administrarse al tumor primario o a uno o más tumores secundarios.

El virus de la invención puede administrarse en combinación con otros agentes terapéuticos, incluyendo quimioterapia, terapia dirigida, inmunoterapia (incluyendo el bloqueo del punto de control inmunitario, es decir, la administración de uno o más antagonistas de una ruta inmunitaria co-inhibidora y/o uno o más agonistas de una ruta inmunitaria coestimuladora) y/o en combinación con radioterapia y/o en combinación con cualquier combinación de

estos. El agente terapéutico es preferentemente un agente anti-cáncer.

El virus de la invención puede administrarse en combinación con un segundo virus, tal como un segundo virus oncolítico.

5 Por ejemplo, el agente terapéutico puede comprender un inmunógeno (que incluye un antígeno recombinante o de origen natural, incluyendo tal antígeno o combinación de antígenos administrados como ADN o ARN en el cual está/están codificados), para estimular aún más una respuesta inmunitaria, tal como una respuesta inmunitaria celular o humoral, a las células tumorales, particularmente neoantígenos tumorales. El agente terapéutico puede ser
10 un agente destinado a aumentar o potenciar una respuesta inmunitaria, tales como una citocina, un agente destinado a inhibir una ruta de punto de control inmunológico o estimular una ruta de potenciación inmunitaria o un agente que inhibe la actividad de las células T reguladoras (Treg) o células supresoras derivadas de mieloides (MDSC).

15 El agente terapéutico puede ser un agente conocido para su uso en un tratamiento terapéutico del cáncer existente. El agente terapéutico puede ser radioterapia o un agente quimioterapéutico. El agente terapéutico puede seleccionarse de ciclofosfamida, agentes de tipo alquilante tales como cisplatino o melfalán, alcaloides y terpenoides vegetales tales como vincristina o paclitaxel (Taxol), antimetabolitos tales como 5-fluorouracilo, inhibidores de la topoisomerasa tipo I o II tales como camptotecina o doxorubicina, antibióticos citotóxicos tales como actinomicina,
20 antraciclina tales como epirrubicina, glucocorticoides tales como triamcinolona, inhibidores de la síntesis de proteínas, ADN y/o ARN tales como metotrexato y dacarbaxina, inhibidores de la histona desacetilasa (HDAC) o cualquier otro agente de quimioterapia.

El agente terapéutico puede ser uno o una combinación de: inmunoterapéuticos o inmunomoduladores, tales como
25 agonistas de TLR; agentes que regulan negativamente las células T reguladoras tales como ciclofosfamida; o agentes diseñados para bloquear puntos de control inmunitarios o estimular rutas de potenciación inmunitaria, incluyendo pero no limitado a anticuerpos monoclonales, tales como un inhibidor de CTLA-4, un inhibidor de PD-1, un inhibidor de PD-L1, un inhibidor de LAG-3, un inhibidor de TIM-3, un inhibidor de VISTA, un inhibidor de CSF1R, un inhibidor de IDO, un inhibidor de CEACAM1, un agonista de GITR, un agonista de 4-1-BB, un inhibidor de KIR, un
30 inhibidor de SLAMF7, un agonista de OX40, un agonista de CD40, un agonista de ICOS o un inhibidor de CD47. En una realización preferida, el agente terapéutico es un inhibidor de CTLA-4 tal como un anticuerpo anti-CTLA-4, un inhibidor de PD1, tal como un anticuerpo anti-PD-1 o un inhibidor de PD-L1 tal como un anticuerpo anti-PD-L1. Tales inhibidores, agonistas y anticuerpos pueden generarse y probarse mediante métodos convencionales conocidos en la técnica.

35 Los agentes inmunoterapéuticos también pueden incluir anticuerpos biespecíficos, terapias basadas en células basadas en células dendríticas, linfocitos NK o células T modificadas genéticamente, tales como células CAR-T o T que expresan receptores de células T modificados genéticamente. Los agentes inmunoterapéuticos también incluyen agentes que se dirigen a una mutación genética específica que se produce en tumores, agentes destinados a inducir
40 respuestas inmunitarias a antígenos tumorales específicos o combinaciones de antígenos tumorales, incluyendo neoantígenos y/o agentes destinados a activar la ruta STING/cGAS, TLR u otra respuesta inmunitaria innata y/o ruta inflamatoria, incluyendo agentes intratumorales.

Por ejemplo, un virus de la invención puede usarse: en combinación con dacarbazina, un inhibidor de BRAF y o
45 CTLA-4, bloqueo de PD1 o PD-L1 para tratar melanoma; en combinación con taxol, doxorubicina, vinorelbina, ciclofosfamida y/o gemcitabina para tratar el cáncer de mama; en combinación con 5-fluorouracilo y opcionalmente leucovorina, irinotecán y/o oxaliplatino para tratar el cáncer colorrectal; en combinación con taxol, carboplatino, vinorelbina y/o gemcitabina, bloqueo de PD-1 o PD-L1 para tratar el cáncer de pulmón; en combinación con
50 cisplatino y/o radioterapia para tratar el cáncer de cabeza y cuello.

El agente terapéutico puede ser un inhibidor de la ruta de la idolamina 2,3-dioxigenasa (IDO). Algunos ejemplos de inhibidores de IDO incluyen epacadostat (INCB024360), 1-metil-triptófano, Indoximod (1-metil-D-triptófano), GDC-0919 o F001287.

55 El mecanismo de acción de IDO en la supresión de las respuestas inmunitarias antitumorales también puede suprimir las respuestas inmunitarias generadas después de la terapia con virus oncolíticos. La expresión de IDO se induce por la activación del receptor de tipo toll (TLR) y el interferón- γ y ambos de los cuales pueden resultar de una infección por virus oncolítico. Una realización del uso de la terapia con virus oncolíticos para el tratamiento del
60 cáncer incluye la combinación del virus oncolítico de la invención con un inhibidor de la ruta IDO y opcionalmente, uno o más antagonistas adicionales de una ruta co-inhibitoria inmunitaria y/o uno o más agonistas de una ruta coestimuladora inmunitaria, incluyendo los que se dirigen a CTLA-4, PD-1 y/o PD-L1.

Cuando se usa un agente terapéutico y/o radioterapia junto con un virus de la invención, la administración del virus y el agente terapéutico y/o la radioterapia pueden ser contemporáneas o separadas en el tiempo. La composición de
65 la invención puede administrarse antes, junto con o después del agente terapéutico o la radioterapia. El método de tratamiento del cáncer puede comprender múltiples administraciones del virus de la invención y/o del agente

terapéutico y/o radioterapia. En realizaciones preferidas, en el caso de combinación con bloqueo de puntos de control inmunológico u otros agentes potenciadores del sistema inmunológico, el virus de la invención se administra una o varias veces antes de la administración simultánea del bloqueo del punto de control inmunológico u otro agente o agentes potenciadores inmunitarios en lo sucesivo, o simultáneamente con la administración del bloqueo del punto de control inmunitario u otro agente o agentes potenciadores inmunitarios sin la administración previa del virus de la invención.

El virus de la invención puede administrarse a un sujeto por cualquier vía adecuada. Normalmente, un virus de la invención se administra mediante inyección intratumoral directa. La inyección intratumoral incluye la inyección directa en la piel superficial, tumores subcutáneos o ganglionares e inyección guiada por imágenes (incluyendo TC, MRI o ultrasonido) en depósitos más profundos o más difíciles de localizar, incluyendo en órganos viscerales y en otros lugares. El virus puede administrarse en una cavidad corporal, por ejemplo en la cavidad pleural, la vejiga o por administración intraperitoneal. El virus puede inyectarse en un vaso sanguíneo, preferentemente un vaso sanguíneo que irriga un tumor.

Los agentes terapéuticos que pueden combinarse con un virus de la invención pueden administrarse a un sujeto humano o animal *in vivo* usando una diversidad de vías y técnicas conocidas. Por ejemplo, la composición puede proporcionarse como una solución, suspensión o emulsión inyectables y se administra a través de inyección parenteral, subcutánea, oral, epidérmica, intradérmica, intramuscular, interarterial, intraperitoneal, intravenosa usando una aguja y jeringuilla convencionales, o usando un sistema de inyección de chorro de líquido. La composición puede administrarse por vía tópica a la piel o al tejido de las mucosas, tal como por vía oral, por vía intratraqueal, por vía intestinal, por vía sublingual, por vía rectal o por vía vaginal, o se proporciona como un pulverizador finamente dividido adecuado para administración respiratoria o pulmonar. En realizaciones preferidas, las composiciones se administran por infusión intravenosa, por vía oral o directamente en un tumor.

El virus y/o el agente terapéutico pueden administrarse a un sujeto en una cantidad que sea compatible con la composición de dosificación que será terapéuticamente eficaz. La administración del virus de la invención es para un fin "terapéutico". Como se usa en el presente documento, el término "terapéutico" o "tratamiento" incluye uno o más de los siguientes como su objeto: la prevención de cualquier metástasis o metástasis adicional que se produzca; la reducción o eliminación de síntomas; la reducción o eliminación completa de un tumor o cáncer, un aumento en el tiempo hasta la progresión del cáncer del paciente; un aumento del tiempo de recaída después del tratamiento; o un aumento en el tiempo de supervivencia.

Puede administrarse tratamiento terapéutico a cánceres de Estadio I, II, III o IV, preferentemente de Estadio II, III o IV, más preferentemente de Estadio III o IV, intervención pre- o posquirúrgica (es decir, después de la reaparición o la extirpación incompleta de tumores después de la cirugía), preferentemente antes de cualquier intervención quirúrgica (ya sea para la resección de una enfermedad primaria o recurrente/metastásica), o después de una recurrencia después de una cirugía o después de una extirpación quirúrgica incompleta de la enfermedad, es decir, mientras permanece el tumor residual.

El tratamiento terapéutico puede llevarse a cabo después de la inyección directa de la composición del virus en el tejido diana que puede ser el tumor, en una cavidad corporal o un vaso sanguíneo. Como guía, la cantidad de virus administrada está en el caso del VHS en el intervalo de 10^4 a 10^{10} ufp, preferentemente de 10^5 a 10^9 ufp. En el caso del VHS, una dosis inicial más baja (por ejemplo, 10^4 a 10^7 ufp) puede darse a pacientes para seroconvertir pacientes que son seronegativos para el VHS y reforzar la inmunidad en aquellos que son seropositivos, seguido de una dosis más alta que se administrará en lo sucesivo (por ejemplo, 10^6 a 10^9 ufp). Normalmente pueden usarse hasta 20 ml de una composición farmacéutica que consiste esencialmente en el virus y un vehículo o diluyente adecuado farmacéuticamente aceptable para inyección directa en tumores o hasta 50 ml para administración en una cavidad corporal (que puede estar sujeta a dilución adicional en un diluyente apropiado antes de la administración) o en el torrente sanguíneo. Sin embargo, para algunas aplicaciones de terapia oncolítica también pueden usarse volúmenes mayores o menores, dependiendo del tumor y de la vía y lugar de administración.

Las vías de administración y las dosis descritas están destinadas únicamente a ser una guía, ya que un médico experto será capaz de determinar fácilmente la vía de administración y la dosificación óptimas. La dosificación puede determinarse de acuerdo con diversos parámetros, especialmente de acuerdo con la ubicación del tumor, el tamaño del tumor, la edad, el peso y la condición del paciente a tratar y la vía de administración. Preferentemente el virus se administra mediante inyección directa en el tumor o en una cavidad corporal. El virus también puede administrarse mediante inyección en un vaso sanguíneo. La vía de administración óptima dependerá de la ubicación y el tamaño del tumor. Pueden ser necesarias múltiples dosis para lograr un efecto inmunológico o clínico, que, si se requiere, se administrará normalmente entre 2 días y 12 semanas de diferencia, preferentemente con 3 días a 3 semanas de diferencia. Pueden administrarse dosis repetidas hasta 5 años o más, preferentemente de hasta un mes a dos años dependiendo de la velocidad de respuesta del tipo de tumor que se está tratando y la respuesta de un paciente particular, y cualquier terapia de combinación que también pueda estar dándose.

Los siguientes Ejemplos ilustran la invención.

Ejemplo 1. Construcción de un virus de la invención

El virus usado para ejemplificar la invención es VHS1. La cepa de VHS1 usada para la ejemplificación se identifica a través de la comparación de más de 20 aislados clínicos primarios de VHS1 por su capacidad para matar un panel de líneas celulares derivadas de tumores humanos y la elección de la cepa del virus con la mayor capacidad para matar una amplia gama de estos rápidamente y a dosis bajas. Las líneas de células tumorales usadas para esta comparación incluyen U87MG (glioma), HT29 (colorrectal), LNCaP (próstata), MDA-MB-231 (mama), SK-MEL-28 (melanoma), Fadu (carcinoma de células escamosas), MCF7 (mama), A549 (pulmón), MIAPACA-2 (páncreas), CAPAN-1 (páncreas), y/o HT1080 (fibrosarcoma). Específicamente, cada aislado clínico primario de VHS se titula en cada una de las líneas celulares usadas para el cribado a MOI tales como 1, 0,1, 0,01 y 0,001 y se evalúa el grado de muerte celular en puntos de tiempo tales 24 y 48 horas en cada dosis. El grado de muerte celular puede evaluarse, por ejemplo, mediante evaluación microscópica de la proporción de células supervivientes en cada punto de tiempo, o, por ejemplo, un ensayo metabólico tal como un ensayo MTT.

El virus ejemplar de la invención se construye después por delección de ICP47 del genoma vírico usando recombinación homóloga con un plásmido que contiene regiones que flanquean los nucleótidos 145300 a 145582 de VHS1 (siendo los nucleótidos 145300 a 145582 de VHS1 las secuencias a eliminar; archivo de Genbank de secuencia de cepa 17 de VHS1 NC_001806.2) entre los que se codifican GFP. Se seleccionan las placas de virus que expresan GFP y después se retira la GFP mediante recombinación homóloga con las regiones flanqueantes vacías y se seleccionan las placas que no expresan GFP. Esto da como resultado un virus con ICP47 eliminado en el que US11 se expresa como una proteína IE ya que ahora está bajo el control del promotor ICP47. Después se elimina ICP34.5 usando recombinación homóloga con un plásmido que contiene regiones que flanquean los nucleótidos 124953 a 125727 de VHS1 (siendo los nucleótidos 124953 a 125727 de VHS1 las secuencias a eliminar; archivo de Genbank de secuencia de cepa 17 de VHS1 NC_001806.2) entre los que se codifica GFP. Las placas de virus que expresan GFP se seleccionan de nuevo y después se retira GFP por recombinación homóloga con las mismas regiones flanqueantes pero entre las cuales se encuentra ahora un casete de expresión que comprende una versión de codones optimizados de la secuencia de GM-CSF de ratón, una versión de codones optimizados de la secuencia de GALV R- y una versión de codones optimizados de CD40L multimérica de ratón soluble impulsada por un CMV, un RSV y un promotor de SV40. Se seleccionan placas que no expresan GFP.

La estructura del virus resultante se muestra en la Figura 1. Las secuencias de mGM-CSF, CD40L y GALV-R- se muestran en SEQ ID NO 2, 14 y 8 respectivamente. La estructura del virus resultante se confirma mediante restricción, digestión y análisis por transferencia de Southern, la expresión de GM-CSF y CD40L se confirma mediante ELISA y la expresión de GALV-R- se confirma mediante infección de células tumorales HT1080 humanas y la observación de placas sinciales.

Los virus también se construyen usando procedimientos similares que solo han insertado el gen para GALVR- o GM-CSF y GALV-R- de ratón pero sin CD40L. Las estructuras de estos virus también se muestran en la Figura 1.

Para uso humano, se usa hGM-CSF y CD40L, cuya secuencia para versiones optimizadas de codones se muestran en las SEQ ID NO 4 y 13.

Ejemplo 2. El efecto de la expresión combinada de GM-CSF y una molécula activadora de la vía inmunitaria coesimuladora de un virus oncolítico en modelos de tumores de ratón

La proteína GALV R- provoca la fusión de célula a célula en células humanas pero no en células de ratón porque el receptor PiT-1 requerido para que se produzca la fusión celular tiene una secuencia en ratones que no permite que se produzca la fusión celular. Como resultado, las células tumorales de ratón que expresan PiT-1 humana se preparan primero usando métodos convencionales en la técnica. El PiT-1 humano se clona en un vector lentivírico que también comprende un gen marcador seleccionable. El vector se transfecta en células tumorales de cáncer colorrectal de ratón CT26 diana y se seleccionan clones resistentes al marcador seleccionable para generar células CT26/PiT-1. La expresión de PiT-1 se confirma mediante transferencia Western en células no transfectadas y en células transfectadas con lentivirus que expresan PiT-1 y mediante transfección de un plásmido que expresa GALV-R- y confirmación de que se produce la fusión celular.

La utilidad del virus se demuestra administrando células CT26/PiT-1 en ambos flancos de ratones Balb/c y permitiendo que los tumores CT26/PiT-1 crezcan hasta aproximadamente 0,5 cm de diámetro.

Después se administran los siguientes tratamientos a grupos de ratones (cinco por grupo), en un flanco de cada ratón solo 3 veces por semana durante dos semanas:

- 50 µl de solución salina (1 grupo);
- 50 µl de 10^5 ufp/ml, 10^6 ufp/ml o 10^7 ufp/ml del VHS con solo GALVR- insertado (3 grupos);
- 50 µl de 10^5 ufp/ml, 10^6 ufp/ml o 10^7 ufp/ml del VHS con solo GALVR- y GM-CSF de ratón insertado (3 grupos);
- 50 µl de 10^5 ufp/ml, 10^6 ufp/ml o 10^7 ufp/ml del virus con GALVR- y ambos GM-CSF y CD40L de ratón insertados (3 grupos).

Después se observan los efectos sobre el crecimiento del tumor durante hasta un mes. Se observa un control y reducción de tumores superior en tumores inyectados y no inyectados con el virus que expresa GM-CSF y CD40L en comparación con los otros grupos, incluyendo a través de una curva de respuesta a la dosis mejorada.

5 **Ejemplo 3. El efecto de la expresión combinada de GM-CSF y una molécula activadora de la vía inmunitaria coestimuladora de un virus oncolítico sobre el efecto terapéutico del bloqueo de puntos de control inmunológico en modelos de tumores de ratón**

10 Se repite el experimento del Ejemplo 2 anterior pero a los ratones se les dosifica adicionalmente cada dos semanas por vía intraperitoneal con un anticuerpo dirigido a PD-1 de ratón (10 mg/kg; Bioxcell RMP-1-14 en los mismos días que la dosificación del virus) o un anticuerpo dirigido a CTLA-4 de ratón (10 mg/kg; Bioxcell 9H10 los mismos días que la dosificación del virus). Se añade un grupo adicional de ratones que no reciben tratamiento con anticuerpos. Más específicamente, los grupos de ratones reciben (1) solución salina, (2) VHS con GALV-R insertado como en el Ejemplo 2, (3) VHS con GM-CSF y GALV-R insertados como en el Ejemplo 2, (4) VHS con GM-CSF, CD40L y GALV-R insertados como en el Ejemplo 2. (5) anticuerpo PD-1, (6) anticuerpo CTLA-4, (7) VHS con GALV-R insertado más anticuerpo PD-1, (8) VHS con gen GALV-R insertado más anticuerpo CTLA-4, (9) VHS con anticuerpos GM-CSF y GALV-R y PD-1 o (10) VHS con GM-CSF y GALV-R y anticuerpo CTLA-4 (11) VHS con GM-CSF, CD40L y GALV-R y anticuerpo PD-1 o (12) VHS con GM-CSF, CD40L y GALV-R y anticuerpo CTLA-4. Se observa un control y encogimiento superior del tumor en tumores inyectados y no inyectados con el virus que expresa GM-CSF y CD40L junto con el anticuerpo anti-PD-1 o el anticuerpo anti-CTLA-4 en comparación con los otros grupos, incluyendo a través de una curva de respuesta a la dosis mejorada.

25 **Ejemplo 4. Colección de aislados clínicos**

La especie de virus usada para ejemplificar la invención es VHS, específicamente VHS1. Para ejemplificar la invención, se reclutaron 181 voluntarios que padecían herpes labial recurrente. Estos voluntarios recibieron kits de recolección de muestras (incluyendo tubos de recolección Sigma Virovult) y los usaron para recoger hisopos del herpes labial cuando aparecieron después de lo cual estas muestras se enviaron a Replimune, Oxford RU. De junio de 2015 a febrero de 2016, se recibieron hisopos de 72 voluntarios. Se usó una muestra de cada hisopo para infectar células BHK. De éstas, 36 muestras de virus vivos se recuperaron después de la siembra en placa y el crecimiento en células BHK. Estas muestras se detallan en la Tabla 1.

Tabla 1: Detalles de las muestras de hisopos probados y resultado

Número de muestra	Virus recuperado
RH001A	No
RH001B	
RH002A	Sí
RH003A	No
RH004A	Sí
RH004B	
RH005A	No
RH005B	
RH006A	No
RH006B	
RH007A	Sí
RH007B	
RH007C	
RH008A	No
RH008B	
RH008C	
RH009A	No
RH009B	
RH010A	No
RH011A	No
RH011B	
RH011C	
RH012A	No
RH013A	No
RH014A	Sí
RH014B	
RH015A	Sí
RH016A	No
RH016B	
RH017A	Sí

(continuación)

Número de muestra	Virus recuperado
RH018A RH018B RH018C	Sí
RH019A RH019B RH019C	No
RH020A RH020B RH020C	Sí-solo RH020A
RH021A RH021B	Sí
RH022A RH022B	Sí
RH023A	Sí
RH024A	No
RH025A RH025B	Sí-solo RH025B
RH026A	Sí
RH027A RH027B RH027C	No
RH028A RH028B RH028C	No
RH029A	No
RH030A	No
RH031A RH031B RH031 C RH031D RH031E RH031F	Sí - RH031A a RH031D
RH032A	No
RH033A RH033B RH033C	No
RH034A RH034B RH034C	No
RH035A	No
RH036A	Sí
RH037A	Sí
RH038A	Sí
RH039A RH039B RH039C	No
RH040A RH040B RH040C	Sí
RH041A	Sí
RH042A	Sí
RH043A RH043B RH043C	No
RH044A	No
RH045A	No
RH046A	Sí
RH047A RH047B RH047C	Sí - RH047A y RH047C
RH048A	No

(continuación)

Número de muestra	Virus recuperado
RH049A RH049B RH049C	No
RH050A	No
RH051A RH051B	Sí
RH052A RH052B	Sí - solo RH052A
RH053A	No
RH054A	No
RH055A RH055B	No
RH056A	Sí
RH057A	No
RH058A RH058B	Sí
RH059A	No
RH060A	No
RH061A	Sí
RH062A	No
RH063A	No
RH064A	Sí
RH065A RH065B	Sí
RH066A	No
RH067A RH067B	No
RH068A	No - contaminado
RH069A RH069A	No
RH070A	Sí
RH071A	Sí
RH072A	No
RH073A RH073B	Sí
RH074A RH074B	No
RH075A	No
RH076A	No
RH078A RH078B	No
RH079B RH079B	Sí
RH080A	No
RH081A	Sí
RH082A RH082B	No
RH083A RH083B	Sí
RH084A RH084B RH084C	Sí
RH085A	No
RH086A	No
RH087A RH087B	Sí - solo RH078B
Las designaciones A, B, C, etc. indican múltiples hisopos del mismo voluntario.	

Ejemplo 5. Identificación de aislamientos clínicos con efectos antitumorales mejorados

Se probó la capacidad de los aislados clínicos primarios de VHS1 para destruir un panel de líneas celulares

derivadas de tumores humanos. Las líneas de células tumorales utilizadas para esta comparación fueron HT29 (colorrectal), MDA-MB-231 (mama), SK-MEL-28 (melanoma), Fadu (carcinoma de células escamosas), MCF7 (mama), A549 (pulmón), MIA-PACA-2 (páncreas) y HT1080 (fibrosarcoma). Las líneas celulares se usaron para probar el nivel de CPE alcanzado en un intervalo de MOI y tiempos posteriores a la infección para cada uno de los aislados clínicos primarios.

Los experimentos se realizaron en paralelo usando 5 a 8 de las nuevas cepas de virus al mismo tiempo. Las cepas de virus se colocaron en placas por duplicado en un intervalo de MOI (0,001-1) y se evaluó el grado de CPE después de la tinción con violeta cristal a las 24 y 48 horas después de la infección. Se puntuaron las cepas víricas que fueron más eficaces matando las líneas de células tumorales y las dos o tres cepas más eficaces de cada cribado de 5-8 cepas se identificaron y se compararon en paralelo en un experimento adicional para identificar las cepas superiores para un desarrollo adicional.

Los exámenes iniciales demostraron una variabilidad sustancial en la capacidad de las diferentes cepas para destruir las diferentes líneas de células tumorales. De unas 29 cepas probadas inicialmente, Se identificaron 8 cepas de interés en las pantallas iniciales para una comparación adicional. Estas fueron las cepas RH004A, RH015A, RH018A, RH021A, RH023A, RH31A, RH040A y RH047A.

Las 8 cepas para comparación adicional se probaron en paralelo en el panel de líneas de células tumorales, y se evaluó su capacidad relativa para destruir estas líneas de células tumorales después de la tinción con violeta cristal y la observación de CPE. La Figura 2 muestra un punto de tiempo representativo y una MOI para estos virus en cada uno de los virus en cada una de las líneas celulares que demuestran la capacidad diferencial de los virus para destruir las líneas celulares tumorales diana observadas.

Hubo una variación sustancial entre las cepas y se encontró que, aunque una cepa en particular puede ser particularmente eficaz para matar una línea celular, no necesariamente es particularmente eficaz en matar otras líneas celulares también, demostrando además el grado de variabilidad en la capacidad de las cepas clínicas de VHS para matar células tumorales de diferentes tipos.

La Figura 3 también indica cuál de las cepas de virus fue la mejor y la segunda mejor para matar cada una de las líneas celulares, permitiendo que las cepas de virus estén ordenadas por rango en cuanto a su capacidad relativa general para matar el panel de líneas celulares en su conjunto. Este análisis demostró que las cepas RH004A, RH015A, RH018A, RH031A y RH040A fueron relativamente más eficaces que las otras cepas y estas cinco cepas se eligieron para un posible desarrollo posterior como agentes oncolíticos. De estas cinco cepas principales, el orden de rango relativo basado en sus capacidades para matar a través del panel de líneas celulares fue RH018A > RH004A > RH031A > RH040A > RH015A.

Más específicamente, en estos experimentos, las líneas de células tumorales se usaron para sembrar placas de cultivo de tejidos de múltiples pocillos de modo que fueran aproximadamente un 80 % confluentes el día de la infección. Se tripsinizaron pocillos representativos de cada línea de células tumorales y se determinó el número de células en el pocillo. Estos recuentos de células se usan para determinar el volumen de cada aislamiento clínico necesario para dar una MOI de 1, 0,1, 0,01 y 0,001. Se infectaron pocillos separados de una línea de células tumorales con el aislamiento clínico a estas MOI. Todas las infecciones se realizan por cuadruplicado. Los pocillos duplicados se incubaron durante 24 horas y los pocillos duplicados se incubaron durante 48 horas, ambos a 37 °C, 5 % de CO₂, antes de la fijación de las células con glutaraldehído y tinción con violeta cristal. El nivel de lisis celular se evaluó después mediante observación general, microscopía (recuento de células) y fotografía.

La cepa RH018A, la cepa clasificada en primer lugar de todas las cepas probadas se comparó con una cepa "promedio" del cribado (es decir, una cepa que no estaba entre las 8 primeras, pero tampoco estaba en el grupo de cepas que fueron menos eficaces y destruyeron el panel de líneas de células tumorales). Esta comparación mostró que la Cepa RH018A era aproximadamente 10 veces más eficaz que esta cepa promedio (Cepa RH065A) para matar las líneas de células tumorales (es decir, se necesitaba aproximadamente 10 veces menos de la Cepa RH018A para matar una proporción igual de células que la Cepa RH065A). Esto se muestra en la Figura 3.

Ejemplo 6. Modificación de aislados clínicos

En este Ejemplo los aislados clínicos seleccionados en el Ejemplo 5 se modificaron por delección de ICP34.5 del genoma vírico usando recombinación homóloga con un plásmido que contenía regiones que flanqueaban el gen que codifica ICP34.5 (nucleótidos 143680-145300 y 145.582-147.083; archivo Genbank de secuencia de cepa 17 de VHS1 [NC_001806.2](#)) entre los que se codifican GFP y la glucoproteína fusogénica GALV-R-. La estructura de este virus, (Virus 10) se muestra en la Figura 4.

También se construyeron virus adicionales basados en la Cepa RH018A en los que tanto ICP34.5 como ICP47 (usando regiones flanqueantes que contienen los nucleótidos 123464-124953 y 125727-126781; archivo Genbank de secuencia de cepa 17 de VHS1 [NC_001806.2](#)) se eliminaron (dando como resultado la colocación de US 11 bajo el control del promotor ICP47). Para construir estos virus, primero se seleccionaron placas de virus que expresan

GFP, expresado GFP en lugar de ICP47. Después se retiró la GFP mediante recombinación homóloga con las regiones flanqueantes vacías y se seleccionaron las placas que no expresaban GFP. Esto dio como resultado un virus con ICP47 eliminado en el que US11 se expresa como una proteína IE ya que ahora está bajo el control del promotor ICP47. Después se eliminó ICP34.5 usando recombinación homóloga con un plásmido que contiene regiones que flanquean los nucleótidos 143680-145300 y 145.582-147.083 de VHS1; archivo de Genbank de secuencia de cepa 17 de VHS1 NC_001806.2) entre los que se codifica GFP. Se seleccionaron de nuevo las placas de virus que expresaban GFP y después se retiró la GFP mediante recombinación homóloga con las mismas regiones flanqueantes pero entre las cuales se encuentra ahora un casete de expresión que comprende los genes a insertar. Los virus que se construyeron se muestran en las Figuras 1, 4 y 5. Estos incluyeron una versión optimizada de codones de la secuencia de GM-CSF de ratón y una versión optimizada de codones de la secuencia R de GALV impulsada por el promotor CMV IE y el promotor RSV respectivamente, en una orientación espalda con espalda y seleccionando de nuevo placas de virus que no expresan GFP. Esta construcción de virus se realizó usando métodos que son convencionales en la técnica.

Las secuencias de mGM-CSF y GALV-R- se muestran en SEQ ID NO 2 y 8 respectivamente. La estructura del virus resultante se confirmó mediante PCR, la expresión de GM-CSF se confirmó mediante ELISA y la expresión de GALV-R- se confirmó mediante infección de células tumorales HT1080 humanas y la observación de placas sinciales.

Para uso humano, se usa hGM-CSF, cuya secuencia para una versión optimizada de codones se muestra en SEQ ID NO 4. La estructura de este virus se muestra en la Figura 4. La expresión de GM-CSF de ratón o humano a partir de los virus 16, 17 y 19 se muestra en la Figura 6.

Ejemplo 7. Un virus modificado para su uso oncolítico y que expresa una glucoproteína fusogénica muestra una mayor destrucción de células tumorales *in vitro* en comparación con un virus que no expresa una glucoproteína fusogénica (como referencia)

El Virus 10 (véase la Figura 4), basado en la cepa clínica RH018A en la que se elimina ICP34.5 y que expresa GALV-R- y GFP, se comparó *in vitro* con un virus que expresa solo GFP (Virus 12). El Virus 10 mostró una mayor destrucción en un panel de líneas de células tumorales humanas en comparación con el Virus 12, como se muestra en la Figura 7.

Ejemplo 8. Un virus modificado para uso oncolítico y que expresa una glucoproteína fusogénica y GM-CSF muestra una mayor destrucción de células tumorales en comparación con un virus modificado que expresa solo GM-CSF (como referencia)

El Virus 17 (véase la Figura 4), basado en la Cepa clínica RH018A en la que se eliminan ICP34.5 e ICP47 y que expresa GALV-R- y GM-CSF, se comparó *in vitro* con un virus conocido en que también se eliminó ICP34.5 e ICP47 pero que no derivó de una cepa descrita en el Ejemplo 4 y que expresa solo GM-CSF. El Virus 17 mostró una mayor destrucción en un panel de líneas de células tumorales humanas en comparación con el virus anterior, como se muestra en la Figura 8.

Ejemplo 9. Un virus modificado para uso oncolítico y que expresa una glucoproteína fusogénica y GM-CSF trata eficazmente los tumores de ratón *in vivo* (como referencia)

El Virus 16 se probó en ratones que albergaban tumores de linfoma A20 en los flancos izquierdo y derecho. Primero se implantó un millón de células tumorales en ambos flancos de ratones Balb/c y se dejó que los tumores crecieran hasta 0,5-0,7 cm de diámetro. Después se inyectaron los tumores del flanco derecho 3 veces (días alternos) con vehículo (10 ratones) o 5x10⁶ ufp del Virus 16 (10 ratones) y se observaron los efectos sobre el tamaño del tumor durante 30 días más. Esto demostró que tanto los tumores inyectados como los no inyectados se trataron eficazmente con el Virus 16 (véase la Figura 9).

Ejemplo 10. El efecto de la expresión combinada de una proteína fusogénica y una molécula inmunoestimulante de un virus oncolítico en un modelo de tumor de rata (como referencia)

La proteína GALV R- provoca la fusión de célula a célula en células humanas pero no en células de ratón. Sin embargo, GALV R- provoca fusión en células de rata.

La utilidad del virus se demostró adicionalmente administrando células 9L en los flancos de ratas Fischer 344 y permitiendo que los tumores 9L crecieran hasta aproximadamente 0,5 cm de diámetro.

Los siguientes tratamientos se administraron después a grupos de ratas (diez por grupo), en un solo flanco de cada rata tres veces por semana durante tres semanas:

- 50 µl de vehículo;
- 50 µl de 10⁷ ufp/ml de Virus 19 (expresa mGM-CSF pero no GALV R-);

- 50 µl de 10^7 ufp/ml de Virus 16 (expresa tanto GM-CSF de ratón como GALV-R-).

A continuación, se observaron los efectos sobre el crecimiento tumoral durante ≈30 días más. Esto demostró un control y una reducción del tumor superior con el virus que expresa GALV-R- en tumores tanto inyectados como no inyectados, demostrando efectos sistémicos mejorados. Esto se muestra en la Figura 15. La Figura 10 muestra que el virus que expresa GALV (Virus 15) también muestra una mayor destrucción de células 91 de rata *in vitro* en comparación con un virus que no expresa GALV (Virus 24).

Ejemplo 11. Un virus modificado para uso oncolítico y que expresa una glucoproteína fusogénica y GM-CSF es sinérgico con el bloqueo de puntos de control inmunológico en modelos de tumores de ratón (como referencia)

El Virus 16 se probó en ratones que albergaban tumores CT26 en los flancos izquierdo y derecho. Primero se implantó un millón de células tumorales en ambos flancos de ratones Balb/c y se dejó que los tumores crecieran hasta 0,5-0,6 cm de diámetro.

Después se trataron grupos de 10 ratones con:

- Vehículo (3 inyecciones en los tumores del flanco derecho cada dos días);
- 5×10^6 ufp de Virus 16 inyectados en el tumor del flanco derecho cada dos días;
- anti-PDI de ratón solo (10 mg/kg i.p. cada tres días, clon RMP1-14 de BioXCell);
- anti-CTLA-4 de ratón (3 mg/kg i.p. cada tres días, clon 9D9 de BioXCell);
- anti-PDI de ratón junto con el Virus 16;
- anti-CTLA4 de ratón junto con el Virus 16;
- 1-metil tripotófano (inhibidor de IDO (5 mg/ml en agua para beber));
- anti-PD1 de ratón junto con 1-metil tripotófano;
- anti-PD1 de ratón junto con 1-metil tripotófano y Virus 16;

Se observaron los efectos sobre el tamaño del tumor durante 30 días más. Se demostró una mayor reducción del tumor en animales tratados con combinaciones de virus y bloqueo de puntos de control que en animales tratados con los grupos de tratamiento únicos (véase la Figura 11). También se demostró una reducción mejorada del tumor con el Virus 16 junto con la inhibición tanto de anti-PDI como de IDO en comparación con el Virus 16 junto con solo anti-PDI (véase la Figura 11).

También se observó una actividad mejorada del Virus 16 en combinación con el bloqueo del punto de control inmunológico en los tumores A20 (Figura 12).

Ejemplo 12. El efecto de la expresión de una proteína fusogénica de un virus oncolítico en modelos de xenoinjerto humano en ratones inmunodeficientes (como referencia)

La proteína GALV R- provoca la fusión de célula a célula en células humanas pero no en células de ratón. Sin embargo, pueden usarse tumores de xenoinjerto humano desarrollados en ratones inmunodeficientes para evaluar los efectos de la expresión de GALV sobre la eficacia antitumoral.

La utilidad del virus por lo tanto se demostró adicionalmente mediante la administración de células de cáncer de pulmón humano A549 en los flancos de ratones desnudos y permitiendo que los tumores crecieran hasta aproximadamente 0,5 cm de diámetro.

Los siguientes tratamientos se administraron después a grupos de ratones (diez por grupo), en el flanco que contiene el tumor de cada ratón tres veces durante una semana:

- 50 µl de vehículo;
- 50 µl de 10^7 ufp/ml de Virus 16 (expresa tanto GM-CSF de ratón como GALV-R-);
- 50 µl de 10^6 ufp/ml de Virus 16;
- 50 µl de 10^5 ufp/ml de Virus 16;
- 50 µl de 10^7 ufp/ml de Virus 19 (expresa solo GM-CSF de ratón);
- 50 µl de 10^6 ufp/ml de Virus 19;
- 50 µl de 10^5 ufp/ml de Virus 19.

A continuación, se observaron los efectos sobre el crecimiento tumoral durante ≈30 días más. Este experimento demostró un control y una contracción superiores del tumor con el virus que expresa GALV-R- en ambos modelos tumorales (véase la Figura 14).

Ejemplo 13. Expresión de dos moléculas inmunoestimulantes de un virus que expresa una proteína fusogénica

Se construyeron virus similares a los virus que expresan GALV-R- y mGM-CSF descritos anteriormente (Virus 16), pero expresan adicionalmente versiones de ratón de CD40L (virus 32), ICOSL (virus 36), OX40L (virus 35), 4-1BBL (virus 33) y GITRL (virus 34). Aquí, en lugar de usar un plásmido que contiene regiones flanqueantes de ICP34.5 y un casete de expresión que comprende GM-CSF y GALV-R, impulsado por un promotor de CMV y uno RSV, un plásmido que contiene regiones flanqueantes de ICP34.5 y un casete de expresión que comprende GM-CSF, GALV y las proteínas adicionales impulsadas por un promotor de CMV, uno de RSV y uno de MMLV respectivamente se utilizaron para la recombinación con un virus que contiene GM-CSF, GALV y GFP insertados en ICP34.5. Se seleccionaron de nuevo las placas que no expresaban GFP. La inserción correcta se confirmó mediante PCR y la expresión mediante transferencia Western y/o ELISA para el gen insertado adicional. Los virus se muestran en la Figura 5. De manera similar, también se construyeron virus que expresan CTLA-4 anti-ratón y anti-humano además de GALV y mGM-CSF (Virus 27 y 31 en la Figura 5 y véase también la Figura 13). Los efectos de los virus que expresan anti-CTLA-4 de ratón (virus 27), mCD40L (virus 32), m4-1BBL (virus 33) o mOX40L (virus 35) además de mGM-CSF y GALV- *in vivo* se muestra en la Figura 16 que mostró una actividad mejorada en tumores A20 en comparación con el virus 16 (expresa mGM-CSF y GALV-R). En estos experimentos, se indujeron tumores en ambos flancos de los ratones y se inyectó virus o vehículo solo en el tumor del flanco derecho. La dosis de virus utilizada fue de 5×10^4 ufp (50 ul de 1×10^6 ufp/ml en cada caso), administrado tres veces durante una semana. Este nivel de dosis de virus es subterapéutico para tumores no inyectados para el virus 16, lo que permite ver claramente los beneficios de la administración de moléculas adicionales codificadas por los virus 27, 32, 33 y 35.

Información de depósito

Las siguientes cepas de VHS1 se depositaron en la ECACC, Culture Collections, Public Health England, Porton Down, Salisbury, SP4 0JG, Reino Unido el 19 de diciembre de 2016 por Replimune Limited y se les asignaron los números de registro indicados:

RH004A - Número de registro 16121902
 RH015A - Número de registro 16121903
 RH018A - Número de registro 16121904
 RH021A - Número de registro 16121905
 RH023A - Número de registro 16121906
 RH031A - Número de registro 16121907
 RH040B - Número de registro 16121908
 RH047A - Número de registro 16121909.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Replimune Limited

<120> VIRUS MODIFICADO GENÉTICAMENTE

<130> N406716WO

<150> GB1600380.8

<151> 08-01-2016

<150> GB1600381.6

<151> 08-01-2016

<150> GB1600382.4

<151> 08-01-2016

<160> 45

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 426

<212> ADN

<213> *Mus musculus*

<400> 1

ES 2 841 300 T5

	atgtggctgc agaatttact ttctctgggc attgtggtct acagcctctc agcaccacc	60
	cgctcaccca tcaactgtcac ccggccttgg aagcatgtag aggccatcaa agaagccctg	120
	aacctcctgg atgacatgcc tgtcacattg aatgaagagg tagaagtcgt ctctaacgag	180
	ttctccttca agaagctaac atgtgtgcag acccgctga agatattcga gcagggtcta	240
	cggggcaatt tcaccaaact caagggcgcc ttgaacatga cagccagcta ctaccagaca	300
	tactgcccc caactccgga aacggactgt gaaacacaag ttaccaccta tgcggatttc	360
	atagacagcc ttaaaacctt tctgactgat atcccccttg aatgcaaaaa accagtccaa	420
	aaatga	426
5	<210> 2 <211> 426 <212> ADN <213> <i>Mus musculus</i>	
	<400> 2	
	atgtggctcc agaacctcct ctctctcggt atcgtcgtgt attcactctc cgcacctact	60
	cgctcaccta tcaactgtcac cagaccctgg aagcacgtgg aggccatcaa ggaggctctg	120
	aacctgctgg acgatatgcc agtgacctg aacgaggagg tggagggtgt gagcaacgag	180
	ttctccttta agaagctgac ctgctgtcag acaaggctga agatcttcga gcagggcctg	240
	agaggaaact ttaccaagct gaagggcgcc ctgaacatga ccgcttctta ctaccagaca	300
	tactgcccc ctacccccga gacagactgt gagacacagg tgaccacata cgcggacttc	360
	attgatagcc tgaaaacatt cctgaccgac attccatttg agtgaagaa gcccgtccag	420
10	aagtaa	426
15	<210> 3 <211> 435 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 3	
	atgtggctgc agagcctgct gctcttgggc actgtggcct gcagcatctc tgcaccggcc	60
	cgctcgccca gcccagcac gcagccctgg gagcatgtga atgccatcca ggaggcccg	120
	cgtctcctga acctgagtag agacactgct gctgagatga atgaaacagt agaagtcac	180
	tcagaaatgt ttgacctcca ggagccgacc tgcctacaga cccgcctgga gctgtacaag	240
	cagggcctgc ggggcagcct caccaagctc aagggcccct tgaccatgat ggccagccac	300
	tacaagcagc actgccctcc aaccccgaa acttctctgt caaccagat tatcaccttt	360
	gaaagtttca aagagaacct gaaggacttt ctgcttgtca tcccctttga ctgctgggag	420
20	ccagtccagg agtga	435
25	<210> 4 <211> 435 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 4	

ES 2 841 300 T5

```

atgtggctgc agtccctgct gctgctgggc accgtgcct gttctatttc cgcacccgca      60
aggtcaccaa gtccatctac tcagccttgg gagcacgtga acgcaatcca ggaggcacgg      120
cggctgctga acctgagccg ggacaccgcc gccgagatga acgagacagt ggaagtgatc      180
agcgagatgt tcgatctgca ggagcccacc tgcctgcaga caaggctgga gctgtacaag      240
cagggcctgc gcggctctct gaccaagctg aagggccac tgacaatgat ggccagccac      300
tataagcagc actgcccccc taccgccgag acaagctgtg ccaccagat catcacattc      360
gagtccttta aggagaacct gaaggatttt ctgctggtca ttccatttga ttgttgggag      420
cccgtccagg agtaa                                          435

```

<210> 5
 <211> 141
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 5

```

Met Trp Leu Gln Asn Leu Leu Phe Leu Gly Ile Val Val Tyr Ser Leu
 1              5              10              15

Ser Ala Pro Thr Arg Ser Pro Ile Thr Val Thr Arg Pro Trp Lys His
          20              25              30

Val Glu Ala Ile Lys Glu Ala Leu Asn Leu Leu Asp Asp Met Pro Val
          35              40              45

Thr Leu Asn Glu Glu Val Glu Val Val Ser Asn Glu Phe Ser Phe Lys
 50              55              60

Lys Leu Thr Cys Val Gln Thr Arg Leu Lys Ile Phe Glu Gln Gly Leu
 65              70              75              80

Arg Gly Asn Phe Thr Lys Leu Lys Gly Ala Leu Asn Met Thr Ala Ser
          85              90              95

Tyr Tyr Gln Thr Tyr Cys Pro Pro Thr Pro Glu Thr Asp Cys Glu Thr
          100              105              110

Gln Val Thr Thr Tyr Ala Asp Phe Ile Asp Ser Leu Lys Thr Phe Leu
          115              120              125

Thr Asp Ile Pro Phe Glu Cys Lys Lys Pro Val Gln Lys
          130              135              140

```

<210> 6
 <211> 144
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 6

ES 2 841 300 T5

```

Met Trp Leu Gln Ser Leu Leu Leu Leu Gly Thr Val Ala Cys Ser Ile
1          5          10          15

Ser Ala Pro Ala Arg Ser Pro Ser Pro Ser Thr Gln Pro Trp Glu His
          20          25          30

Val Asn Ala Ile Gln Glu Ala Arg Arg Leu Leu Asn Leu Ser Arg Asp
          35          40          45

Thr Ala Ala Glu Met Asn Glu Thr Val Glu Val Ile Ser Glu Met Phe
          50          55          60

Asp Leu Gln Glu Pro Thr Cys Leu Gln Thr Arg Leu Glu Leu Tyr Lys
65          70          75          80

Gln Gly Leu Arg Gly Ser Leu Thr Lys Leu Lys Gly Pro Leu Thr Met
          85          90          95

Met Ala Ser His Tyr Lys Gln His Cys Pro Pro Thr Pro Glu Thr Ser
          100          105          110

Cys Ala Thr Gln Ile Ile Thr Phe Glu Ser Phe Lys Glu Asn Leu Lys
          115          120          125

Asp Phe Leu Leu Val Ile Pro Phe Asp Cys Trp Glu Pro Val Gln Glu
130          135          140

```

<210> 7
 <211> 2010
 <212> ADN
 <213> Virus de la leucemia del gibbon
 <400> 7

ES 2 841 300 T5

atggtattgc tgcctgggtc catgcttctc acctcaaacc tgcaccacct tcggcaccag	60
atgagtcctg ggagctggaa aagactgac atcctcttaa gctgcgtatt cggcggcggc	120
gggacgagtc tgcaaaataa gaacccccac cagcccatga ccctcacttg gcaggtagctg	180
tcccaaaactg gagacgttgt ctgggataca aaggcagtc agcccccttg gacttggttg	240
cccacactta aacctgatgt atgtgccttg gcggctagtc ttgagtcctg ggatatcccg	300
ggaaccgatg tctcgtcctc taaacgagtc agacctccg actcagacta tactgcgcct	360
tataagcaaa tcacctggg agccataggg tgcagctacc ctgggctag gactagaatg	420
gcaagctcta ccttctacgt atgtccccg gatggccgga ccctttcaga agctagaagg	480
tgcggggggc tagaatccct atactgtaa gaatgggatt gtgagaccac ggggaccggt	540
tattggctat ctaaactctc aaaagacctc ataactgtaa aatgggacca aaatagcgaa	600
tggactcaaa aatttcaaca gtgtcaccag accggctggt gtaacccctc taaaatagat	660
ttcacagaca aaggaaaatt atccaaggac tggataacgg gaaaaacctg gggattaaga	720
ttctatgtgt ctggacatcc aggcgtacag ttcaccattc gcttaaaaat caccaacatg	780
ccagctgtgg cagtaggtcc tgacctcgtc cttgtggaac aaggacctcc tagaacgtcc	840
ctcgtctccc cacctcctct tcccccaagg gaagcgccac cgccatctct ccccgactct	900
aactccacag ccctggcgac tagtgacaaa actcccacgg tgagaaaaac aattgttacc	960
ctaaacactc cgctcccccac cacaggcgac agactttttg atcttgtgca gggggccttc	1020
ctaaccttaa atgctaccaa cccagggggc actgagctct gctggctttg tttggccatg	1080
ggccccctt attatgaagc aatagcctca tcaggagagg tcgcctactc caccgacctt	1140
gaccggtgcc gctgggggac ccaaggaaag ctacacctca ctgaggtctc aggacacggg	1200
ttgtgcatag gaaagggtgc ctttaccat cagcatctct gcaatcagac cctatccatc	1260
aattcctccg gagaccatca gtatctgctc ccctccaacc atagctgggtg ggcttgccagc	1320
actggcctca ccccttgctc ctccacctca gtttttaatc agactagaga tttctgtatc	1380
caggctccagc tgattcctcg catctattac tctcctgaag aagttttgtt acaggcctat	1440
gacaattctc accccaggac taaaagagag gctgtctcac ttaccctagc tgttttactg	1500
gggttgaggaa tcacggcggg aataggtagt ggttcaactg ccttaattaa aggacctata	1560
gacctccagc aaggcctgac aagcctccag atcgccatag atgctgacct ccggggccctc	1620
caagactcag tcagcaagtt agaggactca ctgacttccc tgtccgaggt agtgcctcaa	1680
aataggagag gccttgactt gctgtttcta aaagaagggt gcctctgtgc ggccctaaag	1740
gaagagtgtc gtttttacat agaccactca ggtgcagtac gggactccat gaaaaaactc	1800
aaagaaaaac tggataaaag acagtttagag cgccagaaaa gccaaaactg gtatgaagga	1860
tggttcaata actcccttg gttcactacc ctgctatcaa ccatcgctgg gccctatta	1920
ctcctccttc tgttgctcat cctcgggcca tgcacatca ataagttagt tcaattcatc	1980
aatgatagga taagtgcagt taaaatttaa	2010

5 <210> 8
<211> 2013
<212> ADN

<213> Virus de la leucemia del gibón

<400> 8

accatggtcc	tgtgcctgg	gtctatgctg	ctgacttcta	acctgcacca	cctgcgacac	60
cagatgtctc	ccggctcatg	gaaacggctg	atcatcctgc	tgagctgctg	gttcggagga	120
ggaggcacct	ccctgcagaa	caagaatcct	caccagccaa	tgaccctgac	atggcagggtg	180
ctgtcccaga	caggcgacgt	ggtgtgggat	accaaggcag	tgacgccacc	ttggacatgg	240
tggccccacc	tgaagcctga	cgtgtgcgcc	ctggccgcct	ccctggagtc	ttgggacatc	300
cccggcacag	acgtgagcag	cagcaagagg	gtgagaccac	ccgactctga	ttatacagcc	360
gcctacaagc	agatcacctg	ggggcccatc	ggctgtagct	atcctcgggc	ccgcacaagg	420
atggccagct	ccacctttta	cgtgtgccc	cgcgacggaa	ggaccctgtc	tgaggcaagg	480
agatgtggcg	gcctggagag	cctgtattgc	aaggagtggg	attgtgagac	cacaggcaca	540
ggctactggc	tgtctaagtc	tagcaaggac	ctgatccacc	tgaagtggga	tcagaacagc	600
gagtggacac	agaagttcca	gcagtgccac	cagaccggct	ggtgtaatcc	cctgaagatc	660
gactttacag	ataagggcaa	gctgtccaag	gactggatca	ccggcaagac	atggggcctg	720
agattctacg	tgtctggcca	ccctggcgtg	cagtttaca	tccggctgaa	gatcaccaac	780
atgccagcag	tggcagtggg	accagacctg	gtgctggtgg	agcagggacc	tccacgcacc	840
tccctggccc	tgccccctcc	actgccccct	agggaggccc	caccccctag	cctgcccgat	900
tctaacagca	cagccctggc	cacctccgcc	cagaccctta	cagtgcgcaa	gaccatcgtg	960
acactgaata	ccccaccccc	taccacaggc	gacaggctgt	tcgatctggg	gcagggcgcc	1020
tttctgacac	tgaacgccac	caatcctggc	gcaaccgaga	gctgctggct	gtgcctggct	1080
atggggccac	cctactatga	ggcaatcgcc	tcctctggag	aggtggcata	ttccacagac	1140
ctggatagat	gcagatgggg	caccacaggg	aagctgaccc	tgacagaggt	gtctggccac	1200
ggcctgtgca	tcggcaaggt	gccattcaca	caccagcacc	tgtgcaacca	gaccctgagc	1260
atcaatagct	ccggcgacca	ccagtacctg	ctgccaaagca	accactcctg	gtgggcatgc	1320
tccacaggac	tgaccccatg	tctgagcacc	agcgtgttca	accagaccag	agacttttgt	1380
atccaggtgc	agctgatccc	tcggatctac	tattaccag	aggaggtgct	gctgcaggcc	1440
tatgataatt	cccacccaag	aacaaagagg	gaggccgtgt	ctctgaccct	ggccgtgctg	1500
ctgggactgg	gaatcacagc	aggaatcggc	acaggcagca	ccgccctgat	caagggacca	1560
atcgacctgc	agcagggact	gacctccctg	cagatcgcca	tcgacgccga	tctgagagcc	1620
ctgcaggaca	gcgtgtccaa	gctggaggat	tctctgacct	ctctgagcga	ggtggtgctg	1680
cagaacagga	ggggcctgga	cctgctgttc	ctgaaggagg	gaggactgtg	cgccgccctg	1740
aaggaggagt	gctgttttta	tatcgaccac	tctggcgccg	tgccggatag	catgaagaag	1800
ctgaaggaga	agctggataa	gcgccagctg	gagaggcaga	agagccagaa	ttggtacgag	1860
ggctggttca	acaattcccc	ctggtttacc	acactgctgt	ctaccatcgc	aggacctctg	1920
ttattactgc	tgtgtgtgct	gatcctgggc	ccatgtatca	tcaacaagct	ggtgcagttt	1980
atcaacgacc	gaatctccgc	agtgaataac	taa			2013

5

<210> 9

<211> 669

<212> PRT

5 <213> Virus de la leucemia del gibbon

<400> 9

Met Val Leu Leu Pro Gly Ser Met Leu Leu Thr Ser Asn Leu His His
1 5 10 15

Leu Arg His Gln Met Ser Pro Gly Ser Trp Lys Arg Leu Ile Ile Leu
20 25 30

Leu Ser Cys Val Phe Gly Gly Gly Gly Thr Ser Leu Gln Asn Lys Asn
35 40 45

Pro His Gln Pro Met Thr Leu Thr Trp Gln Val Leu Ser Gln Thr Gly
50 55 60

Asp Val Val Trp Asp Thr Lys Ala Val Gln Pro Pro Trp Thr Trp Trp
65 70 75 80

Pro Thr Leu Lys Pro Asp Val Cys Ala Leu Ala Ala Ser Leu Glu Ser
85 90 95

10

ES 2 841 300 T5

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

ES 2 841 300 T5

340					345					350					
Ser	Cys	Trp	Leu	Cys	Leu	Ala	Met	Gly	Pro	Pro	Tyr	Tyr	Glu	Ala	Ile
		355					360					365			
Ala	Ser	Ser	Gly	Glu	Val	Ala	Tyr	Ser	Thr	Asp	Leu	Asp	Arg	Cys	Arg
	370					375					380				
Trp	Gly	Thr	Gln	Gly	Lys	Leu	Thr	Leu	Thr	Glu	Val	Ser	Gly	His	Gly
385					390					395					400
Leu	Cys	Ile	Gly	Lys	Val	Pro	Phe	Thr	His	Gln	His	Leu	Cys	Asn	Gln
				405					410					415	
Thr	Leu	Ser	Ile	Asn	Ser	Ser	Gly	Asp	His	Gln	Tyr	Leu	Leu	Pro	Ser
			420					425					430		
Asn	His	Ser	Trp	Trp	Ala	Cys	Ser	Thr	Gly	Leu	Thr	Pro	Cys	Leu	Ser
		435					440					445			
Thr	Ser	Val	Phe	Asn	Gln	Thr	Arg	Asp	Phe	Cys	Ile	Gln	Val	Gln	Leu
	450					455					460				
Ile	Pro	Arg	Ile	Tyr	Tyr	Tyr	Pro	Glu	Glu	Val	Leu	Leu	Gln	Ala	Tyr
465					470					475					480
Asp	Asn	Ser	His	Pro	Arg	Thr	Lys	Arg	Glu	Ala	Val	Ser	Leu	Thr	Leu
				485					490					495	
Ala	Val	Leu	Leu	Gly	Leu	Gly	Ile	Thr	Ala	Gly	Ile	Gly	Thr	Gly	Ser
			500					505					510		
Thr	Ala	Leu	Ile	Lys	Gly	Pro	Ile	Asp	Leu	Gln	Gln	Gly	Leu	Thr	Ser
		515					520					525			
Leu	Gln	Ile	Ala	Ile	Asp	Ala	Asp	Leu	Arg	Ala	Leu	Gln	Asp	Ser	Val
	530					535					540				
Ser	Lys	Leu	Glu	Asp	Ser	Leu	Thr	Ser	Leu	Ser	Glu	Val	Val	Leu	Gln
545					550					555					560
Asn	Arg	Arg	Gly	Leu	Asp	Leu	Leu	Phe	Leu	Lys	Glu	Gly	Gly	Leu	Cys
				565					570					575	
Ala	Ala	Leu	Lys	Glu	Glu	Cys	Cys	Phe	Tyr	Ile	Asp	His	Ser	Gly	Ala
			580					585					590		

ES 2 841 300 T5

Val Arg Asp Ser Met Lys Lys Leu Lys Glu Lys Leu Asp Lys Arg Gln
595 600 605

Leu Glu Arg Gln Lys Ser Gln Asn Trp Tyr Glu Gly Trp Phe Asn Asn
610 615 620

Ser Pro Trp Phe Thr Thr Leu Leu Ser Thr Ile Ala Gly Pro Leu Leu
625 630 635 640

Leu Leu Leu Leu Leu Leu Ile Leu Gly Pro Cys Ile Ile Asn Lys Leu
645 650 655

Val Gln Phe Ile Asn Asp Arg Ile Ser Ala Val Lys Ile
660 665

<210> 10
<211> 759
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> *Homo sapiens*
<400> 10

atgatcgaga cctacaatca gacaagccca cggtcgccg caaccggact gcctatcagc	60
atgaagatct tcatgtacct gctgaccgtg tttctgatca cacagatgat cggctccgcc	120
ctgttcgccg tgtatctgca caggagactg gacaagatcg aggatgagcg caatctgcac	180
gaggacttgc tgtttatgaa gaccatccag cggtgcaaca caggcgagag gagcctgtct	240
ctgctgaatt gtgaggagat caagtcccag ttcgagggct ttgtgaagga tatcatgctg	300
aacaaggagg agacaaagaa ggacgaggat ccacagatcg cagcacacgt ggtgtccgag	360
gcaaactcta atgccgccag cgtgctgcag tgggccaaga agggctacta taccatgaag	420
tctaacctgg tgacactgga gaatggcaag cagctgaccg tgaagaggca gggcctgtac	480
tatatctatg cccagggtgac attctgctct aacagagagg caagctccca ggcacccttc	540
atcgtgggac tgtggctgaa gccctctagc ggcagcgaga ggatcctgct gaaggccgcc	600
aatacccact cctctagcca gctgtgcgag cagcagtcca tccacctggg aggcgtgttc	660
gagctgcagc ctggagccag cgtgttcgtg aacgtgacag acccatctca ggtgagccac	720
ggcaccggct tcacaagctt tggcctgctg aagctgtga	759

<210> 11
<211> 252
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> *Homo sapiens*
<400> 11

ES 2 841 300 T5

```

Met Ile Glu Thr Tyr Asn Gln Thr Ser Pro Arg Ser Ala Ala Thr Gly
1           5           10           15

Leu Pro Ile Ser Met Lys Ile Phe Met Tyr Leu Leu Thr Val Phe Leu
          20           25           30

Ile Thr Gln Met Ile Gly Ser Ala Leu Phe Ala Val Tyr Leu His Arg
          35           40           45

Arg Leu Asp Lys Ile Glu Asp Glu Arg Asn Leu His Glu Asp Phe Val
          50           55           60

Phe Met Lys Thr Ile Gln Arg Cys Asn Thr Gly Glu Arg Ser Leu Ser
65           70           75           80

Leu Leu Asn Cys Glu Glu Ile Lys Ser Gln Phe Glu Gly Phe Val Lys
          85           90           95

Asp Ile Met Leu Asn Lys Glu Glu Thr Lys Lys Asp Glu Asp Pro Gln
          100          105          110

Ile Ala Ala His Val Val Ser Glu Ala Asn Ser Asn Ala Ala Ser Val
          115          120          125

Leu Gln Trp Ala Lys Lys Gly Tyr Tyr Thr Met Lys Ser Asn Leu Val
          130          135          140

Thr Leu Glu Asn Gly Lys Gln Leu Thr Val Lys Arg Gln Gly Leu Tyr
145           150           155           160

Tyr Ile Tyr Ala Gln Val Thr Phe Cys Ser Asn Arg Glu Ala Ser Ser
          165           170           175

Gln Ala Pro Phe Ile Val Gly Leu Trp Leu Lys Pro Ser Ser Gly Ser
          180           185           190

Glu Arg Ile Leu Leu Lys Ala Ala Asn Thr His Ser Ser Ser Gln Leu
          195           200           205

Cys Glu Gln Gln Ser Ile His Leu Gly Gly Val Phe Glu Leu Gln Pro
          210           215           220

Gly Ala Ser Val Phe Val Asn Val Thr Asp Pro Ser Gln Val Ser His
225           230           235           240

      Gly Thr Gly Phe Thr Ser Phe Gly Leu Leu Lys Leu
              245           250

```

<210> 12
 <211> 1416
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 12

ES 2 841 300 T5

```

atgctgccct ttctgagcat gctggtgctg ctggtgcagc ctctgggaaa cctgggagcc      60
gagatgaaga gcctgtccca gagatctgtg cctaacacct gcacactggt catgtgcagc      120
cccaccgaga atggactgcc tggaaggagc ggaagggatg gaaggaggag ccctcggggc      180
gagaaggggc acccaggact gcctggacca atgggactga gcggactgca gggaccaaca      240
ggacctgtgg gaccaaaggg agagaacgga tccgccggag agccaggccc taaggcgag      300
aggggcctgt ctggccccc cggcctgcca ggcatcccag gcccgcggc caaggagggc      360
ccatccggca agcagggcaa tatcggtccc cagggcaagc ctggccaaa gggcgaggca      420
ggaccaaagg gagaagtggg agcacctggc atgcagggat ccaccggagc aaaggatct      480
acaggacca aaggcgagcg cggcgcccca ggcgtgcagg gcgcccccg caatgcagga      540
gcagcaggac cagcaggacc tgcaggccca caggcgccc ctggctctag gggcccacc      600
ggcctgaagg gcgacaggg agtgcctggc gataggggca tcaagggaga gagcgagctg      660
ccagattccg ccgccctgag gcagcagatg gaggcctga agggcaagct gcagaggctg      720
gagggtggct tctccacta ccagaaggcc gccctgttc cagacggcca caggagactg      780
gacaagatcg aggatgagcg caacctgcac gaggatttcg tgtttatgaa gaccatccag      840
agatgcaaca caggcgagcg gtctctgagc ctgctgaatt gtgaggagat caagtctcag      900
ttcgagggct ttgtgaagga catcatgctg aacaaggagg agaccaagaa ggagaatagc      960
ttcgagatgc agaaggcgga tcagaatccc cagatcgag cacacgtgat cagcgaggca     1020
agctccaaga ccacatccgt gctgcagtgg gccgagaagg gctactatac catgtccaac     1080
aatctggtga cactggagaa cggcaagcag ctgaccgtga agagacaggg cctgtactat     1140
atctatgccc aggtgacatt ctgctcta atcgaggccct ctagccaggc cccttttctc     1200
gcctctctgt gcctgaagag ccaggcgaga ttcgagcgga tcctgctgag ggccgccaac     1260
accactcct ctgccaagcc atgcggacag cagagcatcc acctgggagg cgtgttcgag     1320
ctgcagccag gagcctccgt gtttgtgaat gtgacagacc catcccaggt gtctcacgga     1380
accggcttca catcctttgg cctgctgaag ctgtga      1416

```

<210> 13
 <211> 471
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

 <400> 13

ES 2 841 300 T5

Met	Leu	Pro	Phe	Leu	Ser	Met	Leu	Val	Leu	Leu	Val	Gln	Pro	Leu	Gly	1	5	10	15
Asn	Leu	Gly	Ala	Glu	Met	Lys	Ser	Leu	Ser	Gln	Arg	Ser	Val	Pro	Asn	20	25	30	
Thr	Cys	Thr	Leu	Val	Met	Cys	Ser	Pro	Thr	Glu	Asn	Gly	Leu	Pro	Gly	35	40	45	
Arg	Asp	Gly	Arg	Asp	Gly	Arg	Glu	Gly	Pro	Arg	Gly	Glu	Lys	Gly	Asp	50	55	60	
Pro	Gly	Leu	Pro	Gly	Pro	Met	Gly	Leu	Ser	Gly	Leu	Gln	Gly	Pro	Thr	65	70	75	80
Gly	Pro	Val	Gly	Pro	Lys	Gly	Glu	Asn	Gly	Ser	Ala	Gly	Glu	Pro	Gly	85	90	95	
Pro	Lys	Gly	Glu	Arg	Gly	Leu	Ser	Gly	Pro	Pro	Gly	Leu	Pro	Gly	Ile	100	105	110	
Pro	Gly	Pro	Ala	Gly	Lys	Glu	Gly	Pro	Ser	Gly	Lys	Gln	Gly	Asn	Ile	115	120	125	
Gly	Pro	Gln	Gly	Lys	Pro	Gly	Pro	Lys	Gly	Glu	Ala	Gly	Pro	Lys	Gly	130	135	140	
Glu	Val	Gly	Ala	Pro	Gly	Met	Gln	Gly	Ser	Thr	Gly	Ala	Lys	Gly	Ser	145	150	155	160
Thr	Gly	Pro	Lys	Gly	Glu	Arg	Gly	Ala	Pro	Gly	Val	Gln	Gly	Ala	Pro	165	170	175	
Gly	Asn	Ala	Gly	Ala	Ala	Gly	Pro	Ala	Gly	Pro	Ala	Gly	Pro	Gln	Gly	180	185	190	
Ala	Pro	Gly	Ser	Arg	Gly	Pro	Pro	Gly	Leu	Lys	Gly	Asp	Arg	Gly	Val	195	200	205	
Pro	Gly	Asp	Arg	Gly	Ile	Lys	Gly	Glu	Ser	Gly	Leu	Pro	Asp	Ser	Ala	210	215	220	
Ala	Leu	Arg	Gln	Gln	Met	Glu	Ala	Leu	Lys	Gly	Lys	Leu	Gln	Arg	Leu	225	230	235	240

ES 2 841 300 T5

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

<210> 14
 <211> 1412
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*
 <400> 14

ES 2 841 300 T5

```

atgctgccct tcttgagcat gctggtgctg ctggtgcagc ctctgggcaa tctgggcgcc      60
gagatgaagt ccctgtctca gaggagcgtg ccaaacacct gcacactggt catgtgctct      120
ccaaccgaga atggactgcc aggaaggagc ggaagagatg gaaggaggag accaagggga      180
gagaagggcg accctggact gcctggacca atgggactgt ccggactgca gggaccaaca      240
ggccctgtgg gaccaaaggg agagaatgga agcgccggag agccaggacc taagggagag      300
aggggcctgt ccggcccccct tggcctgcct ggcaccccag gcccgcggcg caaggagggc      360
ccttctggca agcagggcaa catcggacca cagggcaagc ctggaccaa gggagaggca      420
ggaccaaagg gagaagtggg agcaccggcg atgcagggca gcaccggagc aaaggatcc      480
accggcccta agggagagag aggagcacct ggagtgcagg gcgcccagc caatgcagga      540
gcagcaggac cagcaggacc tgcaggccca caggcgccc caggcagccg gggcccaccc      600
ggcctgaagg gcgacagggg agtgccaggc gataggggca tcaagggaga gtccggactg      660
ccagactctg ccgccctgag gcagcagatg gaggccctga agggcaagct gcagaggctg      720
gaggtggcct tctccacta ccagaaggcc gccctgttct cagacggaca caggagactg      780
gataaggtgg aggaggaggt gaacctgcac gaggatttct tgttcatcaa gaagctgaag      840
aggtgcaaca agggcgaggg cagcctgtcc ctgctgaatt gtgaggagat gcggcgccag      900
ttcgaggacc tggatgaagg tatcacctg aacaaggagg agaagaagg gaattctttt      960
gagatgcaga ggggcgacga ggatcctcag atcgcagcac acgtggtgtc cgaggcaaac     1020
tctaattgcc ccagcgtgct gcagtgggccc aagaagggct actataccat gaagtctaac     1080
ctggtcatgc tggagaatgg caagcagctg acagtgaaga gagagggcct gtactacgtg     1140
tacaccagcag tgacattctg cagcaacaga gagcccagct cccagcggcc ttttatcgtg     1200
ggcctgtggc tgaagccctc tatcggaagc gagaggatcc tgctgaaggc agccaatacc     1260
cactctagct cccagctgtg cgagcagcag tccgtgcacc tgggaggcgt gttcagactg     1320
caggcaggag caagcgtgtt cgtgaacgga cagaggccag ccaggtcac cacagagtgg     1380
gcttctctag ctttggcctg ctgaagctgt ga                                     1412

```

<210> 15
 <211> 470
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 <400> 15

5

10

Met Leu Pro Phe Leu Ser Met Leu Val Leu Leu Val Gln Pro Leu Gly
 1 5 10 15

ES 2 841 300 T5

Asn	Leu	Gly	Ala	Glu	Met	Lys	Ser	Leu	Ser	Gln	Arg	Ser	Val	Pro	Asn	20	25	30	
Thr	Cys	Thr	Leu	Val	Met	Cys	Ser	Pro	Thr	Glu	Asn	Gly	Leu	Pro	Gly	35	40	45	
Arg	Asp	Gly	Arg	Asp	Gly	Arg	Glu	Gly	Pro	Arg	Gly	Glu	Lys	Gly	Asp	50	55	60	
Pro	Gly	Leu	Pro	Gly	Pro	Met	Gly	Leu	Ser	Gly	Leu	Gln	Gly	Pro	Thr	65	70	75	80
Gly	Pro	Val	Gly	Pro	Lys	Gly	Glu	Asn	Gly	Ser	Ala	Gly	Glu	Pro	Gly	85	90	95	
Pro	Lys	Gly	Glu	Arg	Gly	Leu	Ser	Gly	Pro	Pro	Gly	Leu	Pro	Gly	Ile	100	105	110	
Pro	Gly	Pro	Ala	Gly	Lys	Glu	Gly	Pro	Ser	Gly	Lys	Gln	Gly	Asn	Ile	115	120	125	
Gly	Pro	Gln	Gly	Lys	Pro	Gly	Pro	Lys	Gly	Glu	Ala	Gly	Pro	Lys	Gly	130	135	140	
Glu	Val	Gly	Ala	Pro	Gly	Met	Gln	Gly	Ser	Thr	Gly	Ala	Lys	Gly	Ser	145	150	155	160
Thr	Gly	Pro	Lys	Gly	Glu	Arg	Gly	Ala	Pro	Gly	Val	Gln	Gly	Ala	Pro	165	170	175	
Gly	Asn	Ala	Gly	Ala	Ala	Gly	Pro	Ala	Gly	Pro	Ala	Gly	Pro	Gln	Gly	180	185	190	
Ala	Pro	Gly	Ser	Arg	Gly	Pro	Pro	Gly	Leu	Lys	Gly	Asp	Arg	Gly	Val	195	200	205	
Pro	Gly	Asp	Arg	Gly	Ile	Lys	Gly	Glu	Ser	Gly	Leu	Pro	Asp	Ser	Ala	210	215	220	
Ala	Leu	Arg	Gln	Gln	Met	Glu	Ala	Leu	Lys	Gly	Lys	Leu	Gln	Arg	Leu	225	230	235	240
Glu	Val	Ala	Phe	Ser	His	Tyr	Gln	Lys	Ala	Ala	Leu	Phe	Pro	Asp	Gly	245	250	255	
His	Arg	Arg	Leu	Asp	Lys	Val	Glu	Glu	Glu	Val	Asn	Leu	His	Glu	Asp	260	265	270	

ES 2 841 300 T5

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

<210> 16
 <211> 786
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 16

ES 2 841 300 T5

```

atgatcgaaa catacaacca aacttctccc cgatctgcgg ccaactggact gcccatcagc      60
atgaaaaattt ttatgtattt acttactggtt tttcttatca cccagatgat tgggtcagca      120

ctttttgctg tgtatcttca tagaagggtg gacaagatag aagatgaaag gaatcttcat      180
gaagattttt tattcatgaa aacgatacag agatgcaaca caggagaaag atccttatcc      240
ttactgaact gtgaggagat taaaagccag tttgaaggct ttgtgaagga tataatgtta      300
aacaaagagg agacgaagaa agaaaacagc tttgaaatgc aaaaagggtga tcagaatcct      360
caaattgcgg cacatgtcat aagtgaggcc agcagtaaaa caacatctgt gttacagtgg      420
gctgaaaaag gatactacac catgagcaac aacttggtta ccctggaaaa tgggaaacag      480
ctgaccgtta aaagacaagg actctattat atctatgccc aagtcacctt ctgttccaat      540
cggggaagctt cgagtcaagc tccatttata gccagcctct gcctaaagtc ccccggtaga      600
ttcgagagaa tcttactcag agctgcaaat acccacagtt ccgccaaacc ttgcgggcaa      660
caatccattc acttgggagg agtatttgaa ttgcaaccag gtgcttcggt gtttgtcaat      720
gtgactgata caagccaagt gagccatggc actggcttca cgtcctttgg cttactcaaa      780
ctctga                                         786

```

<210> 17
 <211> 261
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 17

```

Met Ile Glu Thr Tyr Asn Gln Thr Ser Pro Arg Ser Ala Ala Thr Gly
 1              5              10              15

Leu Pro Ile Ser Met Lys Ile Phe Met Tyr Leu Leu Thr Val Phe Leu
          20              25              30

Ile Thr Gln Met Ile Gly Ser Ala Leu Phe Ala Val Tyr Leu His Arg
 35              40              45

Arg Leu Asp Lys Ile Glu Asp Glu Arg Asn Leu His Glu Asp Phe Val
 50              55              60

Phe Met Lys Thr Ile Gln Arg Cys Asn Thr Gly Glu Arg Ser Leu Ser
 65              70              75              80

Leu Leu Asn Cys Glu Glu Ile Lys Ser Gln Phe Glu Gly Phe Val Lys
          85              90              95

Asp Ile Met Leu Asn Lys Glu Glu Thr Lys Lys Glu Asn Ser Phe Glu
          100              105              110

Met Gln Lys Gly Asp Gln Asn Pro Gln Ile Ala Ala His Val Ile Ser
          115              120              125

```


ES 2 841 300 T5

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

Tyr Tyr Thr Met Ser Asn Asn Leu Val Thr Leu Glu Asn Gly Lys Gln
145 150 155 160

Leu Thr Val Lys Arg Gln Gly Leu Tyr Tyr Ile Tyr Ala Gln Val Thr
165 170 175

Phe Cys Ser Asn Arg Glu Ala Ser Ser Gln Ala Pro Phe Ile Ala Ser
180 185 190

Leu Cys Leu Lys Ser Pro Gly Arg Phe Glu Arg Ile Leu Leu Arg Ala
195 200 205

Ala Asn Thr His Ser Ser Ala Lys Pro Cys Gly Gln Gln Ser Ile His
210 215 220

Leu Gly Gly Val Phe Glu Leu Gln Pro Gly Ala Ser Val Phe Val Asn
225 230 235 240

Val Thr Asp Pro Ser Gln Val Ser His Gly Thr Gly Phe Thr Ser Phe
245 250 255

Gly Leu Leu Lys Leu
260

<210> 18
<211> 783
<212> ADN
<213> *Mus musculus*

<400> 18

5

10

atgatagaaa catcacagcca accttccccc agatccgtgg caactggact tccagcgagc	60
atgaagattt ttatgtattht acttactgtt ttccttatca cccaaatgat tggatctgtg	120
ctttttgctg tgtatcttca tagaagattg gataaggctg aagaggaagt aaaccttcat	180
gaagattttg tattcataaa aaagctaaag agatgcaaca aaggagaagg atctttatcc	240
ttgctgaact gtgaggagat gagaaggcaa tttgaagacc ttgtcaagga tataacgtta	300
aacaaagaag agaaaaaaga aaacagcttt gaaatgcaaa gaggtgatga ggatcctcaa	360
attgcagcac acgttgtaag cgaagccaac agtaatgcag catccgttct acagtgggcc	420
aagaaaggat attataccat gaaaagcaac ttggtaatgc ttgaaaatgg gaaacagctg	480
acggttaaaa gagaaggact ctattatgtc tacactcaag tcaccttctg ctctaactcg	540
gagccttcga gtcaacgccc attcatcgtc ggcctctggc tgaagcccag cagtggatct	600
gagagaatct tactcaaggc ggcaaatacc cacagttcct cccagctttg cgagcagcag	660
tctgttcact tgggaggagt gtttgaatta caagctgggtg cttctgtgtt tgtcaacgtg	720
actgaagcaa gccaaagtat ccacagagtt ggcttctcat cttttggctt actcaaactc	780
tga	783

<210> 19

ES 2 841 300 T5

<211> 260
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

5 <400> 19

```

Met Ile Glu Thr Tyr Ser Gln Pro Ser Pro Arg Ser Val Ala Thr Gly
 1             5             10             15

Leu Pro Ala Ser Met Lys Ile Phe Met Tyr Leu Leu Thr Val Phe Leu
      20             25             30

Ile Thr Gln Met Ile Gly Ser Val Leu Phe Ala Val Tyr Leu His Arg
      35             40             45

Arg Leu Asp Lys Val Glu Glu Glu Val Asn Leu His Glu Asp Phe Val
      50             55             60

Phe Ile Lys Lys Leu Lys Arg Cys Asn Lys Gly Glu Gly Ser Leu Ser
      65             70             75             80

Leu Leu Asn Cys Glu Glu Met Arg Arg Gln Phe Glu Asp Leu Val Lys
      85             90             95

Asp Ile Thr Leu Asn Lys Glu Glu Lys Lys Glu Asn Ser Phe Glu Met
      100            105            110

Gln Arg Gly Asp Glu Asp Pro Gln Ile Ala Ala His Val Val Ser Glu
      115            120            125

Ala Asn Ser Asn Ala Ala Ser Val Leu Gln Trp Ala Lys Lys Gly Tyr
      130            135            140

Tyr Thr Met Lys Ser Asn Leu Val Met Leu Glu Asn Gly Lys Gln Leu
      145            150            155            160

Thr Val Lys Arg Glu Gly Leu Tyr Tyr Val Tyr Thr Gln Val Thr Phe
      165            170            175

Cys Ser Asn Arg Glu Pro Ser Ser Gln Arg Pro Phe Ile Val Gly Leu
      180            185            190

Trp Leu Lys Pro Ser Ser Gly Ser Glu Arg Ile Leu Leu Lys Ala Ala
      195            200            205

Asn Thr His Ser Ser Ser Gln Leu Cys Glu Gln Gln Ser Val His Leu
      210            215            220

Gly Gly Val Phe Glu Leu Gln Ala Gly Ala Ser Val Phe Val Asn Val
      225            230            235            240

Thr Glu Ala Ser Gln Val Ile His Arg Val Gly Phe Ser Ser Phe Gly
      245            250            255

Leu Leu Lys Leu
      260
  
```

<210> 20
 <211> 930
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

5

<400> 20

atggatcagc acacactgga cgtggaggat accgctgacg ctaggcacc	agctggcacc	60
tcctgccctt ctgatgccgc tctgctgcgc gacacaggac tgctggccga tgccgctctg		120
ctgtctgaca cagtgcggcc aaccaacgcc gctctgccaa ccgatgctgc ttaccctgct		180
gtgaacctga gggacagaga ggctgcttgg ccacctgccc tgaacttctg cagccgccac		240
cctaagctgt acggcctggt ggccctggtg ctgctgctgc tgategctgc ttgcgtgcc		300
atctttaccc ggacagagcc acgccccgct ctgacaatca ccacatcccc caacctgggc		360
accagggaga acaacgccga tcaggtgaca ccagtgtctc acatcggtg ccccaacacc		420
acacagcagg gaagcccagt gttgcccaag ctgctggcta agaaccaggc cagcctgtgc		480
aacaccacac tgaactggca cagccaggac ggagctggaa gtcctacct gtcccagggc		540
ctgagatacg aggaggataa gaaggagctg gtggtggact cccctggact gtactacgtg		600
ttcctggagc tgaagctgtc tccaaccttt acaaacaccg gccacaaggt gcagggatgg		660
gtgtctctgg tgctgcaggc taagccccag gtggacgatt tcgataacct ggccctgacc		720
gtggagctgt ttccctgtag catggagaac aagctggtgg acaggtcttg gagccagctg		780
ctgctgctga aggctggcca caggctgtcc gtgggactga gagcctacct gcacggcgcc		840
caggatgctt acagagactg ggagctgagc taccctaaca ccacatcctt cggactgttt		900
ctggtgaagc ctgacaaccc atgggagtga		930

10

<210> 21
 <211> 765
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

15

<400> 21

ES 2 841 300 T5

atggagtagc cctctgacgc cagcctggat ccagaggccc cttggccacc tgcaccaagg	60
gcccgcgcct gccgcgtgct gccctgggcc ctggtggccg gcctgttatt actgctgctg	120
ctggccgcgc cctgcgccgt gtctctggca tgccttggg ccgtgagcgg agccagagcc	180
tcccagcgtc ctgccgccag cctcggctg agagaggac cagagctgtc ccagacgat	240
ccagcaggcc tgcctggacct gaggcaggga atgtttgcc agctggtggc ccagaacctg	300
ctgctgatcg acggccccct gtcttggtac tctgatcctg gcctggccgg cgtgtctctg	360
accggcggcc tgagctataa ggaggatata aaggagctgg tggaggccaa ggccggcgtg	420
tactacgtgt tcttcacgt ggagctgagg agagtgggtg caggagaggg ctctggaagc	480
gtgtccctgg cctgcacct gcagccctg cggagcgcgg caggagcgc cgccttggcc	540
ctgaccgtgg acctgccacc agccagctcc gaggaagga attccgcctt cggctttcag	600
ggcagactgc tgcacctgtc tgccggacag aggttgggag tgcacctgca caccagggcc	660
agggcccgcc acgcatggca gctgaccag ggagcaacag tgctgggcct gttccgcgtg	720
acacctgaga tccagcagg cctgcctagc ccacgggccg agtga	765

<210> 22
 <211> 1389
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

<400> 22

ES 2 841 300 T5

atgctgcctt	tcctgtccat	gctgggtgctg	ctgggtgcagc	cactgggcaa	cctgggagcc	60
gagatgaagt	ctctgagcca	gcgcagcgtg	cctaacacct	gcacactggt	catgtgctcc	120
cctacagaga	acggcctgcc	aggaaggagc	ggaagagatg	gaaggaggag	accaagggga	180
gagaaggagg	accccgact	gcctggacca	atgggactga	gcggcctgca	gggaccaacc	240
ggccccgtgg	gacctaaggg	agagaacgga	tccgctggag	agccaggacc	taagggagag	300
agaggactgt	ctggaccacc	tggactgcca	ggaatcccag	gaccagctgg	caaggaggga	360
ccatccggca	agcagggaaa	catcggacca	cagggaaaag	ctggaccaa	gggagaggct	420
ggacctaagg	gagaagtggg	cgccccagga	atgcagggct	ctacaggagc	taagggcagc	480
accggacca	aggagagag	gggagcccc	ggagtgcagg	gagccctg	caacgctgga	540
gccgctggcc	cagccggacc	cgctggccct	cagggagccc	ccggtcttag	gggaccacca	600
ggcctgaagg	gagacagagg	cgtgcccga	gatcggggca	tcaagggaga	gagcggcctg	660
cctgactccg	ccgctctgag	acagcagatg	gaggctctga	agggcaagct	gcagcggctg	720
gagggtggcct	tctccacta	ccagaaggcc	gctctgttct	ctgacggaag	gacagagccc	780
aggcctgctc	tgaccatcac	cacatctcca	aacctgggca	caagagagaa	caacgccgat	840
caggtgaccc	ccgtgtctca	catcggatgc	cctaacacca	cacagcaggg	cagccccgtg	900
tttgccaagc	tgctggctaa	gaaccaggcc	agcctgtgca	acaccacact	gaactggcac	960
tcccaggatg	gcgcgggaag	ctcctacctg	tctcagggcc	tgccgtacga	ggaggacaag	1020
aaggagctgg	tggtggatag	cccaggcctg	tactacgtgt	tcctggagct	gaagctgtcc	1080
cccaccttta	caaacaccgg	acacaagggt	cagggatggg	tgagcctggt	gctgcaggct	1140
aagccccagg	tggacgattt	cgacaacctg	gccctgaccg	tggagctgtt	tccttgctct	1200
atggagaaca	agctggtgga	tagatcctgg	agccagctgc	tgctgctgaa	ggctggacac	1260
cgctgagcg	tgggcctgag	ggcttacctg	cacggagctc	aggacgctta	cagggattgg	1320
gagctgtcct	accctaacac	cacatcttct	ggcctgttct	tggtgaagcc	agacaacccc	1380
tgaggagtga						1389

<210> 23
 <211> 1389
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 23

ES 2 841 300 T5

atgctgctgt tccctgctgtc cgcctctggtg ctgctgaccc agcctctggg ctacctggag	60
gccgagatga agacctattc tcaccggaca atgccaaagcg cctgcacact ggtcatgtgc	120
agcagcgtgg agtctggcct gccaggaagg gacggaagg atggaaggga gggacctaga	180
ggcgagaagg gcgaccttg cctgccagga gcagcaggac aggcaggaat gcccggccag	240
gccggccccg tgggacctaa gggcgacaac ggaagcgtgg gagagccagg accaaagggc	300
gataccggcc cttccggacc acctggacca ccaggcgtgc ctggcccagc cggcagggag	360
ggccctctgg gcaagcagg caatatcggc ccacagggca agcccggccc taagggcgag	420
gccggcccca agggcgaagt gggcgcccct ggcatgcagg gaagcgccg agcccgccg	480
ctggccggac ctaaggcgga gagaggcgtg cctggagaga gggcggtgcc aggaacaca	540
ggcgagcag gatctgccg agcaatggga cccagggca gccctggcg caggggccct	600
ccaggcctga agggcgacaa gggcatcca ggcgataagg gagcaaagg agagagcggc	660
ctgccagatg tggcctccct gcgccagcag gtggaggccc tgcagggcca ggtgcagcac	720
ctgcaggccg ccttctctca gtacaagaag gtggagctgt ttccaaacgg cgcctgcccc	780
tgggcccgtga gcggagccc ggcctcccca ggcctgccc ccagccctag gctgcgcgag	840
ggaccagagc tgagccaga cgatccagca ggcctgctgg acctgagaca gggaatgttc	900
gccagctgg tggccagaa tgtgctgctg atcgacggcc cactgtcctg gtactctgat	960
ccaggcctgg ccggcgtgtc cctgaccggc ggcctgtctt ataaggagga taaaaaggag	1020
ctggtggtgg ccaaggccgg cgtgtactac gtgttcttcc agctggagct gaggagagt	1080
gtggcaggag agggatccgg atctgtgagc ctggccctgc acctgcagcc cctgcgggtcc	1140
gccgcaggag ccgccgccct ggccctgacc gtggacctgc cacctgcctc tagcgaggca	1200
cgcaattccg ccttcggctt tcagggccgg ctgctgcacc tgtctgccg acagagactg	1260
ggagtgcacc tgcacaccga ggccggggcc agacacgcct ggcagctgac ccaggagca	1320
acagtgctgg gcctgtttag ggtgacacct gagatcccag ccggcctgcc aagccccgc	1380
tccgagtga	1389

<210> 24
 <211> 522
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

<400> 24

ES 2 841 300 T5

```

atggaggaga tgctcttgag ggagagctcc ccacagaggg ccgagagatg caagaagagc      60
tggctgctgt gcatcgtggc tctgctgctg atgctgctgt gctctctggg caccctgata      120
tacacaagcc tgaagccaac cgccatcgag tcctgtatgg tgaagttcga gctgtctagc      180
tccaagtggc acatgacatc ccccaagcct cactgctga acaccacatc tgacggaaag      240
ctgaagatcc tgcagagcgg cacctacctg atctacggac aggtcatccc cgtggacaag      300
aagtacatca aggataacgc ccctttcgtg gtgcagatct acaagaagaa cgacgtgctg      360
cagacactga tgaacgattt tcagatcctg cccatcggcg gagtgtacga gctgcacgct      420
ggcgacaaca tctacctgaa gttcaactcc aaggatcaca tccagaagac caacacatac      480
tggggaatca tcctgatgcc agatctgccc tttatctctt ga                          522

```

<210> 25
 <211> 600
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 25

```

atgaccctgc acccaagccc catcacatgc gagttcctgt tttctaccgc cctgatcagc      60
ccaaagatgt gcctgagcca cctggagaat atgccctgt cccactctcg gacacagggg      120
gccagagaa gctcctggaa gctgtggctg ttctgctcta tcgtgatgct gctgttcctg      180
tgcagctttt cctggctgat ctcatcttt ctgcagctgg agacagccaa ggagccttgc      240
atggccaagt ttggccctct gccatccaag tggcagatgg cctctagcga gccccttgc      300
gtgaacaagg tgagcgactg gaagctggag atcctgcaga acggcctgta cctgatctat      360
ggccagggtg cccccaacgc caattacaac gacgtggccc ctttcgaggt gcggctgtat      420
aagaacaagg atatgatcca gaccctgaca aataagtcta agatccagaa cgtggggggc      480
acatacgagc tgcacgtggg cgacaccatc gacctgatct tcaacagcga gcaccagggtg      540

```

```

ctgaagaaca atacatattg gggcatcatc ctgctggcca acccccagtt tatctcctga      600

```

<210> 26
 <211> 1164
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

<400> 26

ES 2 841 300 T5

atgctgcctt	tctgtctat	gctggtgctg	ctggtgcagc	cactgggcaa	cctgggagcc	60
gagatgaaga	gcctgtccca	gagatccgtg	cccaacacct	gcacactggt	catgtgctct	120
cctaccgaga	acggcctgcc	aggaaggagc	ggaagagatg	gaaggaggag	acctcgggga	180
gagaaggagg	acccaggact	gcctggacca	atgggactga	gcggcctgca	gggaccaaca	240
ggccccgtgg	gacctaaggg	agagaacgga	agcgccggag	agccaggacc	taagggagag	300
aggggactgt	ccggaccacc	tggactgcct	ggaatcccag	gaccagctgg	caaggaggga	360
ccatccggca	agcagggaaa	catcggacca	cagggaagc	ctggaccaa	gggagaggct	420
ggaccaaagg	gagaagtggg	cgctcctgga	atgcagggct	ccaccggagc	caagggctct	480
acaggaccaa	aaggagagag	gggagctccc	ggagtgcag	gagcccctgg	caacgctgga	540
gccgctggcc	cagccggacc	cgctggccct	caggagagcc	caggcagcag	gggaccaccc	600
ggcctgaagg	gcgacagggg	cgtgccagga	gataggggca	tcaagggaga	gtctggcctg	660
ccagacagcg	ccgctctgag	acagcagatg	gaggccctga	agggaagct	gcagcggctg	720
gagggtggctt	tctccacta	ccagaaggcc	gctctgttct	cagatggcag	cctgaagccc	780
accgccatcg	agtccctgat	ggtgaagttt	gagctgagct	cctctaagt	gcacatgaca	840
tctcccaagc	ctcactgcgt	gaacaccaca	tctgacggca	agctgaagat	cctgcagagc	900
ggcacctacc	tgatctacgg	ccaggctatc	cccgtggaca	agaagtacat	caaggataac	960
gcccctttcg	tggtgcagat	ctacaagaag	aacgacgtgc	tgacagacact	gatgaacgat	1020
tttcagatcc	tgccaatcgg	cggagtgtac	gagctgcacg	ctggcgacaa	catctacctg	1080
aagttcaact	ctaaggatca	catccagaag	accaacacat	actggggcat	catcctgatg	1140
ccagatctgc	cctttatcag	ctga				1164

<210> 27
 <211> 1152
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 27

atgctgctgt	tctgtctgtc	tgccctgggtg	ctgctgaccc	agccactggg	ctacctggag	60
gccgagatga	agacctattc	ccaccgcaca	atgccttctg	cctgcacact	ggtcatgtgc	120
agcagcgtgg	agagcggcct	gccaggaagg	gacggaagag	atggaaggga	gggaccacaga	180
ggcgagaagg	gcgaccctgg	cctgccagga	gcagcaggac	aggcaggaat	gccaggccag	240

ES 2 841 300 T5

gcccggccccg tggggccctaa gggcgacaat ggatccgtgg gagagccagg accaaagggc 300
gataccggcc cttctggacc acctggacca ccaggcgtgc ctggaccagg aggaagagag 360
ggacctctgg gcaagcaggg aaacatcga ccacaggga agccaggccc taaggcgag 420
gccggcccca agggcgaggt gggcgccctt ggcatgcagg gatccgcccg agccaggggc 480
ctggccggac ctaaggcgga gcggggcgtg cctggagaga gggcggtgcc aggaaataca 540
ggcgagcag gatctgccg agcaatggga ccacaggga gcccggcg cagaggccct 600
ccaggcctga agggcgacaa gggaatccct ggcgataagg gagcaaagg agagagcggc 660
ctgccagacg tggcctccct gaggcagcag gtggaggccc tgcagggaca ggtgcagcac 720
ctgcaggccc ccttcagcca gtacaagaag gtggagctgt ttccaaatgg cgagacagcc 780
aaggagccct gcatggccaa gttcggccca ctgccagca agtggcagat ggcctctagc 840
gagccccctt gcgtgaacaa ggtgagcgtg tggaagctgg agatcctgca gaacggcctg 900
tacctgatct atggccaggt gggccccaac gccattaca acgacgtggc cccttttgag 960
gtgcggtgtg ataagaacaa ggatatgac cagaccctga caaataagtc taagatccag 1020
aacgtgggag gcacctacga gctgcacgtg ggcgacacaa tcgacctgat cttcaacagc 1080
gagcaccagg tgctgaagaa caatacatat tggggcatca tcctgctggc caacccccag 1140
tttatctcct ga 1152

<210> 28
<211> 597
<212> ADN
<213> *Mus musculus*

<400> 28

atggagggcg agggagtga gcccctggat gagaacctgg agaacggctc ccggcctcgc 60
ttcaagtga agaagacct gcggctggtg gtgtctggaa tcaaggcg cggaatgctg 120
ctgtgcttta tctacgttg cctgcagctg agctcctctc ccgccaagga tccccctatc 180
cagaggctga gaggagctgt gaccagggtc gaggacggac agctgttcat cagctcctac 240
aagaacgagt accagacaat ggaggtgcag aacaacagcg tggatcatca gtgtgatggc 300
ctgtacatca tctacctga gggatccttc tttcaggagg tgaagatcga cctgcacttt 360
cgggaggatc acaacccaat ctctatcccc atgctgaacg acggcaggag aatcgtgttc 420
acagtgggtg ccagcctggc ttttaaggac aagggtgtacc tgaccgtgaa cgccccagat 480
acactgtgcg agcacctgca gatcaacgac ggagagctga tcgtggtgca gctgaccttc 540
ggctactgtg ctccagaggg atcttaccac agcacagtga accagggtgcc cctgtga 597

<210> 29
<211> 552
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 29

ES 2 841 300 T5

atggagaggg tgcagccct ggaggagaac gtgggaaatg ccgcccggcc tagattcgag	60
aggaacaagc tgetgctggt ggctctctgtg atccagggcc tgggcctgct gctgtgcttc	120
acctacatct gtctgcactt ttctgccctg cagggtgagcc acagataccc ccgcatccag	180
agcatcaagg tgcagttcac cgagtataag aaggagaagg gctttatcct gacatcccag	240
aaggaggacg agatcatgaa ggtgcagaac aattctgtga tcatcaactg cgatggcttc	300
tacctgatct ccctgaagg ctatctttct caggaagtga atatcagcct gcactatcag	360
aaggacgagg agccactgtt tcagctgaag aagggtcgga gcgtgaattc cctgatgggtg	420
gccagcctga cctacaagga caagggtgat ctgaacgtga ccacagataa tacatccctg	480
gacgatctcc acgtgaacgg cggcgagctg atcctgatcc accagaatcc cggcgagttt	540
tgcgtgctgt ga	552

<210> 30
 <211> 1215
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

<400> 30

atgctgccct tctgtccat gctggtgctg ctggtgcagc ctctgggcaa cctgggagcc	60
gagatgaagt ctctgagcca gagatccgtg ccaaacacct gcacactggt catgtgctct	120
cccaccgaga acggcctgcc tgggaaggac ggaagagatg gaaggaggag accccgggga	180
gagaaggggc atcctggact gccaggacct atgggactga gcggcctgca gggaccaaca	240
ggccccgtgg gacctaaagg agagaacgga agcgccggag agccaggacc aaaggagag	300
aggggactgt ccggcccacc tggactgcct ggaatccctg gaccagctgg caaggaggga	360
ccttccggca agcagggaaa catcggacca cagggaagc caggacctaa gggagaggct	420
ggaccaaagg gagaagtggg cgtcccga atgcagggt ctaccggagc caagggcagc	480
acaggaccta agggagagag gggagctcca ggagtgcagg gagccccgg caacgctgga	540
gctgctggac cagctggacc agctggcct caggagagcc caggctctag gggaccacca	600
ggcctgaagg gcgacagggg cgtgccagga gataggggca tcaagggaga gagcggcctg	660
ccagattccg ccgctctgag acagcagatg gaggcctga agggcaagct gcagcggctg	720
gaggtggctt tcagccacta ccagaaggcc gctctgttct ctgacggcag ctctctcca	780
gccaaaggat ctccaatcca gcggctgcgc ggagctgtga ccagggtgca ggatggccag	840
ctgttcatca gctcctacaa gaacgagtag cagacaatgg aggtgcagaa caactctgtg	900
gtcatcaagt gtgacggcct gtacatcatc tacctgaagg gcagcttctt tcaggagggtg	960
aagatcgacc tgcactttag agaggatcac aacccaatct ccatcccat gctgaacgac	1020
ggcaggagaa tcgtgttcac cgtggtggcc tctctggctt ttaaggacaa ggtgtacctg	1080
accgtgaacg ccccgatac actgtgcgag cacctgcaga tcaacgacgg cgagctgac	1140
gtggtgcagc tgaccctgg atactgtgct ccagagggt cctaccactc tacagtgaac	1200
cagggtgcctc tgtga	1215

<210> 31

ES 2 841 300 T5

<211> 1170
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

5 <400> 31

```

atgctgctgt tcctgctgag cgccctggtg ctgctgaccc agccactggg ctacctggag      60
gccgagatga agacctattc ccacagaaca atgccttctg cctgcacact ggtcatgtgc      120
agcagcgtgg agtccggcct gccaggaagg gacggcagag atggcaggga gggccccagg      180
ggcgagaagg gcgacccccg cctgcctgga gcagcaggcc aggccggcat gccaggccag      240
gccggccccg tggggcccaa gggcgacaac ggcagcgtgg gcgagccccg ccctaagggc      300
gataccggcc cctccggccc ccctggccca cccggcgtgc caggaccagc aggaaggggag      360
ggaccactgg gcaagcaggg caatatcgga cctcagggca agcctggacc aaagggagag      420
gcaggaccaa agggagaagt gggcgccctt ggcatgcagg gatctgccgg agcccggggc      480
ctggccggcc ccaagggcga gagaggcgtg cccggcgaga ggggcgtgcc tggcaacaca      540
ggcgccggcc gctccggccg cgccatggga cctcagggct ctccaggagc cagaggccct      600
ccaggcctga agggcgacaa ggggaatccct ggcgataagg gagcaaaggg agagagcggc      660
ctgccagacg tggcctccct gcggcagcag gtggaggccc tgcaggggca ggtgcagcac      720
ctgcaggccc ccttcagcca gtacaagaag gtggagctgt ttccctaatgg cgtgtctcac      780
cgctacccac ggatccagag catcaagggt cagttcaccg agtataagaa ggagaagggc      840
tttatcctga catctcagaa ggaggacgag atcatgaagg tgcagaacaa tagcgtgatc      900
atcaactgcg atggcttcta cctgatcagc ctgaagggct atttttcca ggaagtgaat      960
atctctctgc actatcagaa ggatgaggag cctctgtttc agctgaagaa ggtgagatct     1020
gtgaacagcc tgatgggtgc ctccctgacc tacaaggaca aggtgtatct gaacgtgacc     1080
acagataata catctctgga cgatttccac gtgaacggcg gcgagctgat cctgatccac     1140
cagaatcccg gcgagttttg cgtgctgtga                                     1170
  
```

10 <210> 32
 <211> 969
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

15 <400> 32

ES 2 841 300 T5

atgcagctga agtgtccatg ctctgtgtcc ctgggaacaa gacagcccgt ctggaagaaa	60
ctgcacgtga gctccggctt ctttagcggc ctggggctgt ttctgtgct gctgtctagt	120
ctgtgcgccg ctccgcaga gactgaagtc ggagccatgg tgggcagtaa cgtggtcctg	180
tcatgcatcg acccacaccg acggcatttc aacctgtctg gcctgtacgt gtattggcag	240
attgagaatc ccgaagtgtc agtcacctac tatctgcctt acaagagccc agggatcaac	300
gtggactcaa gctataaaaa tagggggcac ctgtccctgg attctatgaa gcagggaac	360
ttcagcctgt acctgaaaaa tgtgacctct caggacacac aggagttcac ttgtcgcgtc	420
tttatgaaca ctgcaaccga actgggtgaag attctggagg aagtggccg gctgagagtc	480
gcagccaact ttagcactcc tgtgatctct accagtatt cctctaatac aggccaggag	540
cggacatata cttgcatgtc taagaacgga taccgccaac ctaatctgta ttggatcaac	600
accacagaca atagtctgat tgataccgct ctgcagaaca atacagtcta cctgaacaag	660
ctggggctgt atgacgtgat ctctactctg cggtgccat ggaccagtag aggagatgtg	720
ctgtgctgcg tggagaacgt ggccctgcac cagaatatca cctcaattag ccaggctgag	780
tcctttaccg gcaacaatac aaagaatcct caggagacac ataacaatga actgaaagtg	840
ctgggtgccag tgctggccgt cctggctgca gcagctttcg tgtcttttat catctacaga	900
aggacccgcc ctcaccgctc atacactgga cctaagaccg tgcagctgga actgacagac	960
catgcttga	969

<210> 33
 <211> 909
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 33

ES 2 841 300 T5

atgcgtctgg gttcacctgg tctgctgttt ctgctgtttt caagtctgcg tgctgatact	60
caggagaagg aagtcggggc tatggtcgga agtgacgtgg agctgtcatg cgcttgtccc	120
gaagggtccc ggttcgacct gaacgatgtc tacgtgtatt ggcagacctc tgagagtaag	180
accgtggtca cataccacat ccctcagaac tccagcctgg aaaatgtgga ttcaaggat	240
cggaacagag ccctgatgtc ccctgctggc atgctgcggg gagacttctc tctgagactg	300
tttaatgtga caccacagga tgagcagaaa ttccattgcc tggtcctgtc acagtccctg	360
ggatttcagg aggtgctgag tgtcgaagtg actctgcacg tcgccgctaa tttctccgtg	420
cctgtggtca gcgcaccaca tagccctctc caggacgagc tgacctttac atgtacttcc	480
atcaacggct acccccgccc taacgtgtac tggattaaca agactgacaa tagcctgctg	540
gatcaggcac tgcagaacga caccgtgttt ctgaatatgc gaggactgta cgatgtggtc	600
agcgtcctgc gtattgccag gaccccatct gtgaacatcg ggtgctgtat tgagaacgtc	660
ctgctgcagc agaatctgac agtggggagc cagactggta atgacatcgg cgagagggat	720
aagattaccg aaaaccccggt gagtacaggc gagaagaacg cagccacatg gtcaatcctg	780
gctgtgctgt gcctgctggt ggtcgtggct gtcgcaattg gctgggtgtg ccgcgatcgg	840
tgtctgcagc actcttatgc cggctgcttg gcagtgagtc cagagactga actgaccggc	900
catgtctaa	909

<210> 34
 <211> 1574
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

<400> 34

ES 2 841 300 T5

cttaagatgg aaactgatac tctgctgctc tgggtgctgc tcctctgggt gcctgggttca	60
actggggaca ttogacgggc tgacattgtg atgaccacaga ccacactgag cctgcccgtg	120
tccctgggag accaggccag catctcctgc cggagctccc agtctatcgt gcacagcaac	180
ggaaacacat acctggagtg gtatctgcag aagcctggcc agtccccaaa gctgctgac	240
tacaaggtgt ccaacaggtt cagcggcgtg cctgaccgct tttctggaag cggctccgga	300
acagatttca ccctgaagat cagcagggtg gaggtgagg acctgggctg gtactactgc	360
ttccagggat cccacgtgcc ttacacctt ggcgagggca caaagctgga gatcaagaga	420
gccgatgctg ctccaaccgt gtctggaagc ggaggcgggg gttctggagg cgggtgggagc	480
ggtggcgagg ggtctgaggc taagctgcag gagagcggcc ccgtgctggt gaagcctgga	540
gccagcgtga agatgtcctg taaggcttct ggatacacct tcacagacta ctacatgaac	600
tgggtgaagc agagccacgg caagtccctg gagggtatcg gaggatcaa cccttacaac	660
ggcgacacct cttacaacca gaagtttaag ggcaaggcca ccctgacagt ggataagtct	720
agctccaccg cttacatgga gctgaacagc ctgacatccg aggattctgc cgtgtactac	780
tgtgctaggt actacggaag ctggttcgcc tactggggcc agggaaact gatcacctg	840
tccacagcca agaccacacc ccctagcgtg taccacctgg ctccctaggtc tagcagaggc	900
tgcaagccat gcatctgtac cgtgcccgag gtgagcagcg tggtcatctt tccacccaag	960
cccaaggacg tgctgaccat cacactgacc cctaaggatga catgcgtggt ggtggatata	1020
agcaaggacg atccagaggt gcagttctcc tggtttgtgg acgatgtgga ggtgcacacc	1080
gccagacac agccaaggga ggagcagttc aactccacct ttagatccgt gtctgagctg	1140
cccatcatgc accaggactg gctgaacgga aaggagttca agtgccgggt gaactccgcc	1200
gcttttcctg ctccaatcga gaagaccatc tctaagacaa agggccgccc aaaggctcca	1260
cagggtgtaca ccatccctcc acccaaggag cagatggcta aggataagg gagcctgacc	1320
tgtatgatca cagacttctt tcccgaggat atcacagtgg agtggcagtg gaacggacag	1380
cctgccgaga actacaagaa caccagcca atcatggaca cagatggctc ttacttcgtg	1440
tacagcaagc tgaacgtgca gaagtctaac tgggaggctg gcaacacctt cacctgcagc	1500
gtgctgcacg aaggtctcca taatcaccac accgaaaaga gcctcagtca cagccctggg	1560
aatgaggcg cgcc	1574

<210> 35
 <211> 1484
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 35

ES 2 841 300 T5

```

cttaagatgg aaactgacac cctgctgctg tgggtcctgc tgctgtgggt gcctggatcc      60
accggcgata tcgtgctgac ccagtctcct ggcacactga gtctgtcacc aggggagcga      120
gcaacactgt cttgtagagc cagccagtct gtggaagct cctacctggc ttggtatcag      180
cagaagccag gccaggcacc caggctgctg atctacggag ccttcagccg ggccactggc      240
attccagaca ggttctctgg aagtggctca gggaccgact tcacctgac catcagccga      300
ctggagcccc aagacttcgc cgtgtactat tgccagcagt acggtctag tccttggact      360
tttgacagg gcaccaaagt ggagatcaag cgcggcgggg gaggtctctg gggaggcggg      420
agtggaggcg ggggatcaca ggtccagctg gtggaagcg gcgggggagt ggtccagcca      480
ggccggagcc tgcggctgag ctgcgcgct tcaggattca cattttcaag ctataccatg      540
cactgggtcc ggcaggcacc aggaagga ctggagtggg tgaccttcat cagctatgac      600
ggcaacaaca agtattacgc tgattccgtg aaagggaggt ttaccattag ccgcgacaac      660
tccaaaaata cactgtacct gcagatgaac agcctgcggg ccgaggatac tgctatctac      720
tattgcgcaa gaaccgggtg gctgggaccc ttcgactatt ggggccaggg gactctggtc      780
accgtgtcct ctgataagac acacacatgc cctccctgtc ctgcaccaga gctgctgggc      840
gggccatccg tgttcctggt tccaccaag cctaaagaca ccctgatgat cagccggaca      900
cctgaagtca cttgcgtggt cgtggacgtg agtcacgagg atccagaagt caagtttaac      960
tggtacgtgg atggcgctga ggtgcataat gccaagacca aacctcgca ggaacagtac     1020
aatagcacat atcgagtcgt gtccgtcctg actgtgctgc atcaggattg gctgaacggc     1080
aaagagtata agtgcaaagt gagcaataag gcactgcctg cccaatcga gaaaacaatt     1140
tccaaggcta aaggccagcc cagggaacct caggtgtaca ctctgcctcc aagtcgagag     1200
gaaatgacca agaaccagggt gagcctgacc tgtctggtga aagggttcta tccatcagac     1260
attgcagtgg agtgggaaag caatggacag ccgaaaaca attacaagac cacacccct     1320
gtgctggaca gcgatggctc cttctttctg tattctaagc tgactgtgga taaaagtcgc     1380
tggcagcagg ggaacgtctt tagctgttcc gtgatgcatg aggtctctga caatcattac     1440

acacagaagt ctctgagtct gtcacccggc aaatgaggcg cgcc                        1484

```

<210> 36
 <211> 632
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> promotor CMV

<400> 36

ES 2 841 300 T5

		gttgacattg attattgact agttattaat agtaatcaat tacggggtca ttagttcata	60
		gcccataatat ggagttccgc gttacataac ttacggtaaa tggcccgctt ggctgaccgc	120
		ccaacgaccc ccgcccattg acgtcaataa tgacgtatgt tcccatagta acgccaatag	180
		ggacttttcca ttgacgtcaa tgggtggagt atttacggta aactgccac ttggcagtac	240
		atcaagtgtg tcatatgccg agtacgcccc ctattgacgt caatgacggg aaatggcccc	300
		cctggcatta tgcccagtac atgaccttat gggactttcc tacttggcag tacatctacg	360
		tattagtcat cgctattacc atgggtgatgc ggttttggca gtacatcaat gggcgtggat	420
		agcggtttga ctacgaggga ttccaagtc tccaccccat tgacgtcaat gggagtgtgt	480
		tttggcacca aaatcaacgg gactttccaa aatgtcgtaa caactccgcc ccattgacgc	540
		aaatggggcg taggcgtgtg cgggtggagg tctatataag cagagctctc tggctaacta	600
		gagaaccac tgcttactgg ctatcgaaa tt	632
5	<210> 37 <211> 394 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
10	<220> <223> promotor RSV <400> 37		
		tgtacgggccc agatatacgc gtatctgagg ggactagggt gtgtttaggc gaaaagcggg	60
		gcttcgggtg tacgcggtta ggagtcccct caggatatag tagtttcgct ttgcatagg	120
		gagggggaaa tgtagtotta tgcaatacac ttgtagtctt gcaacatggt aacgatgagt	180
		tagcaacatg ccttacaagg agagaaaaag caccgtgcat gccgattggt ggaagtaagg	240
		tggtacgatc gtgccttatt aggaaggcaa cagacaggtc tgacatggat tggacgaacc	300
		actgaattcc gcattgcaga gataattgta ttaagtgcc tagctcgata caataaacgc	360
		catttgacca ttcaccacat tgggtgtcac ctcc	394
15	<210> 38 <211> 188 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
20	<220> <223> poliA de BGH <400> 38		
		ctgtgccttc tagttgccag ccatctgttg tttgcccctc ccccgctgct tccttgaccc	60
		tgggaagggtc cactcccact gtcccttccct aataaaatga ggaaattgca tcgcattgtc	120
		tgagtaggtg tcattctatt ctgggggggtg ggggtgggca ggacagcaag ggggaggatt	180
25		gggaagac	188
30	<210> 39 <211> 249 <212> ADN <213> Secuencia artificial		

ES 2 841 300 T5

	<220>		
	<223> poliA tardío de SV40		
	<400> 39		
5		gacatgataa gatacattga tgagtttggg caaaccacaa ctagaatgca gtgaaaaaaa	60
		tgctttattt gtgaaatttg tgatgctatt gctttatttg tgaaatttgt gatgctattg	120
		ctttatttgt aaccattata agctgcaata aacaagttaa caacaacaat tgcattcatt	180
		ttatgtttca ggttcagggg gaggtgtggg aggtttttta aagcaagtaa aacctctaca	240
		aatgtggta	249
	<210> 40		
	<211> 345		
10	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> promotor potenciador de SV40		
15		<400> 40	
		gctgtggaat gtgtgtcagt tagggtgtgg aaagtcccca ggctcccag caggcagaag	60
		tatgcaaagc atgcatctca attagtcagc aaccagggtg ggaaagtccc caggctcccc	120
		agcaggcaga agtatgcaaa gcatgcatct caattagtca gcaaccatag tcccgccct	180
		aactccgcc atcccgcctc taactccgcc cagttccgcc cattctccgc cccatggctg	240
		actaattttt tttatttatg cagaggccga ggccgcctcg gcctctgagc tattccagaa	300
		gtagtgagga ggcttttttg gaggcctagg cttttgcaaa aagct	345
20	<210> 41		
	<211> 99		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
25	<220>		
	<223> poliA de beta-globina de conejo		
	<400> 41		
		gacctctggc taataaagga aattttattt cattgcaata gtgtgttggg attttttgtg	60
30		tctctcactc ggaaggacat atgggagggc aaatcattt	99
	<210> 42		
	<211> 723		
	<212> ADN		
35	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> GFP		
40	<400> 42		

ES 2 841 300 T5

```

accatgggtga gcaagggcga ggagctgttc accgggggtgg tgcccatcct ggtcgagctg      60
gacggcgacg taaacggcca caagttcagc gtgtccggcg agggcgaggg cgatgccacc      120
tacggcaagc tgaccctgaa gtcatctgc accaccggca agctgcccggt gccctggccc      180
accctcgtga ccaccctgac ctacggcgtg cagtgttca gccgctaccg cgaccacatg      240
aagcagcacg acttcttcaa gtccgccatg cccgaaggct acgtccagga gcgcaccatc      300
ttcttcaagg acgacggcaa ctacaagacc cgcgcggagg tgaagttcga gggcgacacc      360
ctggtgaacc gcacgagct gaagggcatc gacttcaagg aggacggcaa catcctgggg      420
cacaagctgg agtacaacta caacagccac aacgtctata tcatggccga caagcagaag      480
aacggcatca aggtgaactt caagatccgc cacaacatcg aggacggcag cgtgcagctc      540
gccgaccact accagcagaa ccccccatc ggcgacggcc ccgtgctgct gcccgacaac      600
cactacctga gcaccagtc cgcctgagc aaagacccca acgagaagcg cgatcacatg      660
gtcctgctgg agttcgtgac cgcgcggggg atcactctcg gcattggacga gctgtacaag      720
taa                                                                 723

```

<210> 43
 <211> 454
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> LTR MoMuLV

<400> 43

```

ttaattaagt aacgccattt tgcaaggcat ggaaaaatac ataactgaga atagagaagt      60
tcagatcaag gtcaggaaca gatggaacag ctgaatatgg gccaaacagg atatctgtgg      120
taagcagttc ctgcccgggc tcagggccaa gaacagatgg aacagctgaa tatgggccaa      180
acaggatatc tgtggttaagc agttcctgcc ccgggtcagg gccagaaca gatggtcccc      240
agatgcggtc cagccctcag cagtttctag agaaccatca gatgtttcca gggtgcccca      300
aggacctgaa atgacctgt gccttatttg aactaaccaa tcagttcgtt tctcgtttct      360
gttcgcgcgc ttctgtctcc cgagctcaat aaaagagccc acaaccctc actcggggcg      420
ccagtcctcc gattgactga gtcgcccgtt taag                                                                 454

```

<210> 44
 <211> 1349
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Promotor EFlalfa

<400> 44

ES 2 841 300 T5

ttaattaaga gtaattcata caaaaggact cgccctgcc ttggggaatc ccagggaccg	60
tcgttaaact ccactaacg tagaaccag agatcgctgc gttcccgccc cctcaccgc	120
ccgctctcgt catcactgag gtggagaaga gcatgcgtga ggctccggtg ccgctcagtg	180
ggcagagcgc acatcgccca cagtccccga gaagtgggg ggaggggtcg gcaattgaac	240
cggcgcttag agaaggtggc gcggggtaaa ctgggaaagt gatgcgtgt actggctccg	300
cctttttccc gaggggtggg gagaaccgta tataagtga gtagtcgcc tgaacttct	360
ttttcgcaac gggtttgccg ccagaacaca ggtaagtgc gtgtgtggtt ccgcggggc	420
tggcctcttt acgggttatg gcccttgctg gccttgaatt acttcacgc ccctggctgc	480
agtacgtgat tcttgatccc gagcttcggg ttggaagtgg gtgggagagt tcgaggcctt	540
gcggtaagg agcccttcg cctcgtgctt gaggtaggc ctggcttgg cgctggggc	600
gccgcgtgc aatctggtg caccttcgc cctgtctgc tgccttcgat aagtctctag	660
ccatttaaaa tttttgatga cctgctgcga cgctttttt ctggcaagat agtctttaa	720
atgcgggcca agatctgcac actgggtatt cggtttttg ggccggggc ggcgacggg	780
cccgtgcgtc ccagcgaca tgttcggcga ggcggggcct gcgagcgcg ccaccgagaa	840
tcggacgggg gtagtctcaa gctggccggc ctgctctggt gcctggcctc gcgccgcgt	900
gtatcgcccc gccctggcg gcaaggctgg ccggtcggc accagttgcg tgagcggaaa	960
gatggccgct tcccggccct gctgcaggga gctcaaatg gaggacgcgg cgctcgggag	1020
agcgggcggg tgagtcaccc acacaaagga aaaggccctt tccgtcctca gccgtcgtt	1080
catgtgactc cacggagtac cgggcgcgt ccaggcacct cgattagttc tcgagctttt	1140
ggagtacgtc gtctttaggt tggggggagg ggttttatgc gatggagttt cccacactg	1200
agtgggtgga gactgaagtt aggccagctt ggcacttgat gtaattctcc ttggaatttg	1260
ccctttttga gtttgatct tggttcatc tcaagcctca gacagtgggt caaagttttt	1320
ttcttcatt tcaggtgtcg tgacttaag	1349

<210> 45

<211> 481

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> poliA de HGH

<400> 45

ES 2 841 300 T5

gacgggtggc atccctgtga cccctcccca gtgcctctcc tggccctgga agttgccact	60
ccagtgccca ccagccttgt cctaataaaa ttaagttgca tcattttgtc tgactagggtg	120
tcctttctata atattatggg gtggaggggg gtggtatgga gcaaggggca agttgggaag	180
acaacctgta gggcctgcgg ggtctattgg gaaccaagct ggagtgcagt ggcacaatct	240
tggctcaactg caatctccgc ctccctgggtt caagcgattc tcctgcctca gcctcccgag	300
ttgttgggat tccaggcatg catgaccagg ctgagctaat tttgttttt ttggtagaga	360
cggggtttca ccatattggc caggctggtc tccaactcct aatctcaggt gatctacca	420
ccctggcctc ccaaattgct gggattacag gcgtgaacca ctgctccctt ccctgtcctt	480
t	481

REIVINDICACIONES

1. Un virus del herpes simple (VHS) oncolítico que comprende: (i) un gen que codifica la GM-CSF heteróloga; y (ii) un gen que codifica la molécula activadora de la vía inmunitaria coestimuladora heteróloga, en donde el virus es competente de replicación en tejido tumoral, cada gen está bajo el control de una secuencia de promotor, y la molécula activadora de la vía inmunitaria coestimuladora es un ligando de CD40 (CD40L), ligando de ICOS, ligando de GITR, ligando de 4-1-BB, ligando de OX40, TL1A, ligando de CD30, CD27, ligando de flt3 o un inhibidor de CTLA-4.
2. El virus de la reivindicación 1, en donde el inhibidor de CTLA-4 es un anticuerpo de CTLA-4 o un fragmento del mismo.
3. El virus de la reivindicación 1 o 2, que además comprende un gen que codifica la proteína fusogénica.
4. El virus de la reivindicación 3, en donde la proteína fusogénica se selecciona del grupo que consiste en proteína G del virus de la estomatitis vesicular (VSV), sincitina 1, sincitina 2, proteína F del virus del simio 5 (SV5), proteína H del virus del sarampión (MV), proteína F del MV, proteína F del virus respiratorio sincicial (RSV), una glucoproteína del virus de la leucemia del mono gibón (GALV) que tiene el péptido transmembrana R mutado o eliminado (GALV-R-), virus de la leucemia de murino (MLV), virus del mono Mason-Pfizer (MPMV) o virus de anemia infecciosa equina (EIAV) de los que se ha delecionado el péptido R.
5. El virus de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que codifica más de una molécula activadora de la vía inmunitaria coestimuladora.
6. El virus de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que es:
 - (i) un VHS1; y/o
 - (ii) un VHS que:
 - (a) no expresa ICP34.5 funcional;
 - (b) no expresa ICP47 funcional; y/o
 - (c) expresa el gen US 11 como un gen temprano inmediato.
7. El virus de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que proviene de un aislado clínico de un virus.
8. El virus de la reivindicación 7, en donde el aislado clínico es VHS1

cepa RH018A que tiene el número de registro ECCAC 16121904;

cepa RH004A que tiene el número de registro ECCAC 16121902;

cepa RH031A que tiene el número de registro ECCAC 16121907;

cepa RH040B que tiene el número de registro ECCAC 16121908;

cepa RH015A que tiene el número de registro ECCAC 16121903;

cepa RH021A que tiene el número de registro ECCAC 16121905;

cepa RH023A que tiene el número de registro ECCAC 16121906; o

cepa RH047A que tiene el número de registro ECCAC 1612909.
9. El virus de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde:
 - (i) el virus es un VHS y el gen que codifica una GM-CSF un gen que codifica una molécula activadora de la vía inmunitaria coestimuladora se insertan en el locus que codifica ICP34.5, ya sea por inserción, o eliminación parcial o total, en una orientación espalda con espalda en relación entre sí, cada uno bajo control regulatorio separado; y/o
 - (ii) la secuencia de un gen que codifica la GM-CSF y/o la secuencia del gen que codifica una molécula activadora de la vía inmunitaria coestimuladora tiene un codón optimizado para aumentar los niveles de expresión en las células diana.
10. Un virus de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores que expresa:
 - (i) tres genes heterólogos, en donde cada uno de los tres genes heterólogos está impulsado por un promotor diferente seleccionado del promotor de CMV, el promotor de RSV, el promotor de SV40 y un promotor de LTR retroviral, en donde el promotor de LTR retroviral es opcionalmente de MMLV y/o cada uno de los tres genes heterólogos está terminado por una secuencia de poliadenilación diferente seleccionada de las secuencias de poliadenilación de BGH, SV40, HGH y RBG; o
 - (ii) cuatro genes heterólogos impulsados por cada uno del promotor de CMV, el promotor de RSV, el promotor de SV40 y un promotor de LTR retroviral, respectivamente, en donde el promotor de LTR retroviral es opcionalmente de MMLV y/o terminado por cada una de las secuencias de poliadenilación de BGH, SV40, HGH

y RBG, respectivamente.

11. Una composición farmacéutica que comprende un virus de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

12. El virus de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 para su uso en un método de tratamiento del cuerpo humano o animal mediante terapia.

13. El virus de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 para su uso en un método de tratamiento del cáncer.

14. El virus para su uso de acuerdo con la reivindicación 13, en donde el método comprende administrar un agente anticáncer adicional.

15. El virus para su uso de acuerdo con la reivindicación 14, en donde:

- (i) el agente anticáncer adicional se selecciona de un agente que se dirige a una ruta co-inhibitoria inmunitaria, tales como un inhibidor de CTLA-4, un inhibidor de PD-1, un inhibidor de PD-L1, un inhibidor de LAG-3, un inhibidor de TIM-3, un inhibidor de VISTA, un inhibidor de CSF1R, un inhibidor de IDO, un inhibidor de KIR, un inhibidor de SLAMF7, un inhibidor de CEACAM1 o uno de CD47, un agente dirigido a una ruta coestimuladora inmunitaria, tales como un agonista de GITR, un agonista de 4-1-BB, un agonista de OX40, un agonista de CD40 o un agonista de ICOS, radiación y/o quimioterapia, un agente que se dirige a una mutación genética específica que se produce en los tumores, un agente destinado a inducir una respuesta inmunitaria a uno o más antígeno o antígenos tumorales o neoantígeno o neoantígenos, un producto celular derivado de células T o linfocitos NK, un agente destinado a estimular el STING, cGAS, TLR u otra respuesta inmunitaria innata y/o ruta inflamatoria, un segundo virus opcionalmente un virus oncolítico y combinaciones de los mismos;
- (ii) el agente anticáncer adicional es un anticuerpo;
- (iii) el método comprende administrar un inhibidor de la ruta de la indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO) y un antagonista adicional de una ruta coinhibitoria inmunitaria o un agonista de una ruta coestimuladora inmunitaria;
- (iv) el virus y el agente o agentes anticancerosos adicionales se administran por separado o al mismo tiempo; y/o
- (v) el cáncer es un tumor sólido.

Figura 1

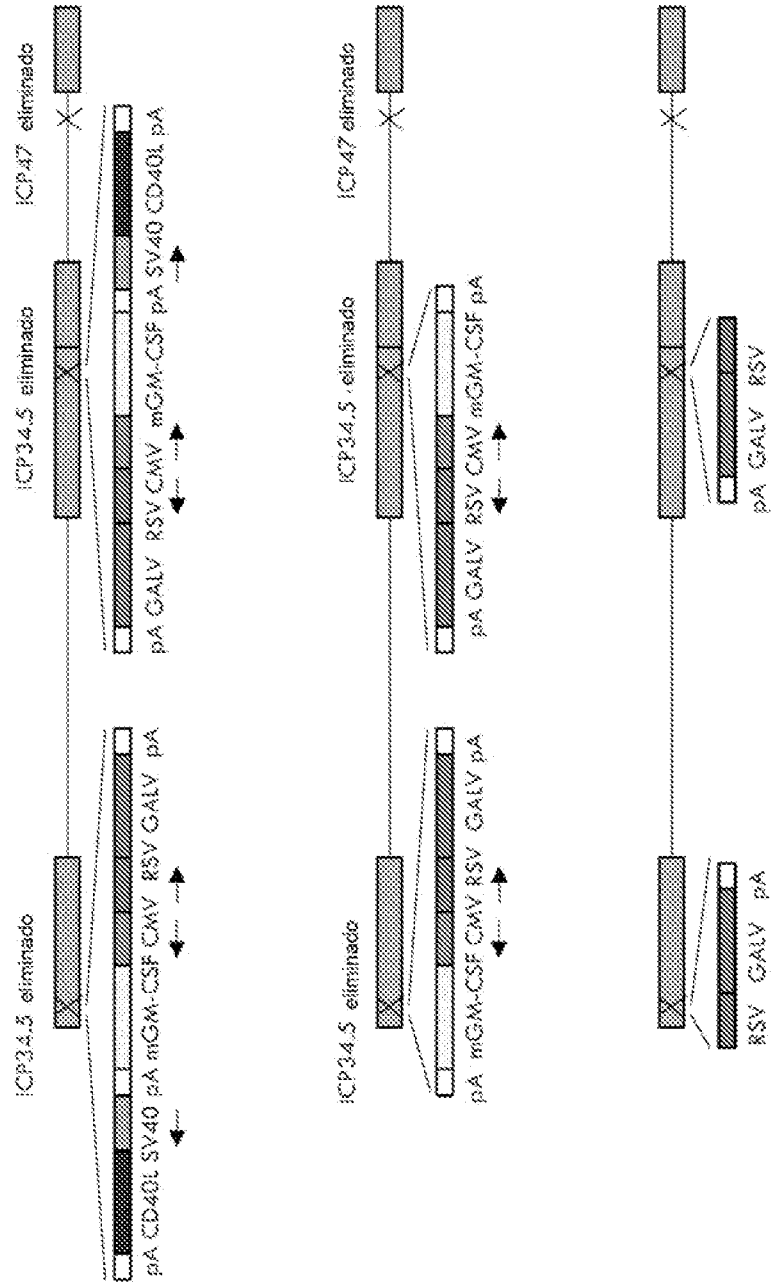


Figura 2

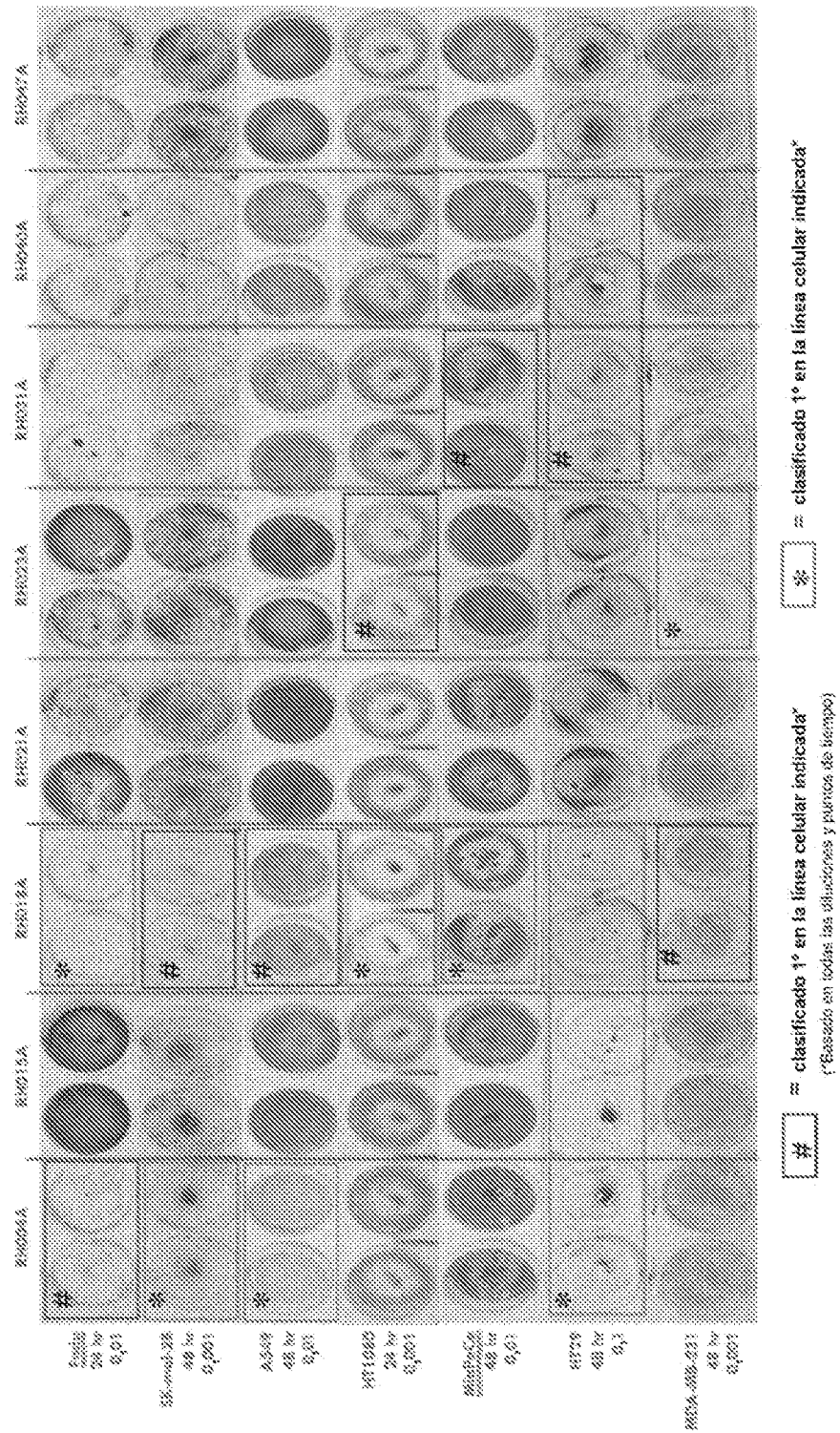


Figura 3

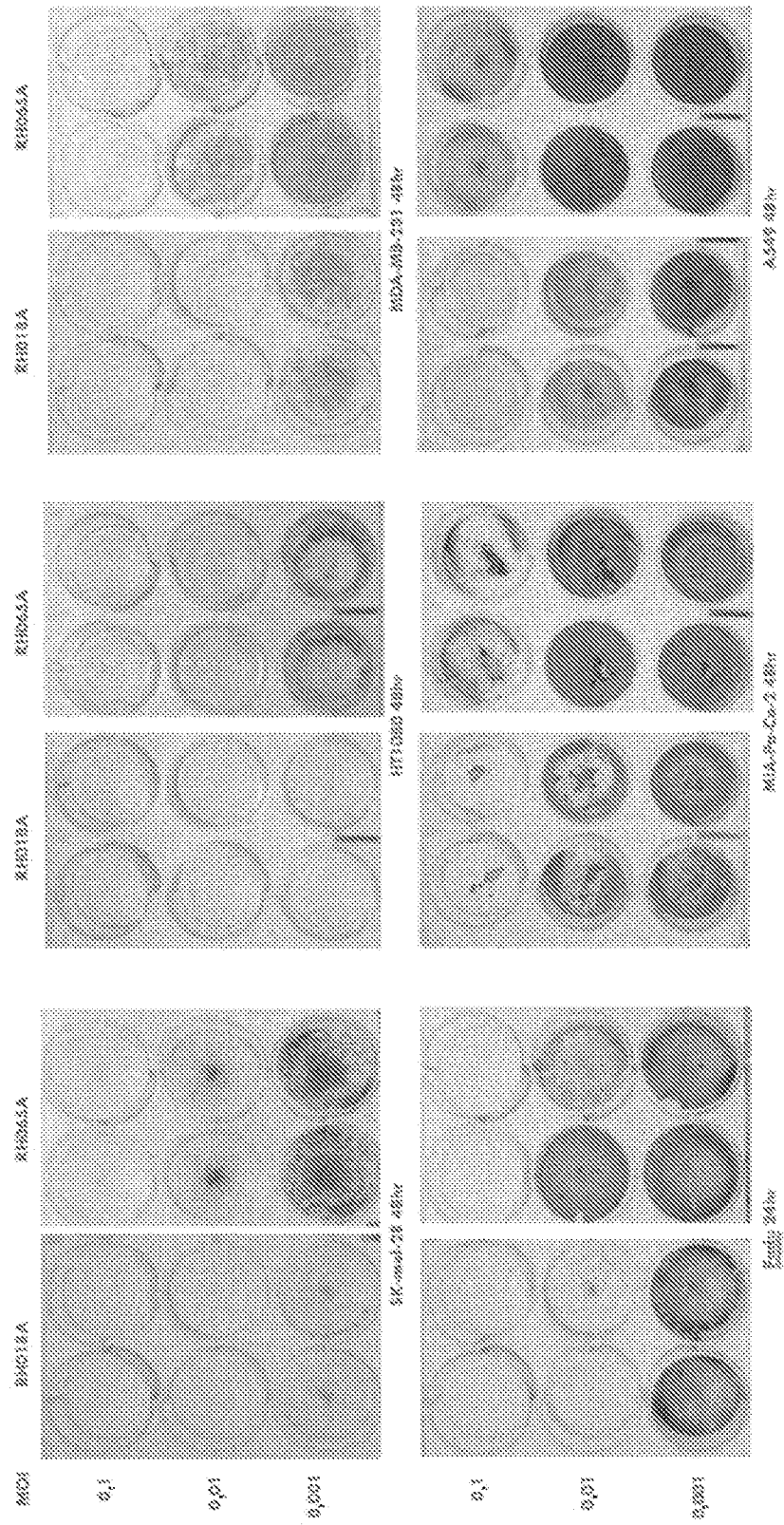


Figura 4A

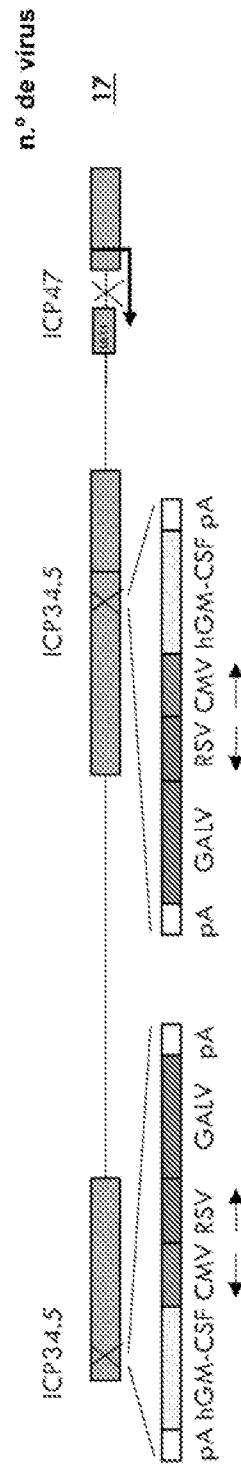


Figura 4B

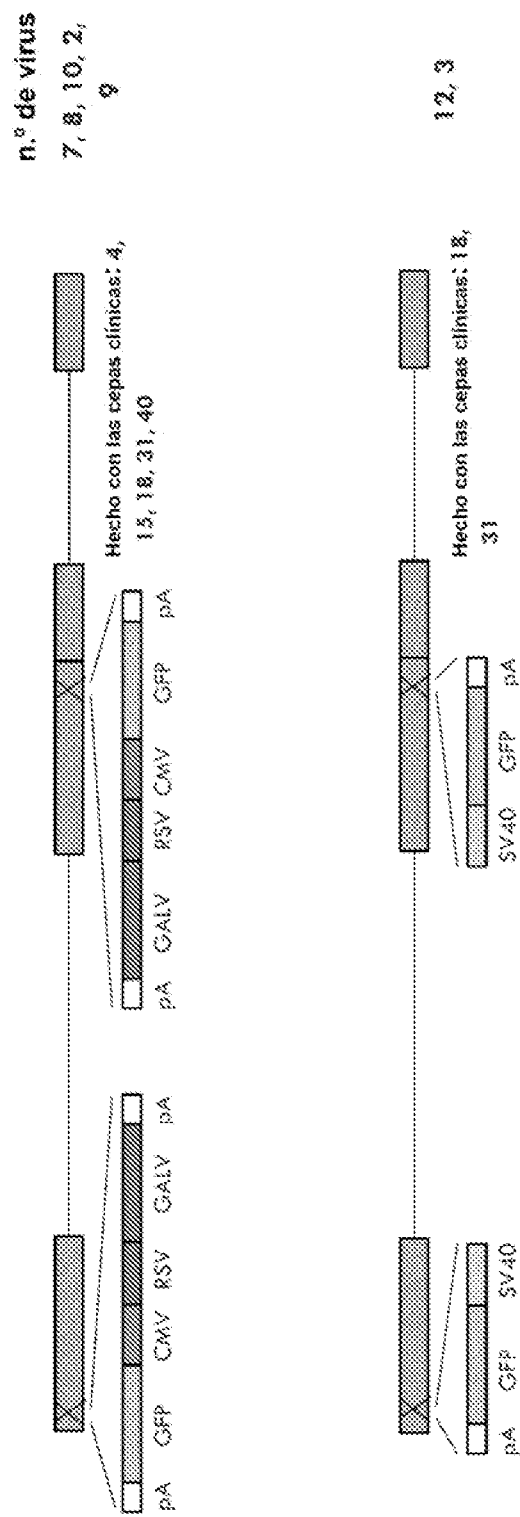


Figura 4C

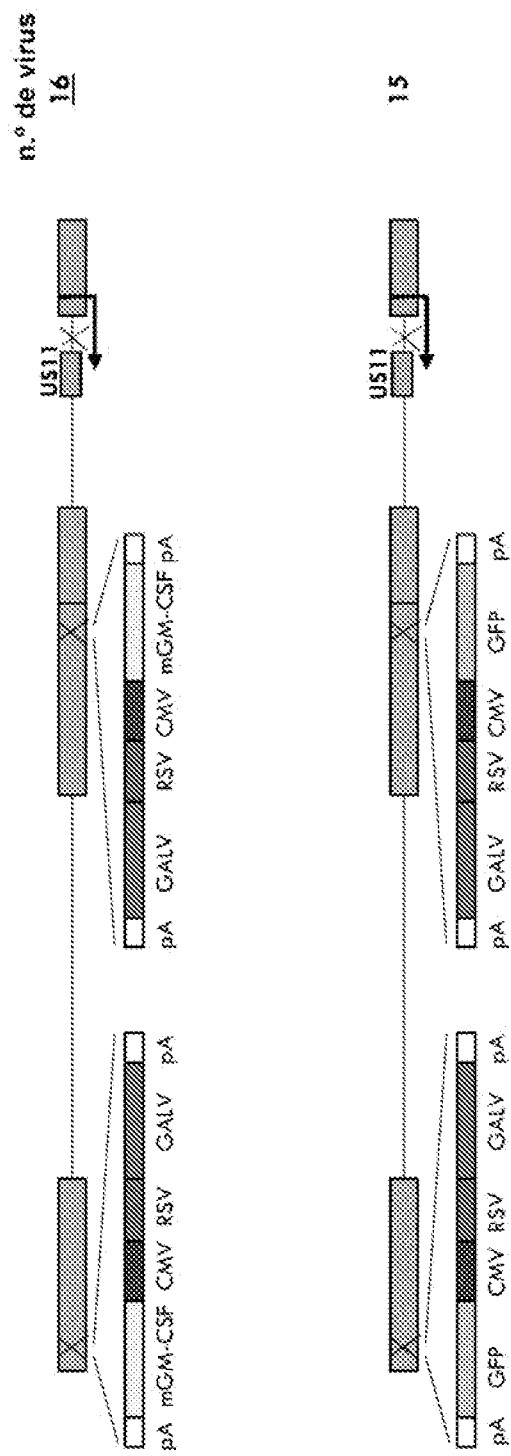
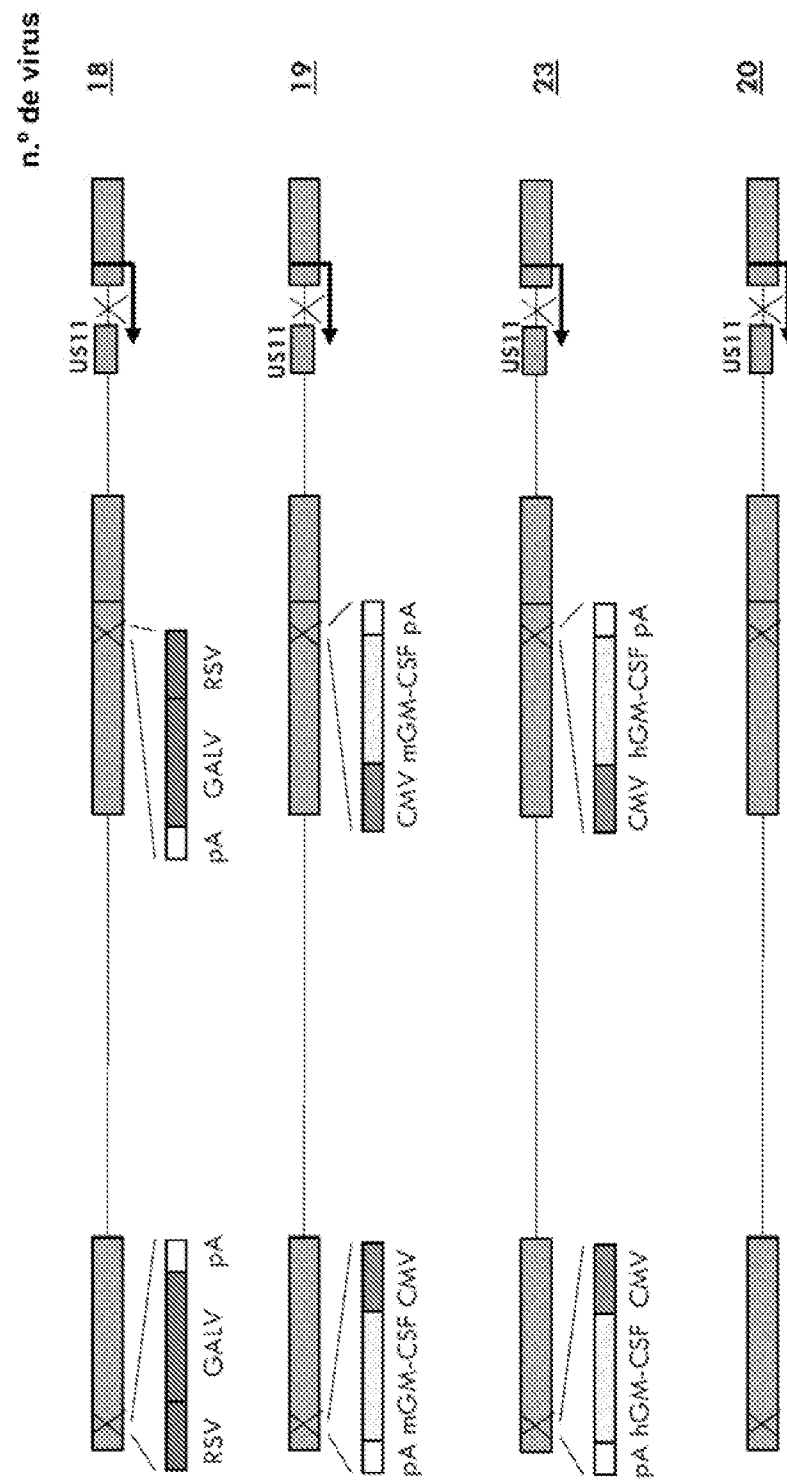
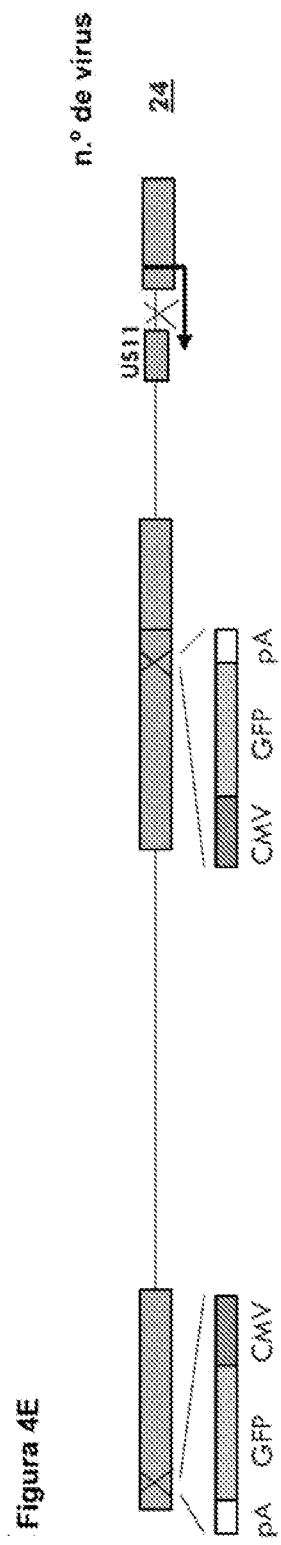


Figura 4D





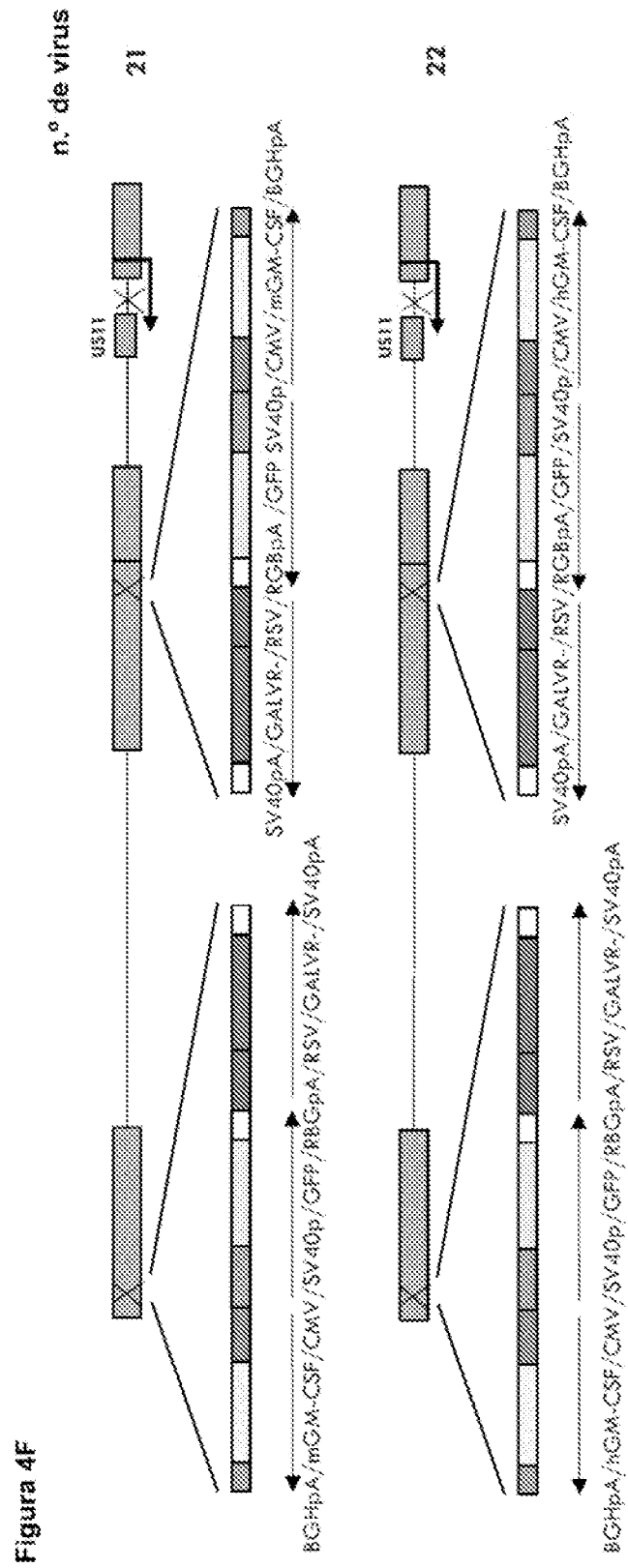


Figura 5A

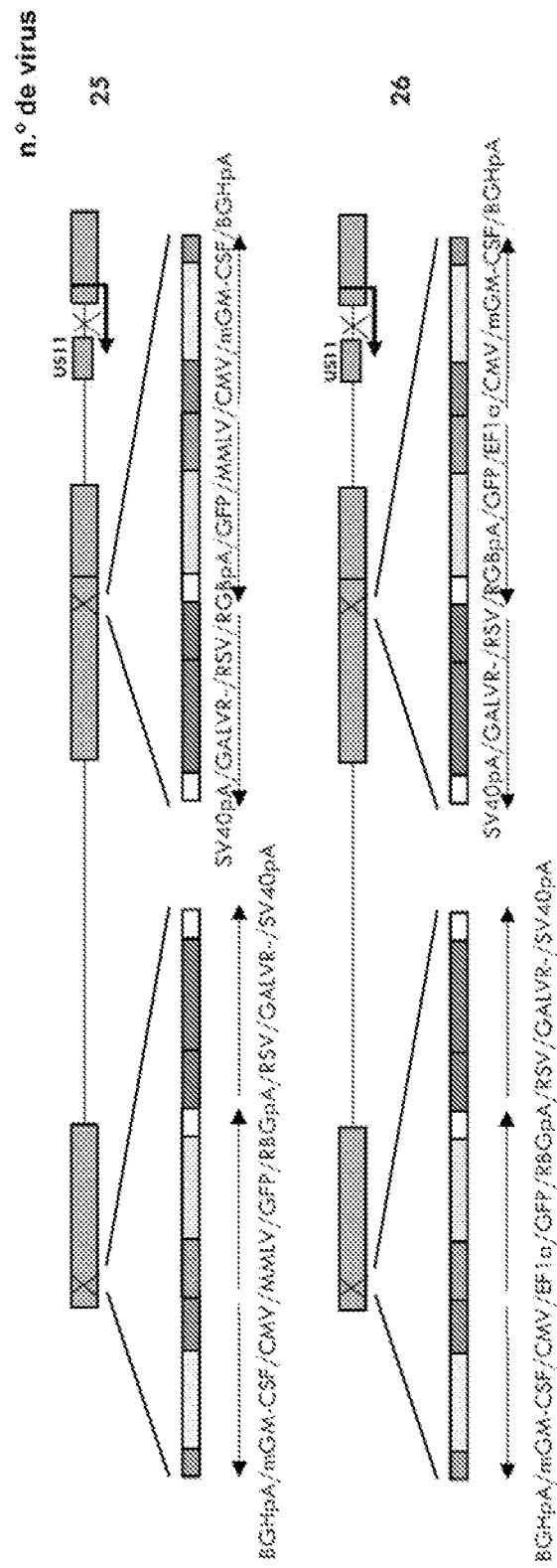
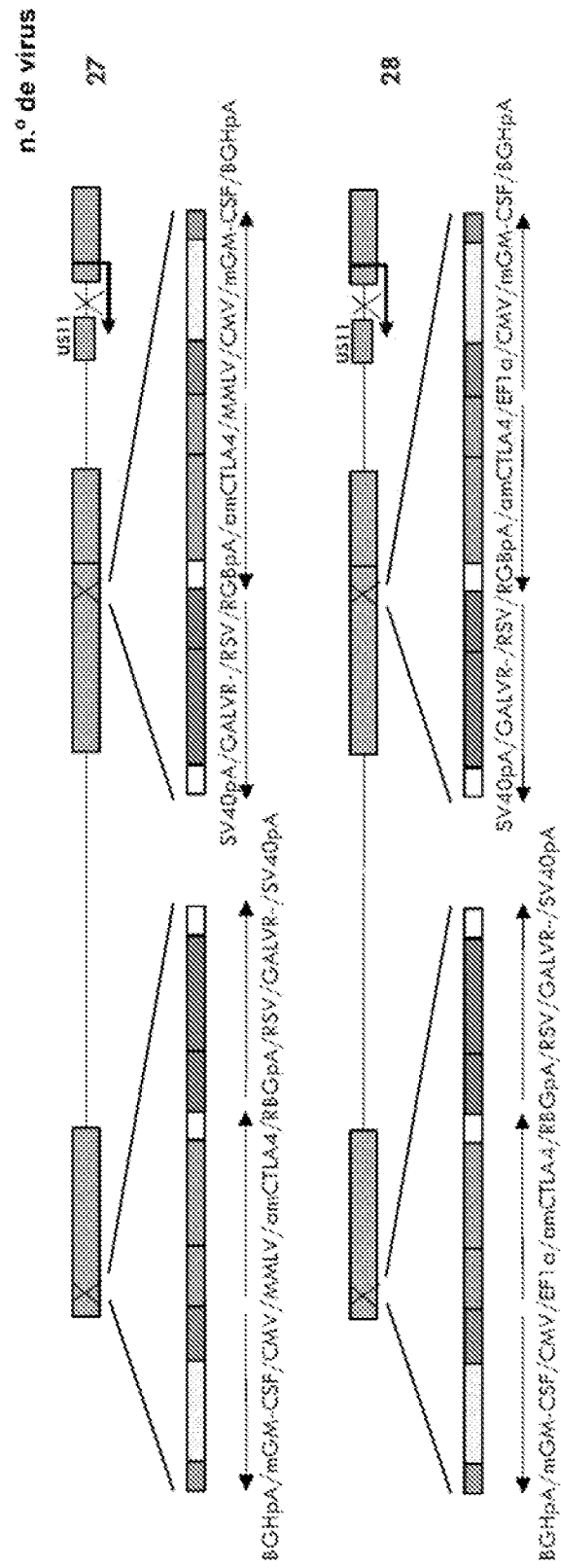
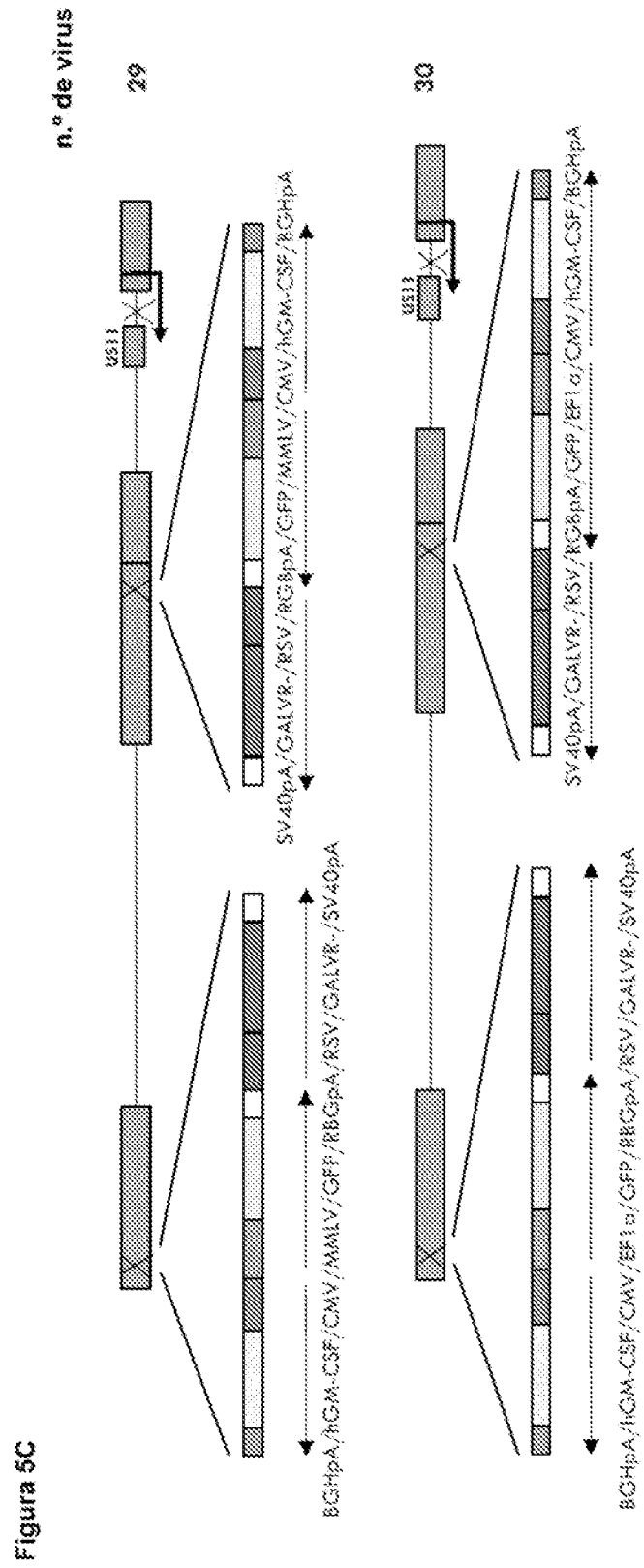
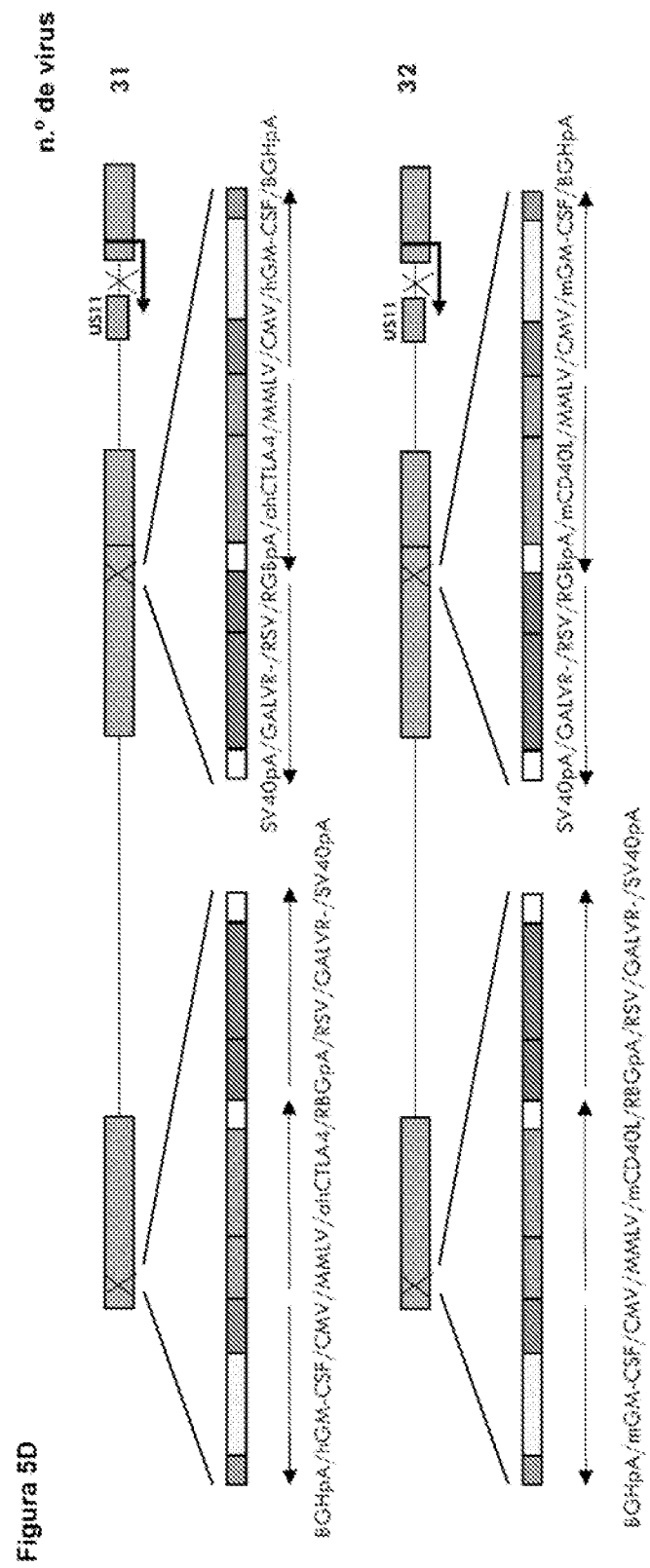
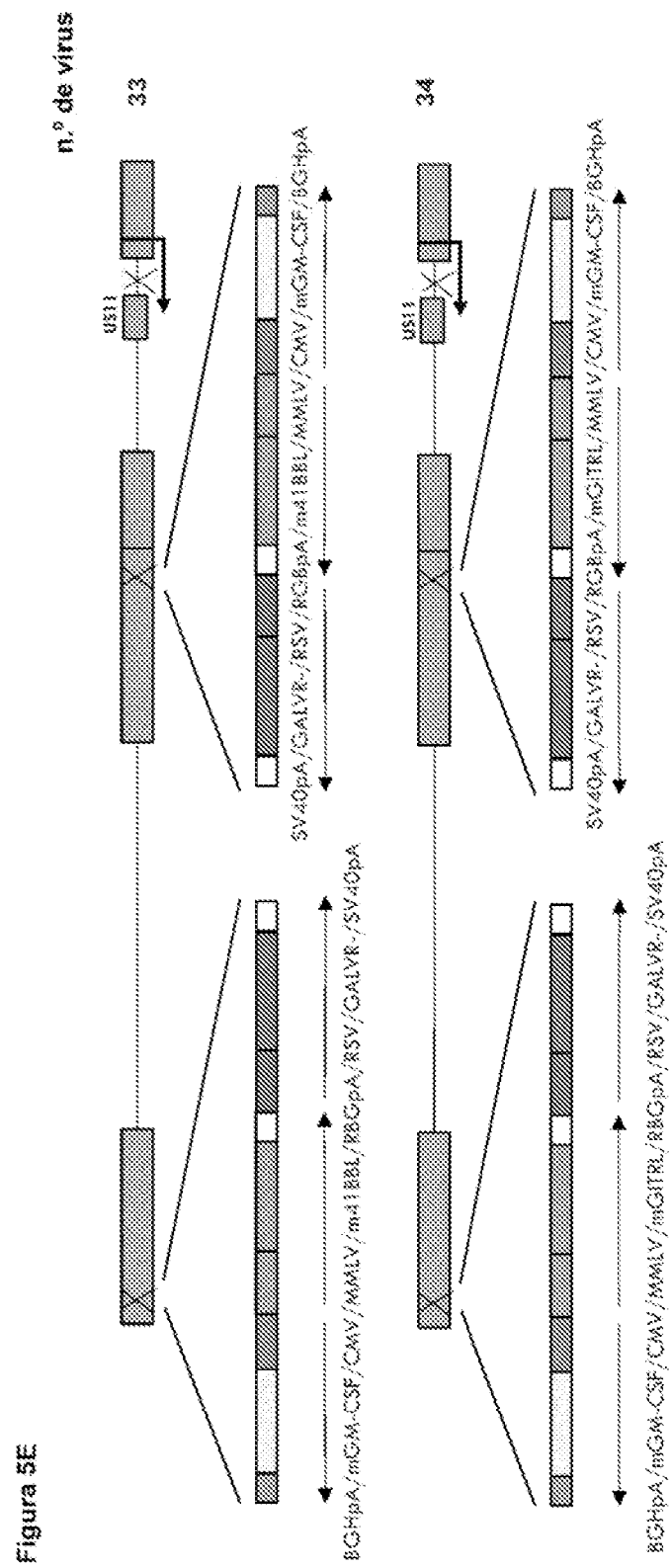


Figura 5B









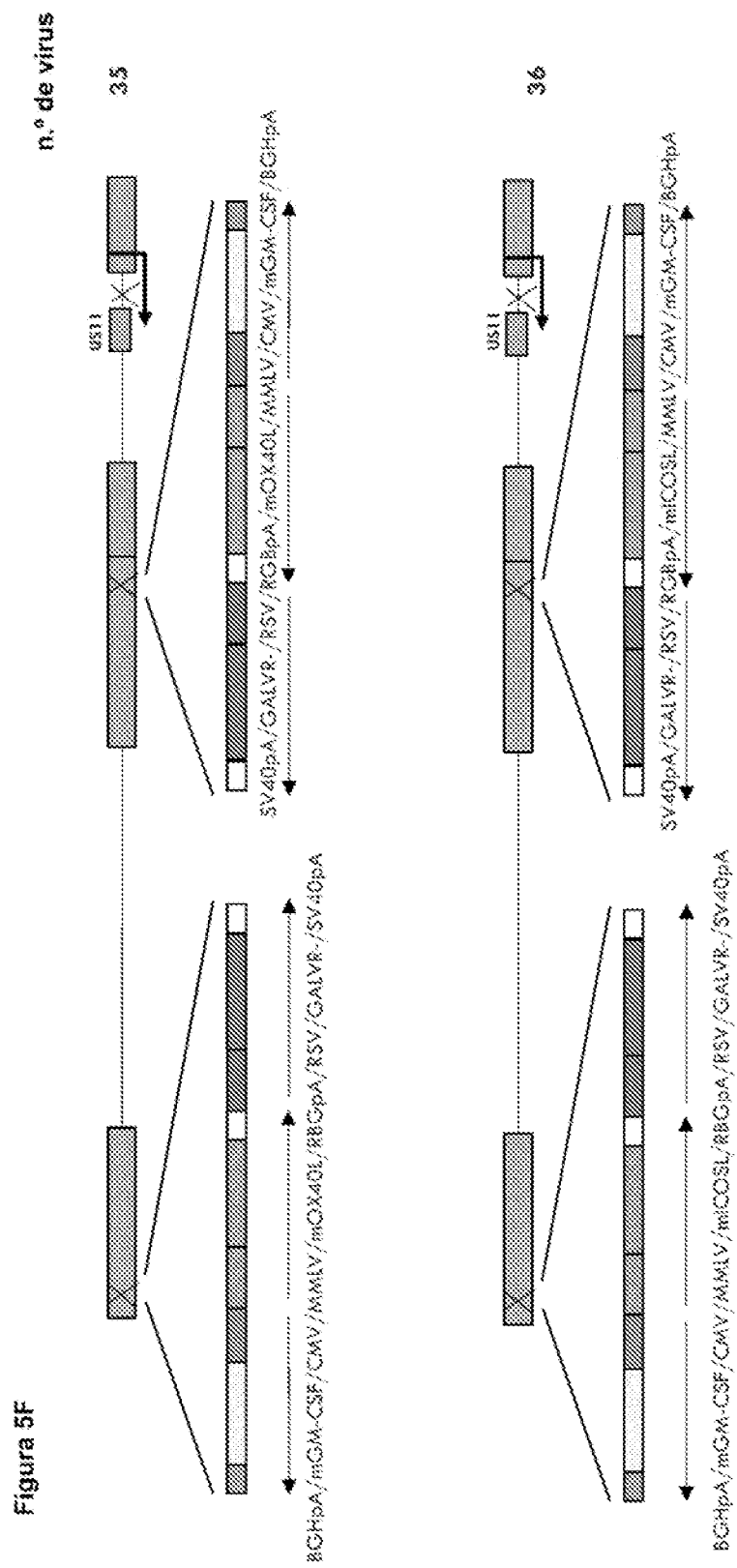


Figura 6

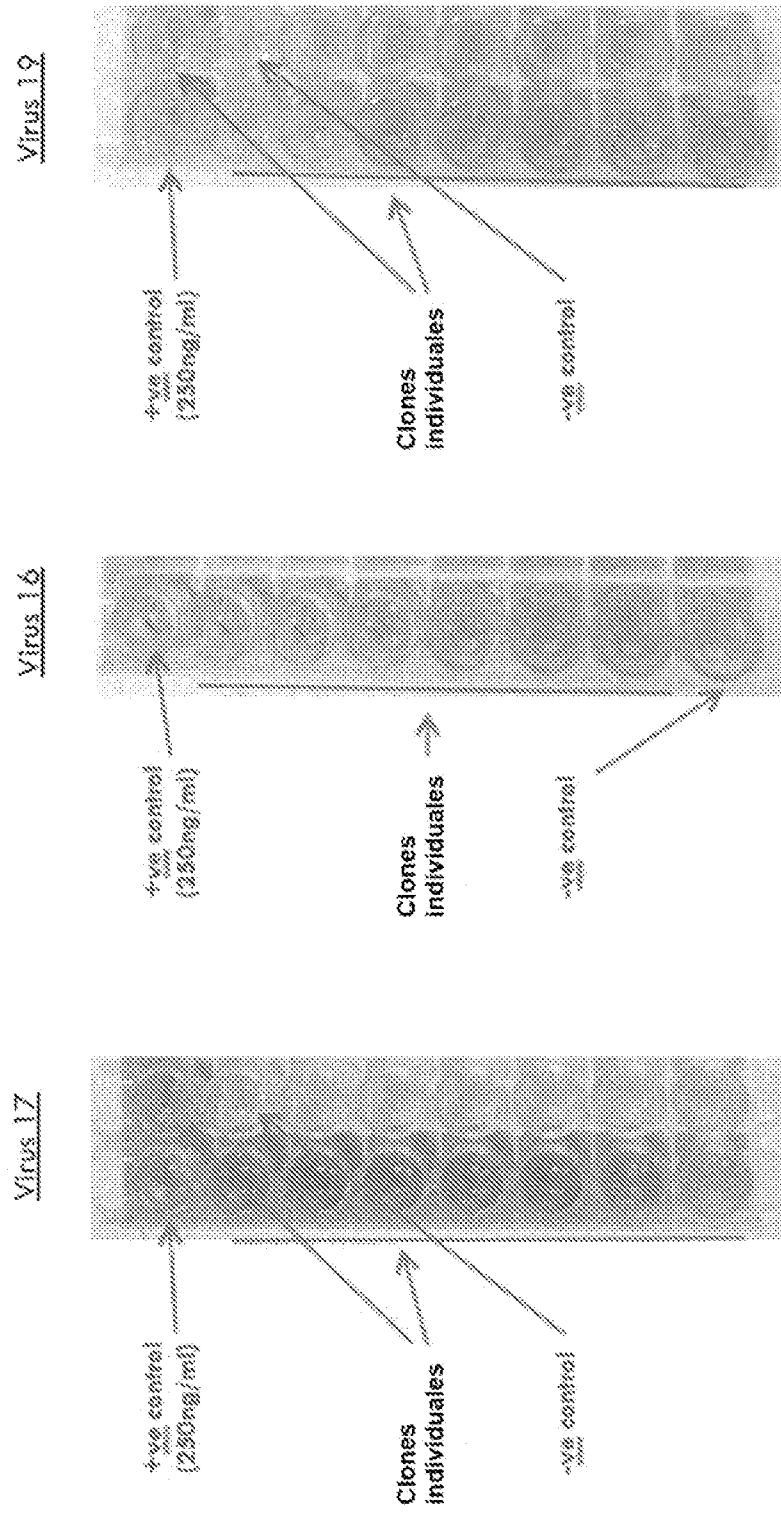


Figura 7A

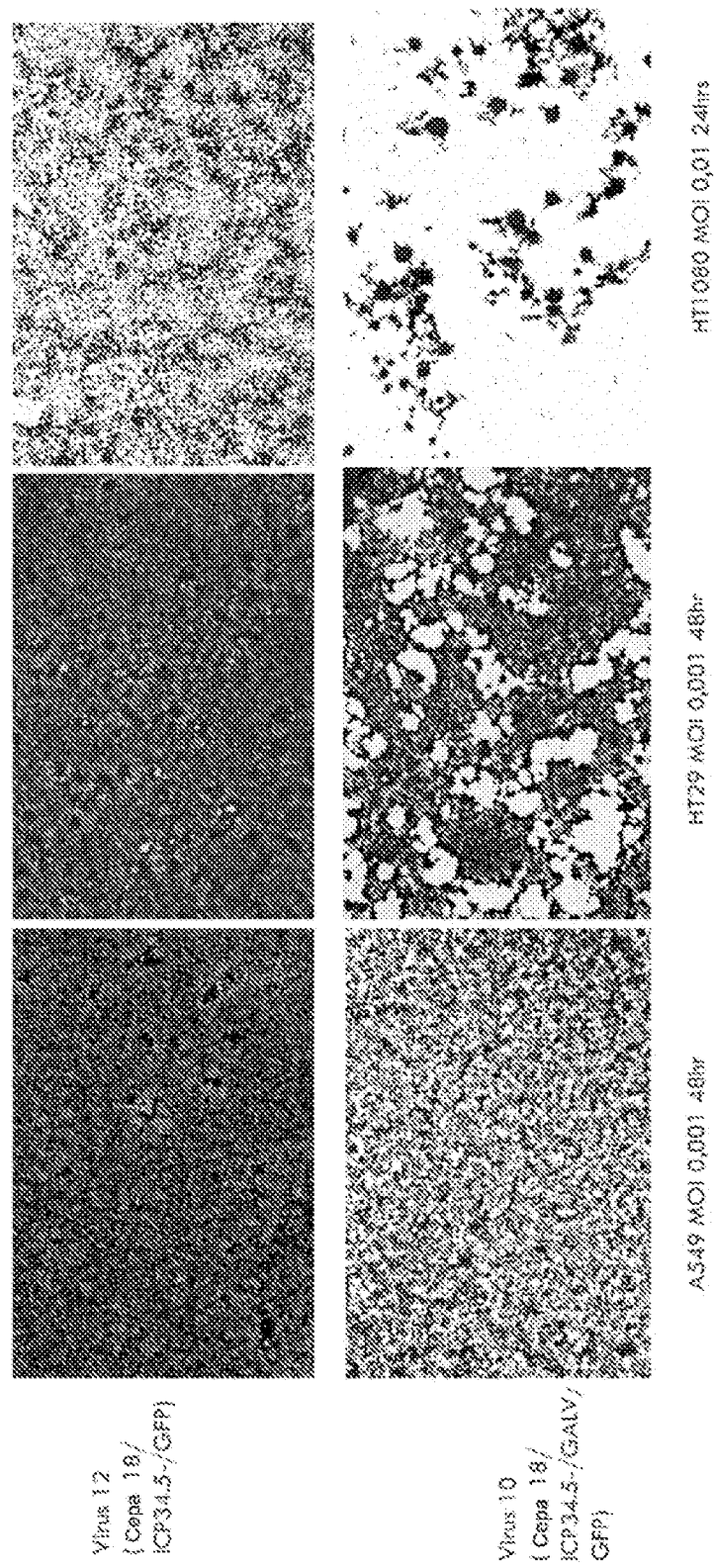
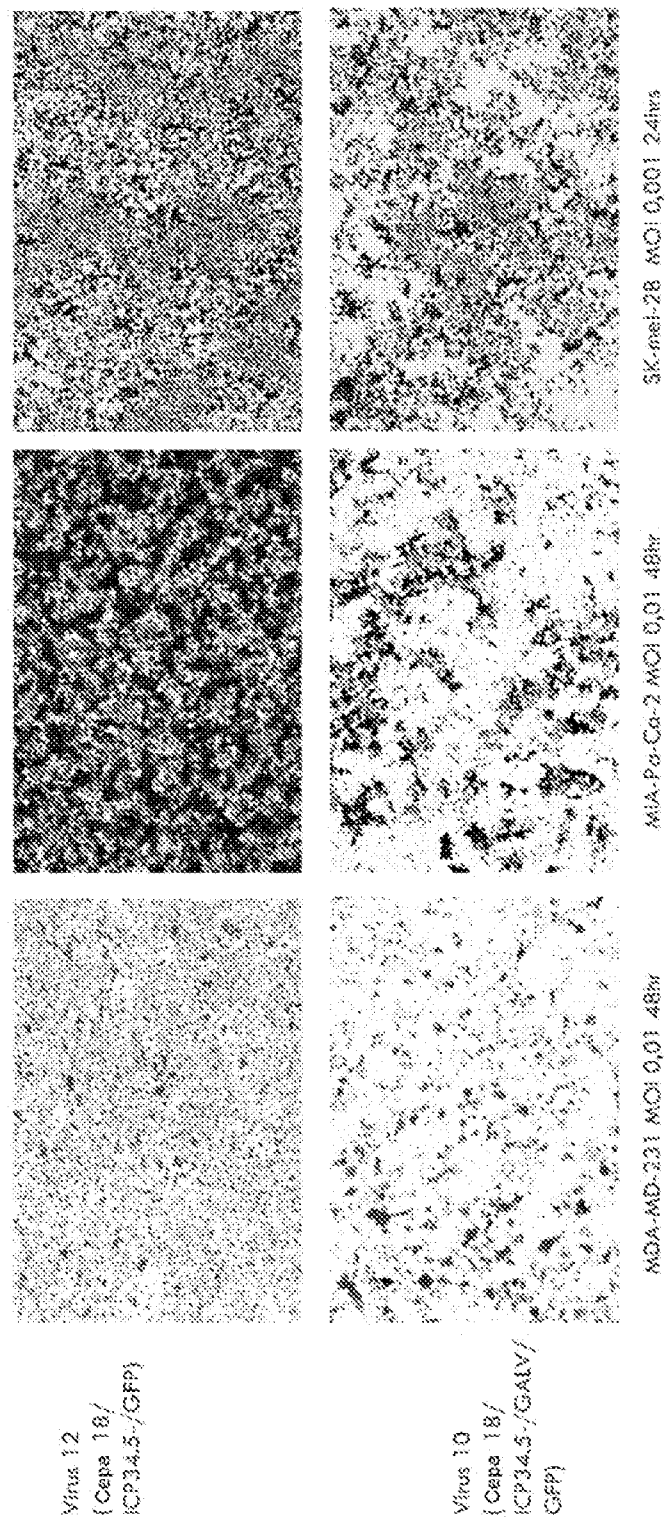


Figura 7B



Muerte celular evaluada por tinción de cristal violeta: baja magnificación

Figura 8A

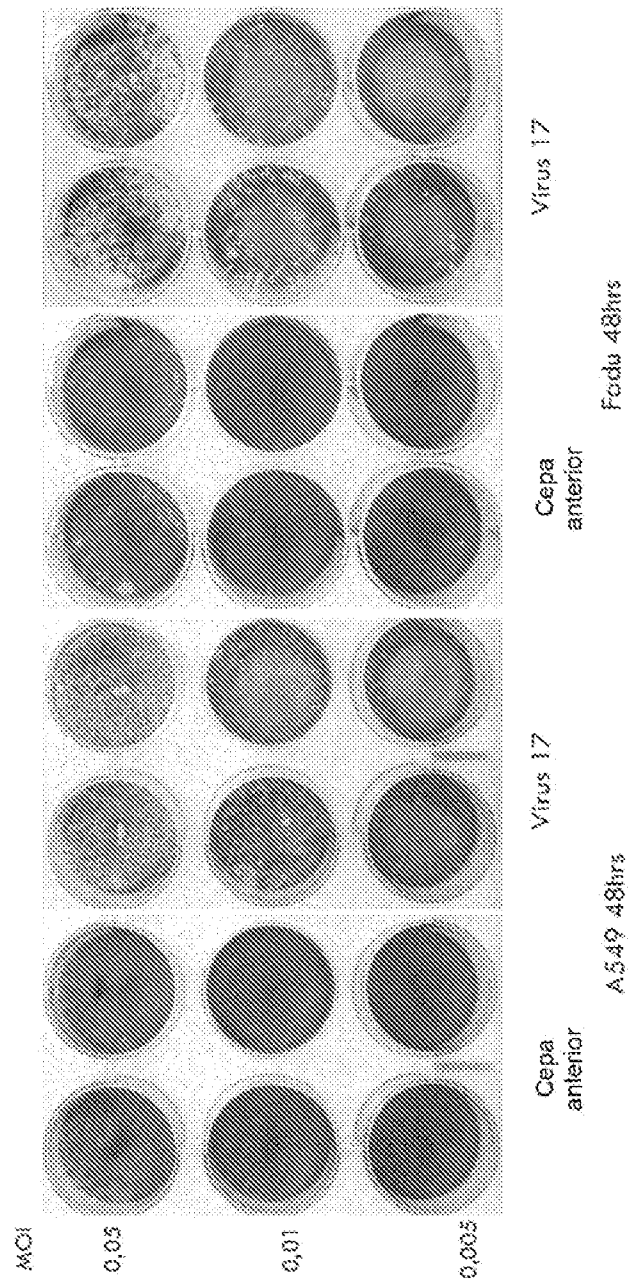


Figura 8B

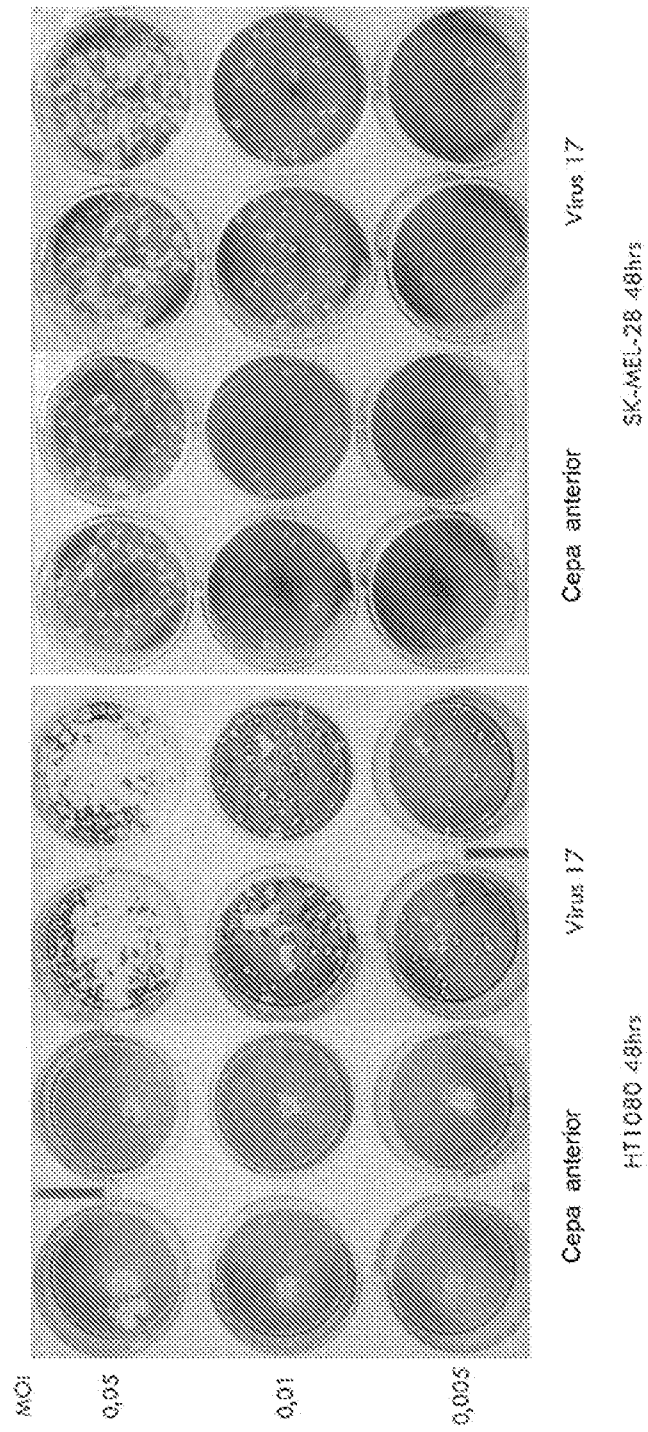


Figura 9

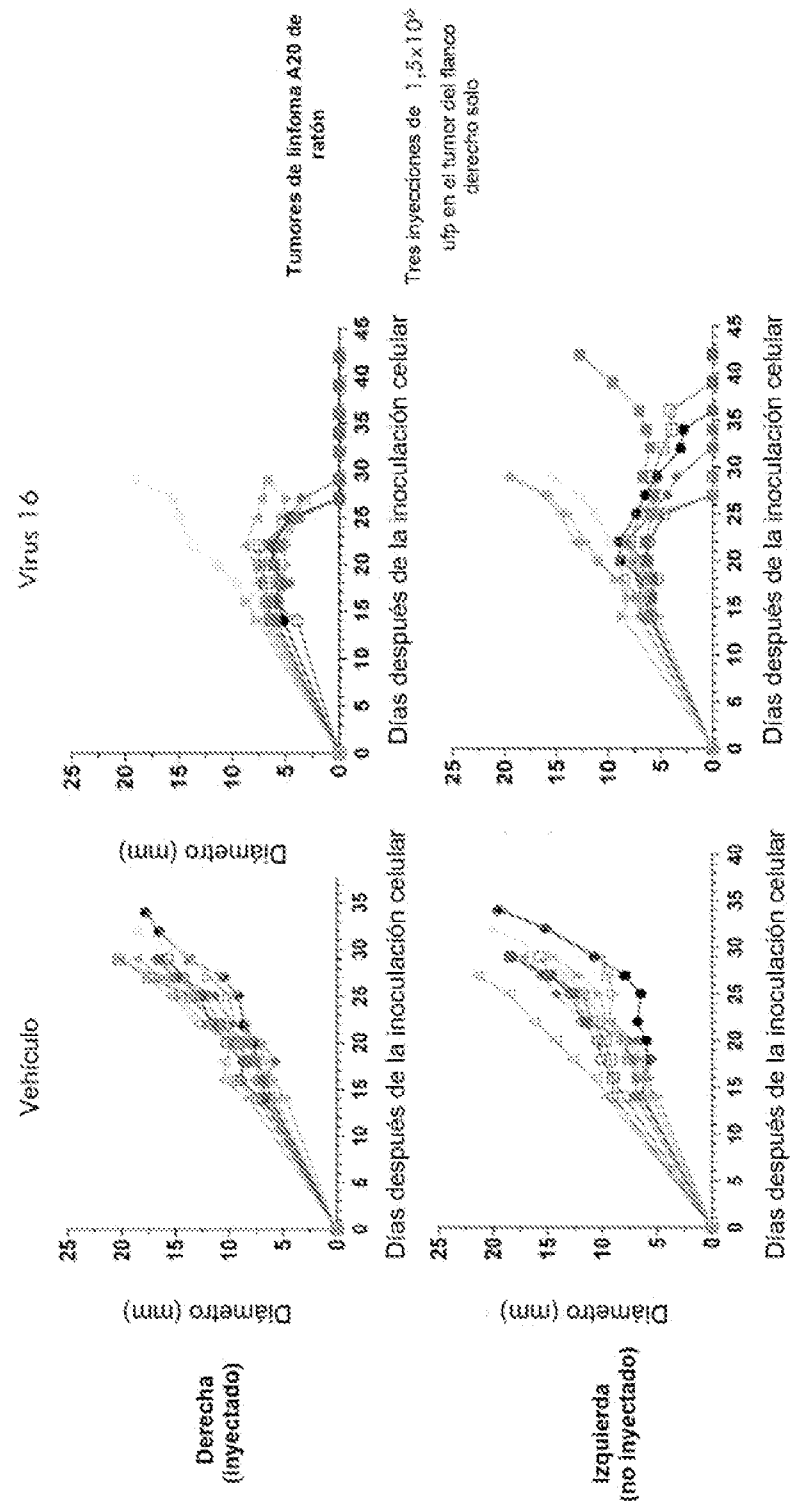


Figura 10

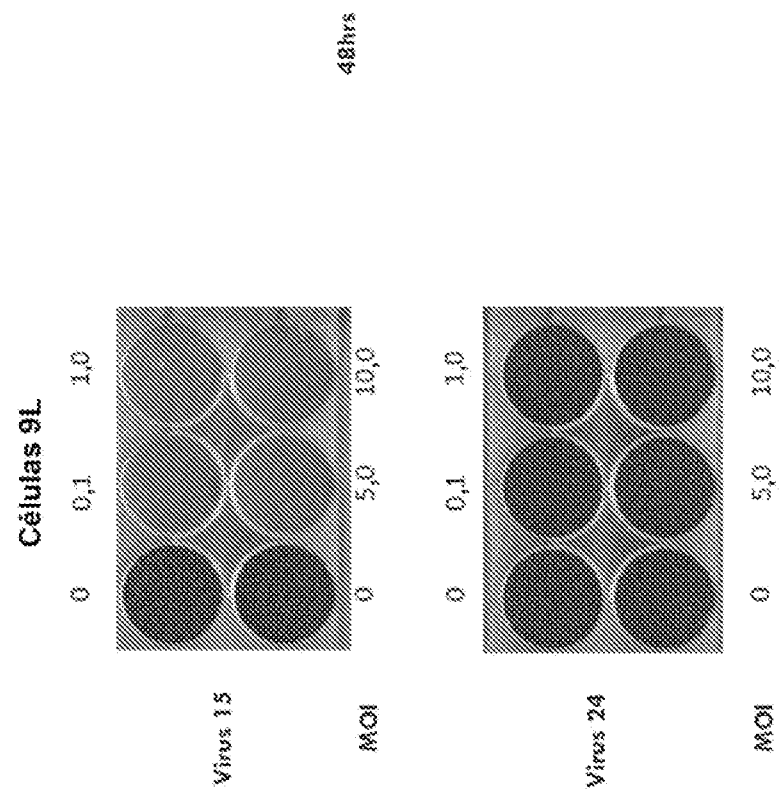
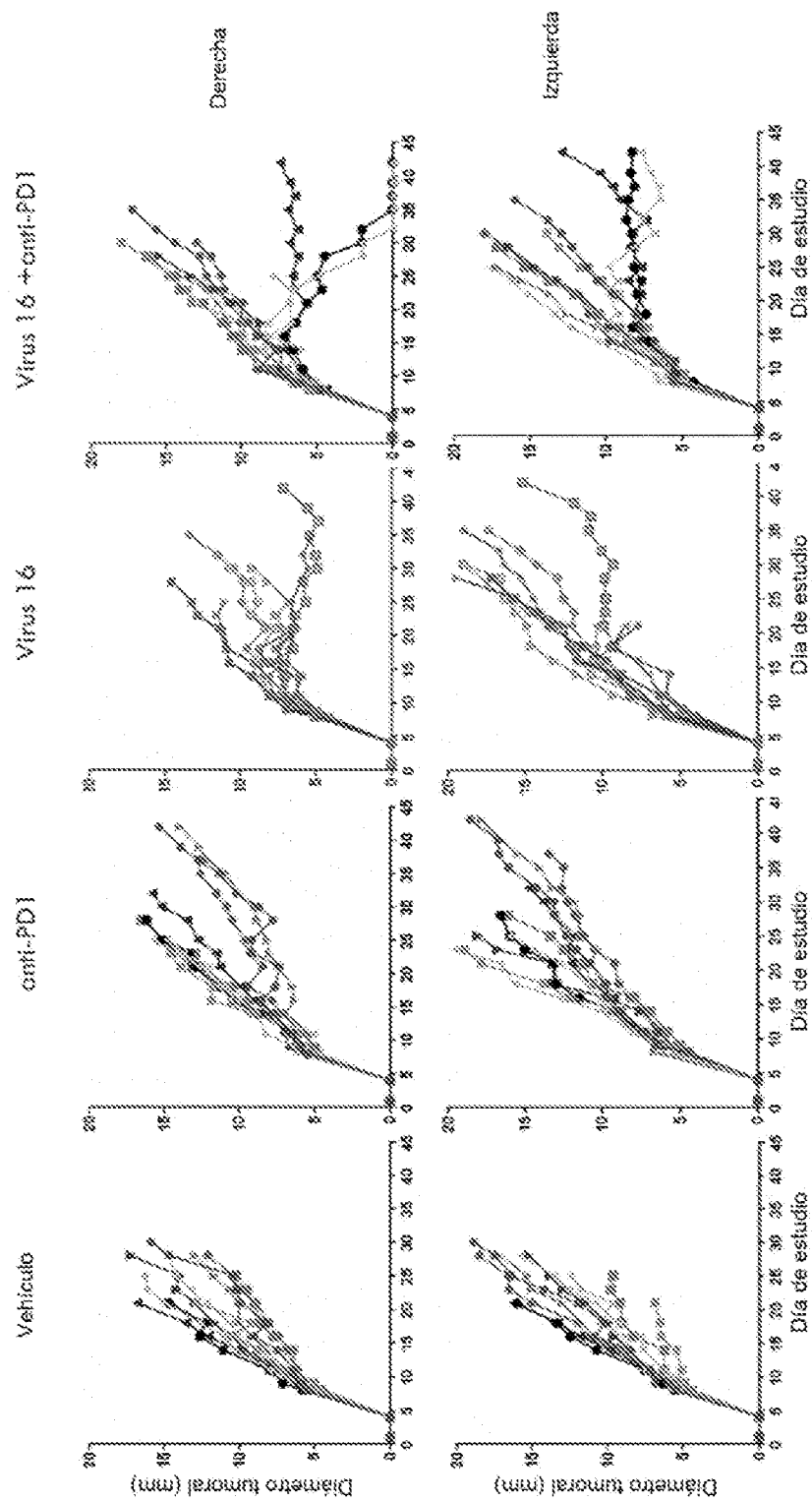
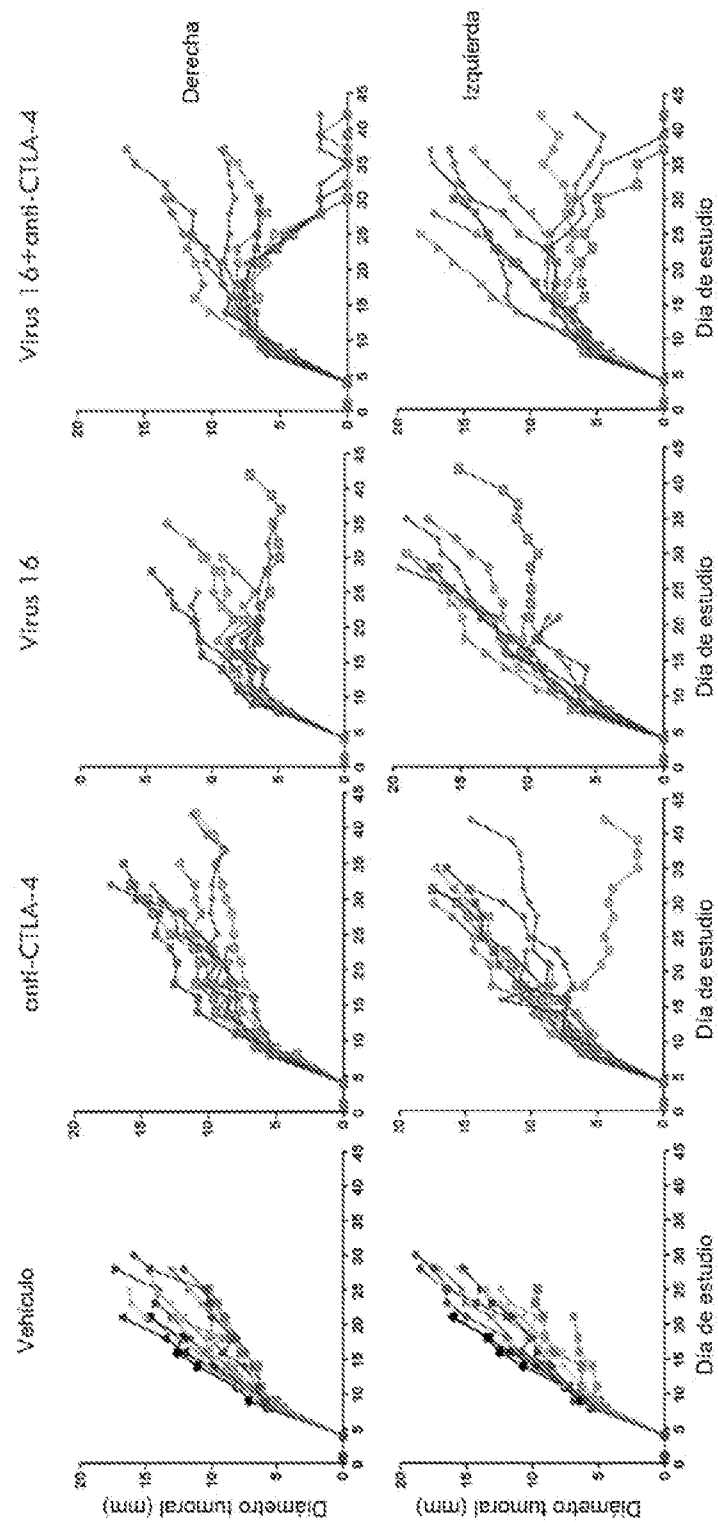


Figura 11A



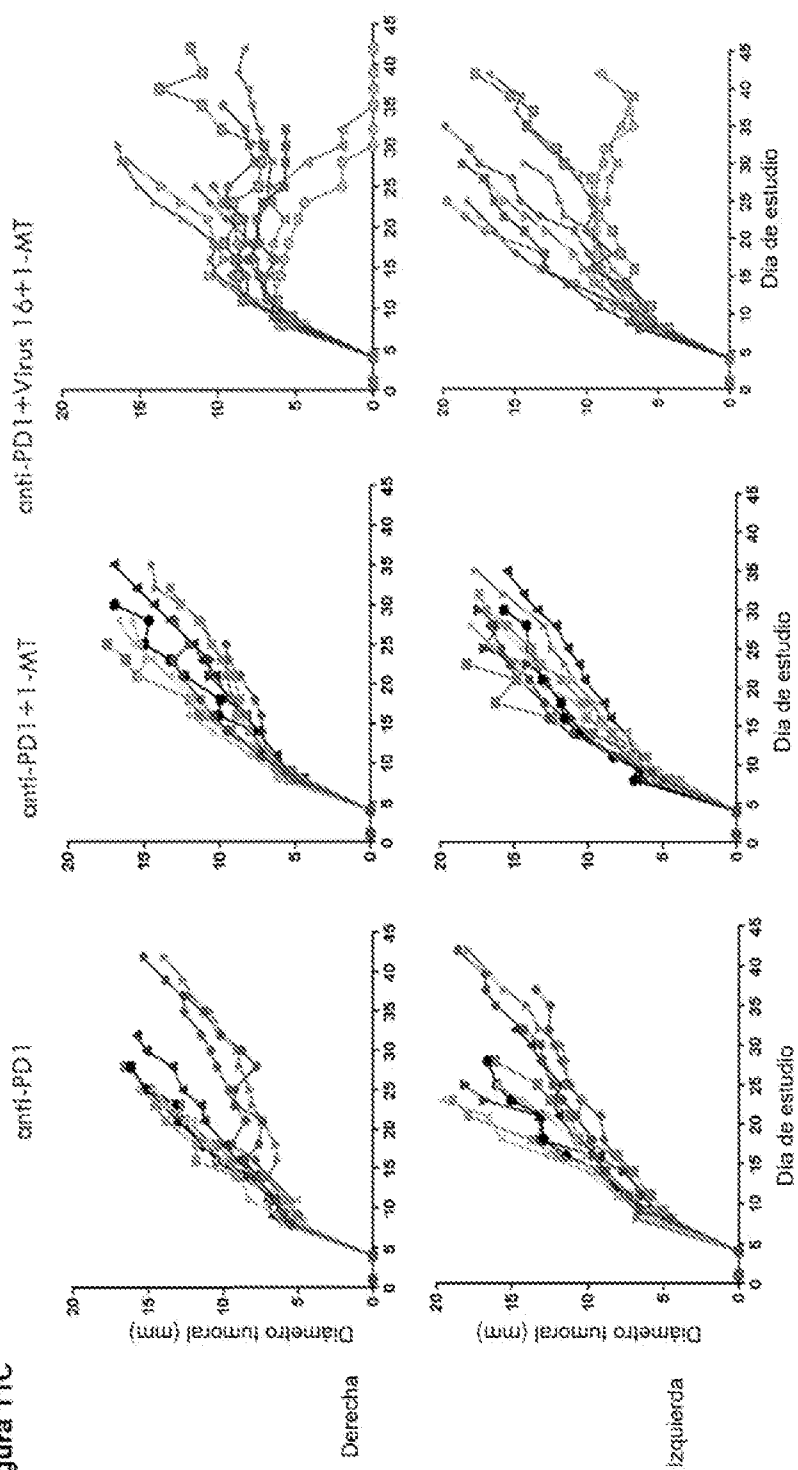
Virus: 5 inyecciones de 5×10^6 ufp en el tumor del flanco derecho solo
 Anti-PD1: 10mg/kg i.p. Q3Dx9 (don RMP1-14; BioXCell)

Figura 11B



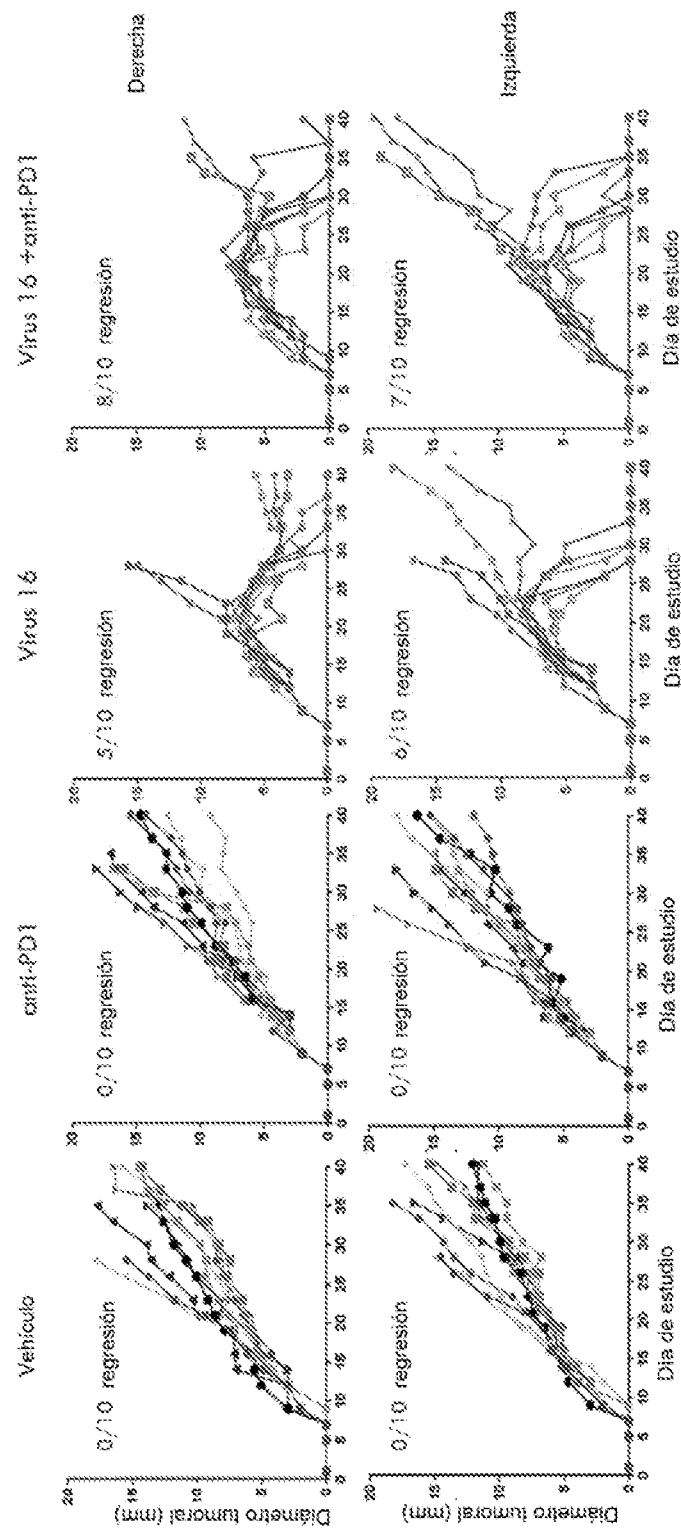
Virus: 5 inyecciones de 5×10^6 ufp en el tumor del flanco derecho solo
Anti-CTLA-4: 3mg/kg i.p. Q3Dx9 (clon 9D9, BioXCell)

Figura 11C



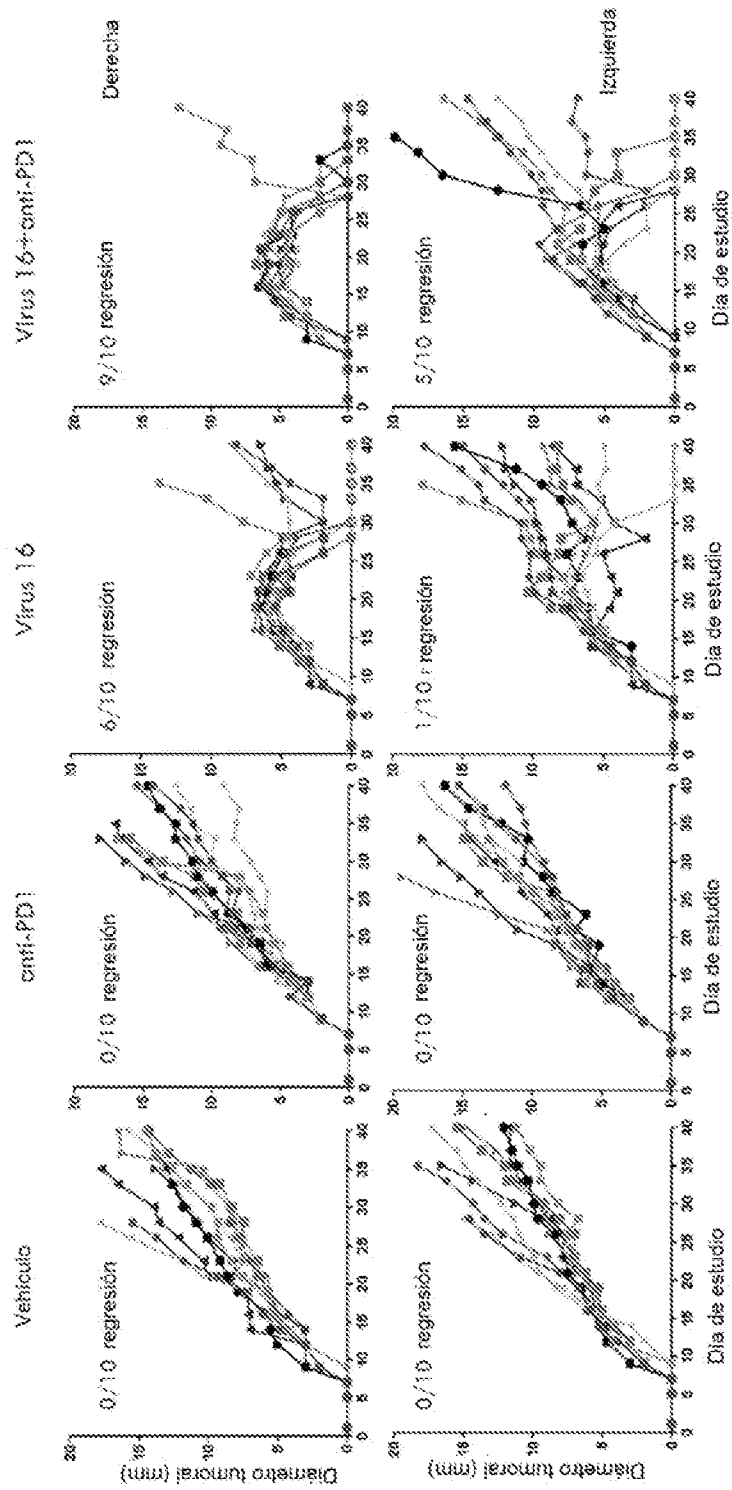
Virus: 5 inyecciones de 5×10^6 ufu en el tumor del flanco derecho solo
 Anti-PD1: 10mg/kg i.p. Q3Dx9 (clon RMP1-1.4; BioXCell)
 I-MT: 5mg/ml en agua para beber (I-MT solo no tiene efecto)

Figura 12A



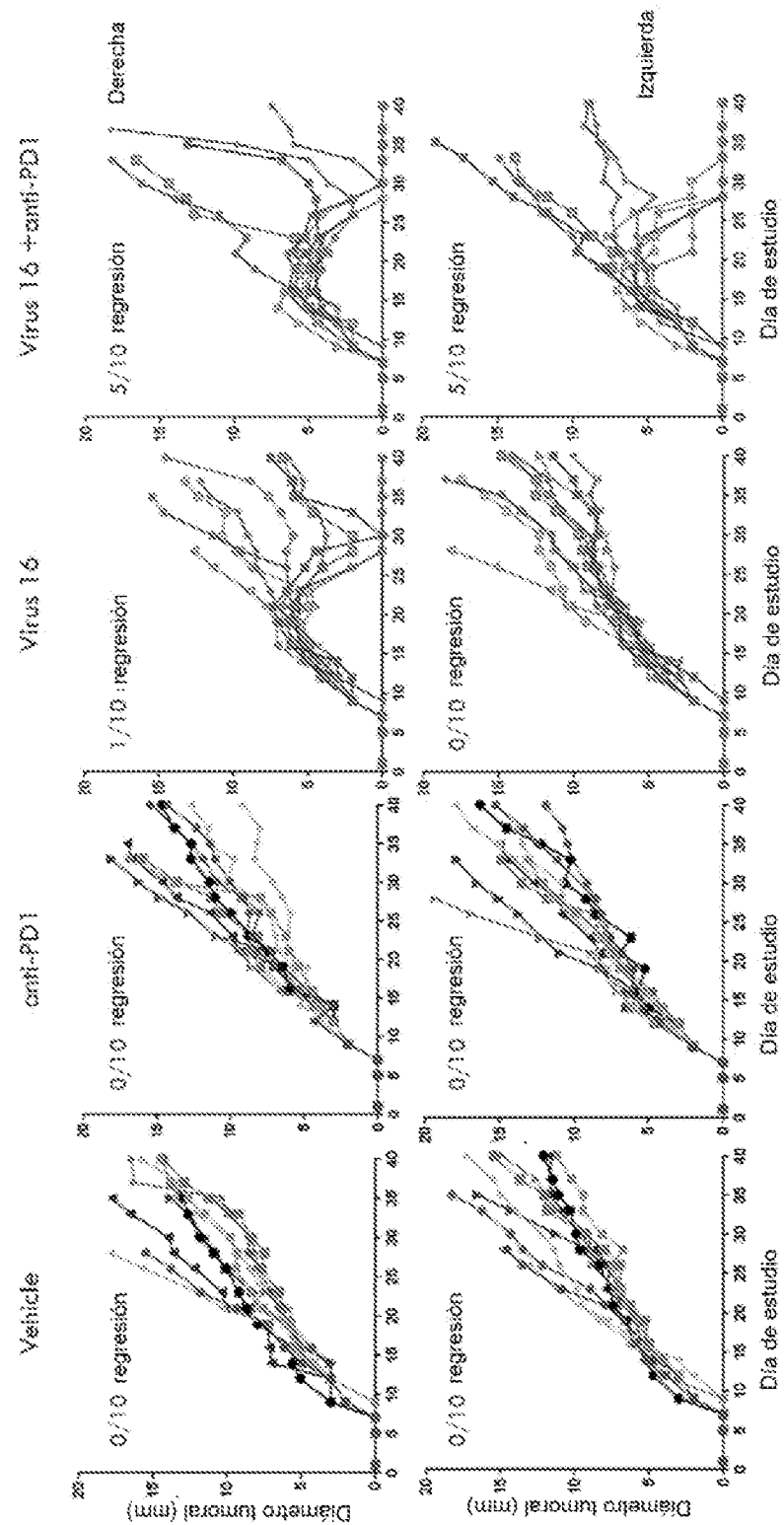
Virus: 3 inyecciones de 5×10^6 ufp en el tumor del flanco derecho solo
 Anti-PD1: 10mg/kg i.p. Q3Dx9 (clon RMP1-14, BioXCell)

Figura 12B



Virus: 3 inyecciones de 5×10^5 ufp en el tumor del flanco derecho solo
 Anti-PD1: 10mg/kg i.p. Q3Dx9 (clon RMP1.14; BioXCell)

Figura 12C



Virus: 3 inyecciones de 5×10^4 ufp en el tumor del flanco derecho solo
 Anti-PD1: 10mg/kg i.p. Q3Dx9 (clon RMP1-14; BioXCell)

Figura 12D

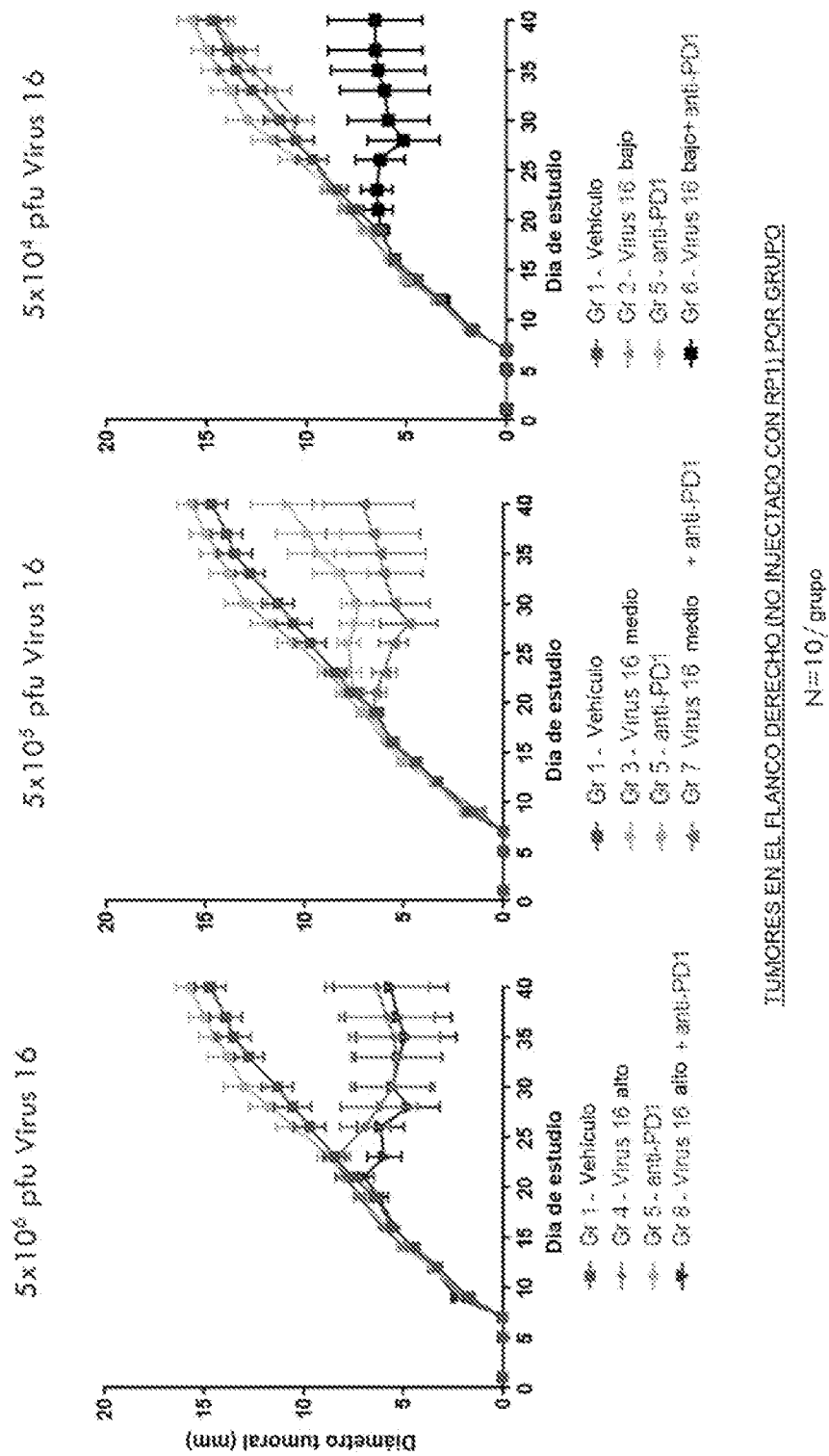


Figura 13

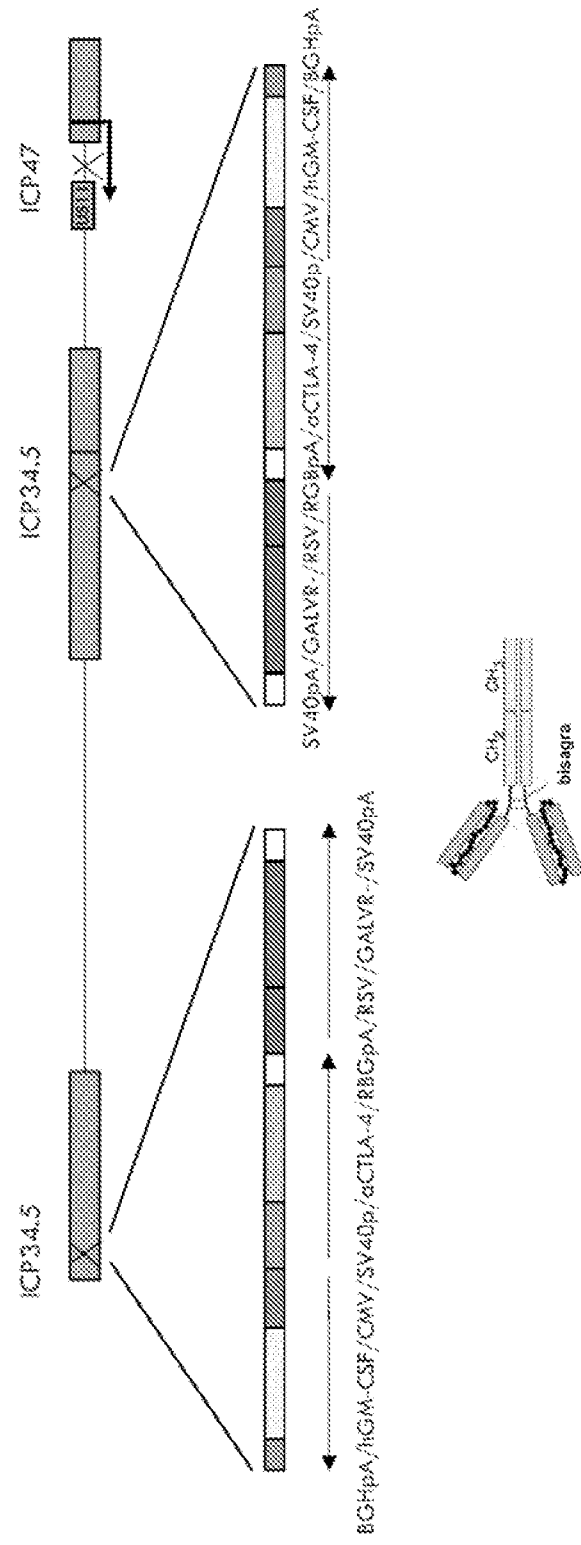
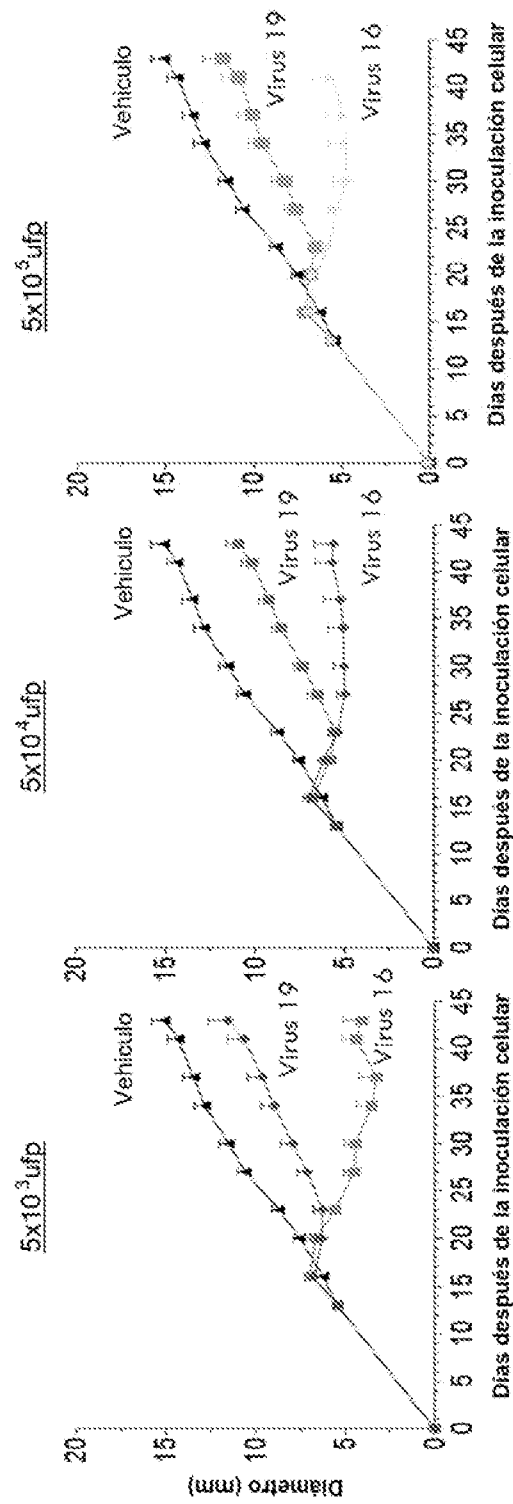


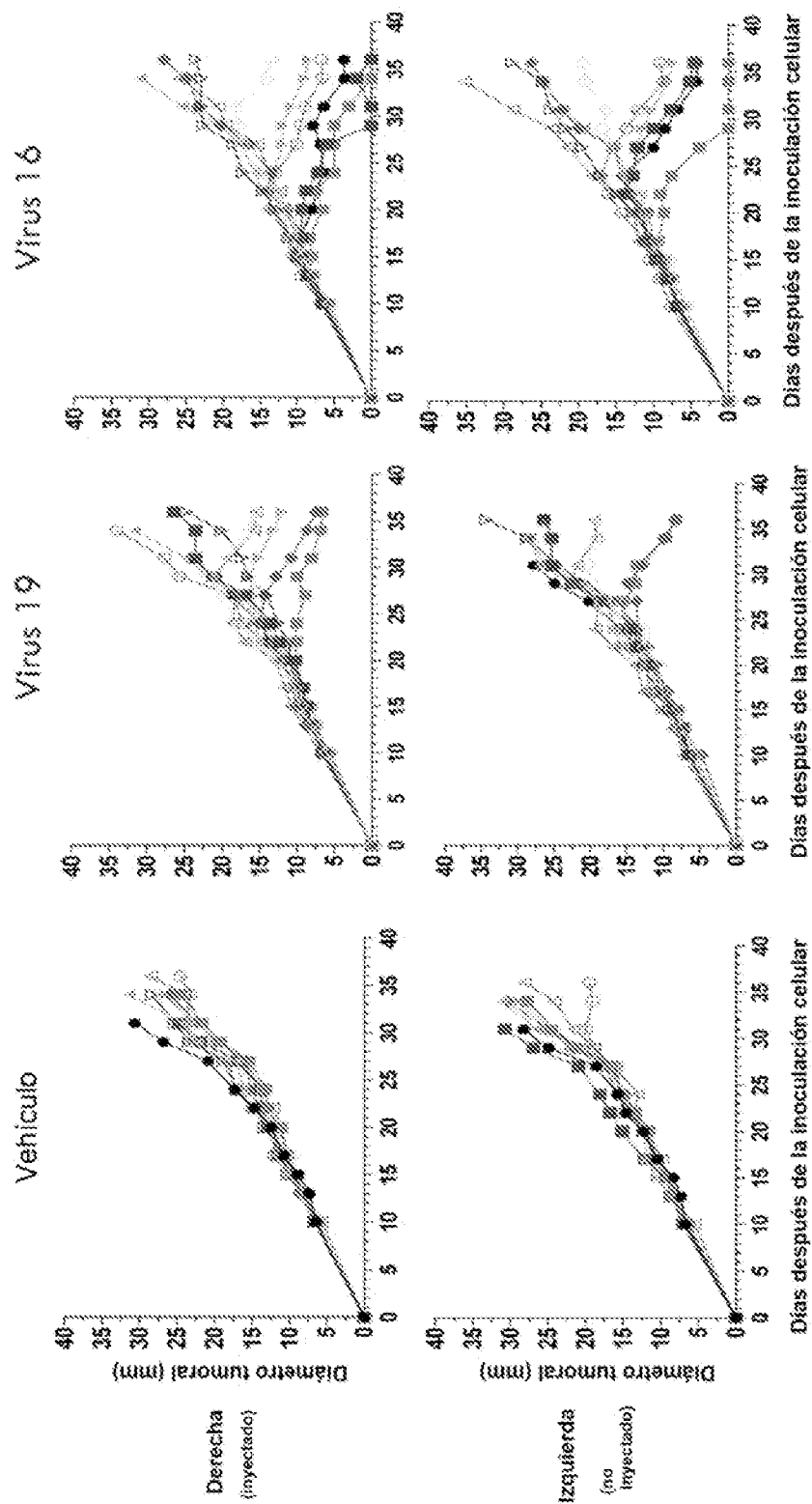
Figura 14



Tumores de cáncer de pulmón A549 humanos en ratones desnudos (sin efecto inmunitario)

3 inyecciones de virus 16 o virus 19 durante 1 semana de vehículo o la dosis indicada de virus (N=10 / grupo)

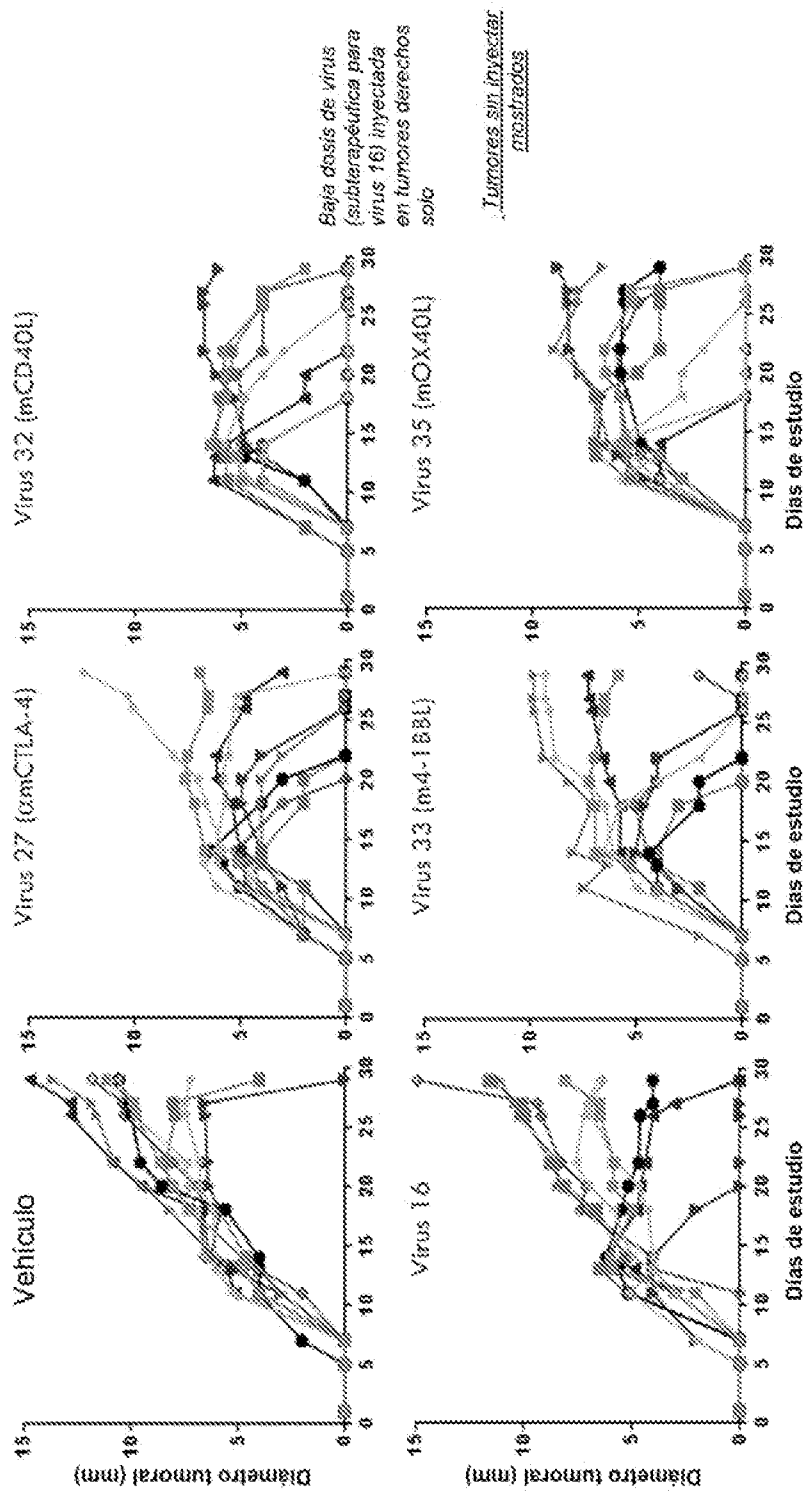
Figura 15



Tumores de glioma 9L de rata en ratas inmunocompetentes

Virus: 5×10^5 jupl inyectado 3x/semana en el tumor derecho solo durante 3 semanas

Figura 16



Tumores A20 de ratón en ratones inmunocompetentes (tumores en los dos flancos)

Virus : 5×10^4 ufp del virus indicado inyectado 3x en el tumor derecho solo