

(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**

## 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 antigenicos 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.

20 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.

25 30 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".

35 40 45 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 sistemática 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 sistemática de estas mismas moléculas o administración sistemática de otras moléculas dirigidas a las mismas rutas.

50 55 60 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.
- 10 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.
- 15 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.
- 20 30 Un enfoque alternativo para aumentar la respuesta inmunitaria antitumoral en pacientes con cáncer es dirigir (activar) las vías inmunoestimuladoras, es decir, en contraste con la inhibición de las vías inmunitarias coinhibidoras. 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.
- 25 35 40 45 50 55 60 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抗ígenos 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抗ígenos 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 coinhibitoria en ratones y seres humanos que se han observado hasta ahora.
- 65 Liu et al. (2003, Gene Therapy, 10 (4): 292-303) describe virus del herpes simple con ICP34.5 delecionado 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 Talilmogene laherparevec aumenta la eficacia antitumoral del bloqueo de puntos de control inmunológico anti-PD-1 (2015, URL: 10 Abstract.aspx?mID=3682&sKey=ebc7290a-af22-4fa6-9436-c276011fb181&cKey=b61c1150-5517-456bcd3-2f8048807587&mKey=19573a54-ae8f-4e00-9c23-bd6d62268424).

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 coinhidadoras 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 30 también administradas por el virus oncolítico.

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 35 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 dirigir los efectos del bloqueo sistémico combinado de la vía inmunitaria coinhidora y la activación 40 de la vía inmunitaria coestimuladora en los tumores, es decir, de manera que las respuestas inmunitarias amplificadas de las que se liberan los bloques coinhididores 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 50 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 inmunomedidos 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 coinhidora) 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-CSL 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. Despues se trataron grupos de 10 ratones con: Vehículo (3 inyecciones en los tumores del flanco derecho cada dos días); 5x10<sup>exp6</sup> 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 triptófano (IMT; Inhibidor de IDO (5 mg/ml en agua para beber)); anti-PD1 de ratón junto con 1-metil triptófano; o anti-PD1 de ratón junto con 1-metil triptófano 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-PDI en combinación tiene un mejor efecto antitumoral que el uso de anti-PDI 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-PDI como de IDO en comparación con la inhibición de anti-PDI 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 ligera y pesada ( $[G_4S]_3$ ) 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  $\mu$ l de vehículo; 50  $\mu$ l de  $10^7$  ufp/ml de Virus 19 (expresa mGM-CSF pero no GALV R-); o 50  $\mu$ l 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. 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), mOX40L (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.  
 5 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.  
 10 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.  
 15 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.  
 20 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.  
 25 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.  
 30 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*

35 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.  
 40 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.  
 45 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.  
 50 El 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  
 55 60 65

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.

- 5 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.
- 10 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 15 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 20 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.
- 25 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, 30 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).
- 35 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.
- 40 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 45 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.
- 50 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 CO<sub>2</sub> 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 55 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.
- 60 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 CO<sub>2</sub> 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 20 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 25 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 muestradas.

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

cepas 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:

cepas 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 65 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 5 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 10 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.
- 15 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 20 (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.
- 25 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 30 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 35 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 40 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.
- 45 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, 50 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 55 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抗genos 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 60 65

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.

5 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, TL1 A, un ligando de CD30, CD27, 10 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, 15 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, 20 ligandos secretados y/o unidos a la membrana y anticuerpos agonistas que incluyen anticuerpos monocatenarios.

20 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 25 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 30 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 35 factores del hospedador, incluyendo diversas células del sistema inmunitario (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (Clq) del sistema del complemento clásico.

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

45 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')<sub>2</sub>, 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 50 nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 35.

55 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.

60 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, ISOCL, 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.
- 5 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.
- 10 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 GALVR-.
- 15 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 gibón (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-).
- 20
- 25 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.
- 30 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.
- 35 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.
- 40
- 45 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 retrovírico. 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 retrovírico. El promotor retrovírico 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.
- 50
- 55 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*
- 60 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.
- 65 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 delección 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 10 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 IE2a 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 15 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 20 sintética, secuencia de poliadenilación de betaglobina de conejo o secuencias víricas como la secuencia de poliadenilación temprana o tardía de SV40).

#### *Composiciones farmacéuticas*

25 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 30 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 35 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.

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

#### *Usos médicos*

45 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-50 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 55 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.

60 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.

65 El virus de la invención puede administrarse en combinación con otros agentes terapéuticos, incluyendo quimioterapia, terapia dirigida, immunoterapia (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 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).
- 10 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 doxorrubicina, antibióticos citotóxicos tales como actinomicina, antraciclinas 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.
- 20 25 30 35 El agente terapéutico puede ser uno o una combinación de: inmunoterapéuticos o inmunomoduladores, tales como 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 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.
- 40 45 50 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 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.
- 55 Por ejemplo, un virus de la invención puede usarse: en combinación con dacarbazina, un inhibidor de BRAF y o CTLA-4, bloqueo de PD1 o PD-L1 para tratar melanoma; en combinación con taxol, doxorrubicina, vinorelbina, ciclofosfamida y/o gemicitabina para tratar el cáncer de mama; en combinación con 5-fluorouracilo y opcionalmente leucovorina, irinotecán y/u oxaliplatino para tratar el cáncer colorrectal; en combinación con taxol, carboplatino, vinorelbina y/o gemicitabina, bloqueo de PD-1 o PD-L1 para tratar el cáncer de pulmón; en combinación con cisplatino y/o radioterapia para tratar el cáncer de cabeza y cuello.
- 60 65 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.
- 65 70 75 80 85 90 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- $\gamma$  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 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 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.
- 5 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.
- 10 15 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.
- 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65 Los agentes terapéuticos 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 exemplificar la invención es VHS1. La cepa de VHS1 usada para la exemplificación se identifica a través de la comparación de más de 20 aislados clínicos primarios de VHS1 por su capacidad para matar un panel

5 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 10 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.

15 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

20 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.

25 30 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.

35 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.

40 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**

45 50 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.

55 60 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 GALVR- 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.
- 15     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.
- 20     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

# ES 2 841 300 T5

(continuación)

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

(continuación)

Número de muestra	Virus recuperado
RH049A	
RH049B	No
RH049C	
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), MIAPACA-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.

5 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 10 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.

15 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.

20 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 diana observadas.

25 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.

30 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 35 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 40 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 aislado 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, 45 5 % de CO<sub>2</sub>, 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 50 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.

##### 55 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.

60 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 5 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 10 seleccionando de nuevo placas de virus que no expresan GFP. Esta construcción de virus se realizó usando métodos que son convencionales en la técnica.
- 15 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.
- 20 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 GALVR- 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 30 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 GALVR- 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 40 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)**

45 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 5x10<sup>exp6</sup> 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 50 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)**

55 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:

- 65 - 50 µl de vehículo;  
- 50 µl de 10<sup>7</sup> 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);
- $5 \times 10^6$  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 GALVR- *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 GALVR-). 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  $5 \times 10^4$  ufp (50 ul de  $1 \times 10^6$  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.

20 **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:

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

35 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Replimune Limited  
 <120> VIRUS MODIFICADO GENÉTICAMENTE  
 40 <130> N406716WO  
 <150> GB1600380.8  
 <151> 08-01-2016  
 45 <150> GB1600381.6  
 <151> 08-01-2016  
 <150> GB1600382.4  
 50 <151> 08-01-2016  
 <160> 45  
 <170> PatentIn versión 3.5  
 55 <210> 1  
 <211> 426  
 <212> ADN  
 <213> *Mus musculus*  
 60 <400> 1

# ES 2 841 300 T5

	atgtggctgc agaatttact tttcctggc attgtggtct acagcctctc agcacccacc	60
	cgttcaccca tcactgtcac cgggccttgg aagcatgtag aggccatcaa agaaggccctg	120
	aacctcctgg atgacatgcc tgtcacattg aatgaagagg tagaagtctgt ctctaaccgag	180
	ttctccttca agaagctaac atgtgtgcag acccgctga agatattcga gcagggctca	240
	cggggcaatt tcaccaaact caagggcgcc ttgaacatga cagccagctaa ctaccagaca	300
	tactgccccca caactccgga aacggactgt gaaacacaag ttaccaccta tgccgatttc	360
	atagacagcc taaaaacatt tctgactgtatccctttg aatgcaaaaa accagtccaa	420
	aatga	426
5	<210> 2	
	<211> 426	
	<212> ADN	
	<213> <i>Mus musculus</i>	
	<400> 2	
	atgtggctcc agaacctctt cttcctcggt atcgctgtgt attcactctc cgcacctact	60
	cgttcaccta tcactgtcac cagaccctgg aagcacgtgg aggccatcaa ggaggctctg	120
	aacctgctgg acgatatgcc agtgaccctg aacgaggagg tggaggttgt gagcaaccgag	180
	ttctccttta agaagctgac ctgcgtgcag acaaggctga agatcttcga gcagggcctg	240
	agaggaaact ttaccaagct gaagggcgcc ctgaacatga ccgcttctta ctaccagaca	300
	tactgccccca ctaccccgaa gacagactgt gagacacagg tgaccacata cgccgacttc	360
	attgatagcc tgaaaacatt cctgaccgac attccatttg agtgtaaagaa gcccgtccag	420
10	aagtaa	426
	<210> 3	
	<211> 435	
	<212> ADN	
15	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 3	
	atgtggctgc agagcctgtc gctttggc actgtggct gcagcatctc tgcacccggcc	60
	cgttcaccca gccccagcac gcagccctgg gagcatgtga atgccatcca ggaggcccg	120
	cgttccttgc acctgagtag agacactgtc gctgagatga atgaaacagt agaagtcatc	180
	tcagaaatgt ttgacctcca ggagccgacc tgcctacaga cccgccttgc gctgtacaag	240
	cagggcctgc gggcagcct caccaagctc aagggccct tgaccatgtatggccagccac	300
	tacaaggcgc actgcctcc aaccccgaa acttcctgtc caacccagat tatcacctt	360
	gaaagttca aagagaacct gaaggacttt ctgcttgc tccctttgc ctgctggag	420
	ccagtccagg agtga	435
20	<210> 4	
	<211> 435	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
25	<400> 4	

# ES 2 841 300 T5

	atgtggctgc agtccctgct gctgctggc accgtcgccct gttctatttc cgcacccgca	60
	aggcaccaa gtccatctac tcagccttgg gagcacgtga acgcaatcca ggaggcacgg	120
	cggctgctga acctgagccg ggacaccgccc gccgagatga acgagacagt ggaagtgtac	180
	agcgagatgt tcgatctgca ggagccccacc tgcctgcaga caaggctgga gctgtacaag	240
	cagggcctgc gcggctctct gaccaagctg aaggccccac tgacaatgtat ggcacccac	300
	tataaggcagc actgcccccc taccccccag acaagctgtg ccacccagat catcacatc	360
	gagtcctta aggagaacct gaaggatttt ctgctggtca ttccatttga ttgttggag	420
	cccggtccagg agtaa	435
5	<210> 5	
	<211> 141	
	<212> PRT	
	<213> <i>Mus musculus</i>	
10	<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	
15	<210> 6	
	<211> 144	
	<212> PRT	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 6	

ES 2 841 300 T5

Met Trp Leu Gln Ser 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

5 <212> ADN  
<213> Virus de la leucemia del gibón

<400> 7

# ES 2 841 300 T5

atggtattgc	tgcctggc	catgcttc	acctaacc	tgcaccac	tcggcaccag	60
atgagtcc	tgcgttggaa	aagactgatc	atcccttaa	gctgcgtatt	cggcgccggc	120
gggacgagtc	tgcaaaataa	gaacccccac	cagccatga	ccctca	cttg gcaggta	180
tcccaaactg	gagacgttgt	ctgggataca	aaggcagtcc	agccccctt	gacttgg	240
cccacactt	aacctgatgt	atgtgc	tttgc	ggcgctagtc	ttgagtcc	300
ggaaccgatg	tctcg	cctc	taa	acgatc	agac	360
tataagcaaa	tcac	ctgggg	agccataggg	tgcag	tacc	420
gcaagctcta	cctt	ctacgt	atgt	ccccgg	gatggcc	480
tgccgggggc	taga	atccct	atactgtaaa	aat	ggggatt	540
tattggctat	ctaaat	cctc	aaa	agac	ctc	600
tggactcaaa	aatttcaaca	gtgt	caccag	accgg	gtgtt	660
ttcacagaca	aaggaaaatt	atccaaggac	tggataacgg	aaaaa	acctg	720
ttctatgtgt	ctgg	acatcc	aggcgtacag	ttcaccatc	gctt	780
ccagctgtgg	cagt	agg	tgcc	tgac	ctcg	840
ctcg	ctcc	cac	tcc	tttgg	gaa	900
aactccacag	ccct	ggc	gac	actccc	acgg	960
ctaa	acactc	cgc	c	actt	tttgc	1020
ctaacc	ttaa	atg	cac	cc	tttgc	1080
ggcccc	cc	tttgc	attat	at	tttgc	1140
gac	cc	tttgc	aa	at	tttgc	1200
tttgc	at	tttgc	aa	at	tttgc	1260
tttgc	at	tttgc	aa	at	tttgc	1320
actgg	cc	tttgc	cc	tttgc	tttgc	1380
cagg	cc	tttgc	cc	tttgc	tttgc	1440
gaca	tttgc	cc	tttgc	tttgc	tttgc	1500
gggttgg	tttgc	cc	tttgc	tttgc	tttgc	1560
gac	tttgc	cc	tttgc	tttgc	tttgc	1620
caag	tttgc	cc	tttgc	tttgc	tttgc	1680
aatagg	tttgc	cc	tttgc	tttgc	tttgc	1740
ga	tttgc	cc	tttgc	tttgc	tttgc	1800
aa	tttgc	cc	tttgc	tttgc	tttgc	1860
ttgttcaata	actccc	tttgc	tttgc	tttgc	tttgc	1920
cttctcc	tgtt	gtc	tttgc	tttgc	tttgc	1980
aatgatagga	taag	gtc	tttgc	tttgc	tttgc	2010

# ES 2 841 300 T5

<213> Virus de la leucemia del gibón

<400> 8

	accatgggcc	tgctgcctgg	gtctatgctg	ctgacttcta	acctgcacca	cctgcgacac	60
	cagatgtctc	ccggatcatg	gaaacggctg	atcatcctgc	tgagctgcgt	gttcggagga	120
	ggaggcacct	ccctgcagaa	caagaatcct	caccagccaa	tgaccctgac	atggcagggt	180
	ctgtcccaga	cagggcacgt	ggtgtggat	accaaggcag	tgcagccacc	ttggacatgg	240
	tggcccaccc	tgaagcctga	cgtgtgcgcc	ctggccgcct	ccctggagtc	ttgggacatc	300
	cccgccacag	acgtgagcag	cagcaagagg	gtgagaccac	ccgactctga	ttatacagcc	360
	gcctacaagg	agatcacctg	gggcgcattc	ggctgttagct	atccctgggc	ccgcacacaagg	420
	atggccagct	ccaccttta	cgtgtgcccc	cgcgacggaa	ggaccctgtc	tgaggcaagg	480
	agatgtggcg	gcctggagag	cctgtattgc	aaggagtggg	attgtgagac	cacaggcaca	540
	ggctactggc	tgtctaagtc	tagcaaggac	ctgatcaccc	tgaagtggga	tcagaacagc	600
	gagttggacac	agaagttcca	gcagtgcac	cagaccggct	ggtgtaatcc	cctgaagatc	660
	gactttacag	ataagggcaa	gctgtccaag	gactggatca	ccggcaagac	atggggcctg	720
	agattctacg	tgtctggcca	ccctggcgtg	cagtttacaa	tccggctgaa	gatcacaac	780
	atgccagcag	tggcagtggg	accagacctg	gtgttgtgg	agcaggggacc	tccacgcacc	840
	tccctggccc	tgccccctcc	actgccccct	agggaggccc	caccccttag	cctgcccgt	900
	tctaacagca	cagccctggc	caccccgcc	cagaccctca	cagtgcgcaa	gaccatcgt	960
	acactgaata	ccccaccccc	taccacaggc	gacaggctgt	tgcatactgt	gcagggagcc	1020
5	tttctgacac	tgaacgcac	caatccctggc	gcaaccgaga	gctgtggct	gtgcctggct	1080
	atggggccac	cctactatga	ggcaatcgcc	tcctctggag	aggtggcata	ttccacagac	1140
	ctggatagat	gcagatgggg	caccaggggc	aagctgaccc	tgacagaggt	gtctggccac	1200
	ggcctgtgca	tcggcaaggt	gccattcaca	caccaggacc	tgtcaaccca	gaccctgagc	1260
	atcaatagct	ccggcgacca	ccagttacctg	ctgccaagca	accactcctg	gtgggcatgc	1320
	tccacaggac	tgacccatg	tctgagcacc	agcgtgttca	accagaccag	agactttgt	1380
	atccaggtgc	agctgatccc	tcggatctac	tattacccag	aggaggtgt	gctgcaggcc	1440
	tatgataatt	cccacccaag	aacaaagagg	gaggccgtgt	ctctgaccct	ggccgtgctg	1500
	ctgggactgg	gaatcacagc	aggaatcgcc	acaggcagca	ccgcctgtat	caagggacca	1560
	atcgacctgc	agcagggact	gacccctctg	cagatgcaca	tgcacgcga	tctgagagcc	1620
	ctgcaggaca	gcgtgtccaa	gctggaggat	tctctgacct	ctctgagcga	ggtggtgctg	1680
	cagaacacgga	ggggcctgg	cctgtgttcc	ctgaaggagg	gaggactgt	cgccgcctg	1740
	aaggaggagt	gctgtttta	tatcgaccac	tctggcgccg	tgcgggatag	catgaagaag	1800
	ctgaaggaga	agctggataa	gcgcagctg	gagaggcaga	agagccagaa	ttggtacgag	1860
	ggctgtgtca	acaattcccc	ctgggttacc	acactgtgt	ctaccatgc	aggacatctg	1920
	tttattactgc	tgctgtgtct	gatccctggc	ccatgtatca	tcaacaagct	ggtgcagttt	1980
	atcaacgacc	aatctccgc	agtgaaaatc	taa			2013

ES 2 841 300 T5

<210> 9

<211> 669

<212> PRT

5 <213> Virus de la leucemia del gibón

<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 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 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
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 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

5 <212> ADN

### <213> Secuencia artificial

<220>

<223> *Homo sapiens*

10

<400> 10

15

<210> 11

<211> 252

<212> PRT

<220>

-220- 110

# 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 Ile 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 Ile 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 Ile 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 ctggtcagc ctctggaaa cctgggagcc	60
gagatgaaga gcctgtccca gagatctgtg cctaacadct gcacactgtt catgtcagc	120
cccaccgaga atggactgcc tggaaggac ggaaggatg gaaggaggg ccctcggggc	180
gagaagggcg acccaggact gcctggacca atggactga gcggactgca gggaccaaca	240
ggacctgtgg gaccaaagg agagaacgga tccgcggag agccaggccc taagggcgag	300
aggggcctgt ctggccccc tggcctgcca ggcattccag gccccgcgg caaggaggc	360
ccatccggca agcaggcata tatcgcccc caggcaago ctggccaaa gggcgaggca	420
ggaccaaagg gagaagtggg agcacctggc atgcaggat ccacggagc aaaggatct	480
acaggacca aggcgagcg cggcgcggca ggcgtgcagg ggcgcgcgg caatgcagga	540
gcagcaggac cagcaggacc tgcaggccca cagggcgccc ctggctctag gggcccaccc	600
ggcctgaagg ggcacagggg agtgcctggc gataggggca tcaaggaga gagcgactg	660
ccagattccg ccgcctgag gcagcagatg gaggccctga agggcaagct gcagaggctg	720
gaggtggcct tctccacta ccagaaggcc gccctgtttc cagacggcca caggagactg	780
gacaagatcg aggatgagcg caacctgcac gaggattcg ttttatgaa gaccatccag	840
agatgcaaca caggcgagcg gtctctgagc ctgctgaatt gtgaggagat caagtctcag	900
ttcgaggcgt ttgtgaagga catcatgctg aacaaggagg agaccaagaa ggagaatagc	960
ttcgagatgc agaaggcga tcagaatccc cagatcgac cacacgtat cagcgaggca	1020
agctccaaga ccacatccgt gctcagtgcc gccgagaagg gctactatac catgtccaac	1080
aatctggta cactggagaa cggcaagcag ctgaccgtga agagacaggg cctgtactat	1140
atctatgccc aggtgacatt ctgctctaatt cgggaggcct ctagccaggc ccctttatc	1200
gcctctctgt gcctgaagag cccaggcaga ttcgagcggc tcctgctgag ggccgccaac	1260
acccactcct ctgccaagcc atgcccacag cagacatcc acctggagg cgtgttcag	1320
ctgcagccag gagcctccgt gtttgtaat gtgacagacc catcccagggt gtctcacgga	1380
accggcttca catccttgg cctgctgaag ctgtga	1416

<210> 13  
 <211> 471  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 13

5

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 Ile 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 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	tcctgagcat	gctggtgctg	ctggtgca	ctctggcaa	tctggcgcc	60	
gagatgaagt	ccctgtctca	gaggagcgtg	ccaaacac	ctactgtt	catgtgtct	120	
ccaaccgaga	atggactgcc	aggaaggac	ggaagagatg	gaagggaggg	accaaggg	180	
gagaagggcg	accctggact	gcctggacca	atggactgt	ccggactgca	gggaccaaca	240	
ggccctgtgg	gaccaaagg	agagaatgga	agcgccggag	agccaggacc	taagggagag	300	
aggggcctgt	ccggcccccc	tggcctgcct	ggcatcccag	gccccgcgg	caaggagg	360	
ccttctggca	agcagggcaa	catcgacca	caggcaago	ctggacaaa	gggagaggca	420	
ggaccaaagg	gagaagtgg	agcacccggc	atgcagggca	gcaccggagc	aaaggatcc	480	
accggcccta	agggagagag	aggagcac	ttggatgcagg	gcgc	ccagg	540	
gcagcaggac	cagcaggacc	tgcaggccca	cagggcgccc	caggcagccg	ggcc	ccaccc	600
ggcctgaagg	gcgacagggg	agtgcagggc	gataggggca	tcaagggaga	gtccggactg	660	
ccagactctg	ccgcctgag	gcagcagatg	gaggccctga	agggcaagct	gcagaggctg	720	
gaggtggcct	tctccacta	ccagaaggcc	gccctgtttc	cagacggaca	caggagactg	780	
gataaggtgg	aggaggaggt	gaac	ctgcac	gaggattcg	tgttcatcaa	gaagctgaag	840
aggtgcaaca	agggcgaggg	cagcctgtcc	ctgctgaatt	gtgaggagat	gcggcgccag	900	
ttcgaggacc	tggtaagga	tatcaccctg	aacaaggagg	agaagaagga	gaattcttt	960	
gagatgcaga	ggggcgacga	ggatcctcag	atcg	cagcac	acgtggtgc	cgaggcaaac	1020
tctaatgccc	ccagcgtgt	gcagtggcc	aagaaggct	actataccat	gaagtcta	1080	
ctgg	tcatgc	tggagaatgg	caagcagctg	acagtgaaga	gagaggcct	gtactacgt	1140
tacacccagg	tgacattctg	cagcaacaga	gagcccagct	cccagcgcc	ttttatcgt	1200	
ggcctgtggc	tgaagccctc	tatcggaagc	gagaggatcc	tgctgaaggc	agccaatacc	1260	
cactctagct	cccagctgtg	cgagcagcag	tccgtgcacc	tgggaggcgt	ttcgagctg	1320	
caggcaggag	caagcgtt	cgtgaacgga	cagaggccag	ccaggtcatc	cacagagtgg	1380	
gcttctctag	cttggcctg	ctgaagctgt	ga			1412	

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

<400> 15

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

10

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 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*

5

<400> 16

# ES 2 841 300 T5

atgatcgaaa	catacaacca	aacttctccc	cgatctgcgg	ccactggact	gcccatcagc	60
atgaaaattt	ttatgtattt	acttaactgtt	tttcttatca	cccagatgtat	tggttcagca	120
cttttgctg	tgtatcttca	tagaagggtt	gacaagatag	aagatgaaag	gaatcttcat	180
gaagattttt	tattcatgaa	aacgatacacag	agatgcaaca	caggagaaag	atccttatcc	240
ttactgaact	gtgaggagat	taaaagccag	tttgaaggct	ttgtgaagga	tataatgtta	300
aacaaagagg	agacgaagaa	agaaaacagc	tttggaaatgc	aaaaaggtga	tcagaatctt	360
caaattgcgg	cacatgtcat	aagtgggccc	agcagtaaaa	caacatctgt	tttacagtgg	420
gctgaaaaag	gatactacac	catgagcaac	aacttggtaa	ccctggaaaa	tgggaaacag	480
ctgaccgtta	aaagacaagg	actctattat	atctatgccc	aagtccaccc	ctgttccaat	540
cgggaagctt	cgagtcaagc	tccatttata	gccagccctt	gcctaaagtc	ccccggtaga	600
ttcgagagaa	tcttactcag	agctgcaaat	acccacagtt	ccgccaacc	ttgcgggcaa	660
caatccattt	acttgggagg	agtatggaa	ttgcaaccag	gtgttcgg	ttttgtcaat	720
gtgactgatc	caagccaaat	gagccatggc	actggcttca	cgtcccttgg	tttactcaaa	780
ctctga						786

<210> 17

<211> 261

5 <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

5 <213> *Mus musculus*

<400> 18

atgatagaaa catacagcca accttccccc agatccgtgg caactggact tccagcgagc	60
atgaagattt ttatgtattt acttactgtt ttccttatca cccaaatgat tggatctgtg	120
cttttgctg tgtatcttca tagaagattt gataaggctg aagaggaagt aaaccttcat	180
qaagattttt tattcataaaa aaagctaaag agatgcaca aaggagaagg atctttatcc	240
ttgctgaact gtgaggagat gagaaggcaa tttgaagacc ttgtcaagga tataacgtta	300
aacaaagaag agaaaaaaga aaacagctt gaaatgc当地 gaggtgatga ggatcctcaa	360
attgcagcac acgttgtaag cgaagccaa agtaatgc当地 catccgttct acagtggcc	420
aagaaaggat attataccat gaaaagcaac ttggtaatgc ttgaaaatgg gaaacagctg	480
acggttaaaa gagaaggact ctattatgtc tacactcaag tcaccttctg ctctaattcg	540
10 gaggcttcga gtcaacgccc attcatgtc ggctctggc tgaagccag cagtgatct	600
gagagaatct tactcaaggc ggcaaatacc cacagttct cccagcttg cgagcagcag	660
tctgttcaact tggcgaggat gtttgaatta caagctggtg cttctgtt tgcacgtg	720
actgaagcaa gccaaatgtt ccacagagtt ggcttctcat ctttggctt 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															15
Leu	Pro	Ala	Ser	Met	Lys	Ile	Phe	Met	Tyr	Leu	Leu	Thr	Val	Phe	Leu
						20									30
Ile	Thr	Gln	Met	Ile	Gly	Ser	Val	Leu	Phe	Ala	Val	Tyr	Leu	His	Arg
						35									45
Arg	Leu	Asp	Lys	Val	Glu	Glu	Glu	Val	Asn	Leu	His	Glu	Asp	Phe	Val
						50									60
Phe	Ile	Lys	Lys	Leu	Lys	Arg	Cys	Asn	Lys	Gly	Glu	Gly	Ser	Leu	Ser
						65									80
Leu	Leu	Asn	Cys	Glu	Glu	Met	Arg	Arg	Gln	Phe	Glu	Asp	Leu	Val	Lys
						85									95
Asp	Ile	Thr	Leu	Asn	Lys	Glu	Glu	Lys	Lys	Glu	Asn	Ser	Phe	Glu	Met
						100									110
Gln	Arg	Gly	Asp	Glu	Asp	Pro	Gln	Ile	Ala	Ala	His	Val	Val	Ser	Glu
						115									125
Ala	Asn	Ser	Asn	Ala	Ala	Ser	Val	Leu	Gln	Trp	Ala	Lys	Lys	Gly	Tyr
						130									140
Tyr	Thr	Met	Lys	Ser	Asn	Leu	Val	Met	Leu	Glu	Asn	Gly	Lys	Gln	Leu
						145									160
Thr	Val	Lys	Arg	Glu	Gly	Leu	Tyr	Tyr	Val	Tyr	Thr	Gln	Val	Thr	Phe
						165									175
Cys	Ser	Asn	Arg	Glu	Pro	Ser	Ser	Gln	Arg	Pro	Phe	Ile	Val	Gly	Leu
						180									190
Trp	Leu	Lys	Pro	Ser	Ser	Gly	Ser	Glu	Arg	Ile	Leu	Leu	Lys	Ala	Ala
						195									205
Asn	Thr	His	Ser	Ser	Ser	Gln	Leu	Cys	Glu	Gln	Gln	Ser	Val	His	Leu
						210									220
Gly	Gly	Val	Phe	Glu	Leu	Gln	Ala	Gly	Ala	Ser	Val	Phe	Val	Asn	Val
						225									240
Thr	Glu	Ala	Ser	Gln	Val	Ile	His	Arg	Val	Gly	Phe	Ser	Ser	Phe	Gly
						245									255
Leu	Leu	Lys	Leu												
															260

# ES 2 841 300 T5

5 <210> 20  
 <211> 930  
 <212> ADN  
 <213> *Mus musculus*

<400> 20

atggatcagc acacactgga cgtggaggat accgctgacg ctaggcaccc agctggcacc tcctgaccc ttctgtccgc tctgtgcgc gacacaggac tgctggccga tgccgatctg ctgtctgaca cagtgcggcc aaccaacgccc gctctgccaa ccgatgctgc ttaccctgt gtgaacgtga gggacagaga ggctgtttgg ccacctgccc tgaacttctg cagccgcccac cctaaagctgt acggccttgtt ggccttgttgc ctgtgtgtc tgatcgctgc ttgcgtgcca atctttaccc ggacagagcc acggccccgtt ctgacaatca ccacatcccc caacctgggc accagggaga acaacgcccga tcaggtgaca ccagtgtctc acatcggttgc ccccaacacc acacagcagg gaagcccaagt gttcgccaag ctgttgctta agaaccaggc cagcctgtgc aacaccacac tgaactggca cagccaggac ggagctggaa gtccttacctt gtcccagggc ctgagatacg aggaggataa gaaggagctg gtgggtggact cccctggact gtactacgtg ttccctggaggc tgaagctgtc tccaaacctt acaaacaccg gccacaagggt gcagggatgg gtgtctctgg tgctgcaggc taagcccaag gtggacgtt tcgataacctt ggccctgacc gtggagctgt ttccctttagt catggagaac aagctggtgg acaggtcttgc gagccagctg ctgtgtgttgc aggctggcca caggctgtcc gtgggacttga gagccttacctt gcacggcc caggatgtttt acagagactg ggagctgagc taccctaaca ccacatcctt cggactgttt ctggtaagc ctgacaaccc atgggagtga	60 120 180 240 300 360 420 480 540 600 660 720 780 840 900 930
---	---

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
gccccggcct gccgcgtgtc gcccctggcc ctgggtggcg gcctgttatt actgtgtctg	120
ctggccgccc cctgcgcgt gttcctggca tgccttggg ccgtgagcgg agccagagcc	180
tccccaggct ctgcccggcag ccctcggctg agagagggac cagagctgtc cccagacgt	240
ccagcaggcc tgctggacct gaggcaggga atgtttgcc agctggtggc ccagaacgtg	300
ctgctgatcg acggcccccgt gtcctggta c tctgatcctg gcctggccgg cgtgtatctg	360
accggcggcc tgagctataa ggaggataca aaggagctgg tggtgtggcaa ggccggcgtg	420
tactacgtgt tcttccagct ggagctgagg agagtggtgg caggagaggg ctctggaagc	480
gtgtccctgg ccctgcacccgt gcagccccctg cggagcgcgg caggagccgc cgccctggcc	540
ctgaccgtgg acctgcccacc agccagctcc gaggcaagga attccgcctt cggctttcag	600
ggcagactgc tgcacctgtc tgccggacag aggctggag tgcacctgca caccgaggcc	660
agggcccgcc acgcattggca gctgacccag ggagcaacag tgctggccct gttccggcgtg	720
acacctgaga tcccagcagg cctgccttagc ccacggtccg agtga	765

5

<210> 22  
<211> 1389  
<212> ADN  
<213> *Mus musculus*  
  
<400> 22

## ES 2 841 300 T5

atgctgcctt	tcctgtccat	gctggtgctg	ctggtgcagc	cactggcaa	cctgggagcc	60
gagatgaagt	ctctgagcca	gcgcagcgtg	cctaacacct	gcacacttgt	catgtgtcc	120
cctacagaga	acggcctgcc	aggaaggac	ggaagagatg	gaagggaggg	accaagggga	180
gagaagggcg	accccggact	gcctggacca	atgggactga	gcggcctgca	gggaccaacc	240
ggccccgtgg	gacctaaggg	agagaacgga	tccgctggag	agccaggacc	taagggagag	300
agaggactgt	ctggaccacc	tggactgcca	ggaatcccag	gaccagctgg	caaggaggga	360
ccatccggca	agcagggaaa	catcgacca	cagggaaago	ctggacccaaa	gggagaggct	420
ggacctaagg	gagaagtggg	cgccccagga	atgcagggct	ctacaggac	taagggcagc	480
accggaccaa	agggagagag	gggagccccc	ggagtgcagg	gagccctgg	caacgctgga	540
gcgcgtggcc	cagccggacc	cgctggccct	cagggagccc	ccggctctag	gggaccacca	600
ggcctgaagg	gagacagagg	cgtccccgga	gatcggggca	tcaagggaga	gagccgcctg	660
cctgactccg	ccgctctgag	acagcagatg	gaggctctga	agggcaagct	gcagcggctg	720
gaggtggcct	tctcccaacta	ccagaaggcc	gctctgtttc	ctgacggaag	gacagagccc	780
aggcctgctc	tgaccatcac	cacatctcca	aacctggca	caagagagaa	caacgcccgt	840
caggtgaccc	ccgtgtctca	catcgatgc	cctaacacca	cacagcaggg	cagccctgtg	900
tttgc当地	tgctggctaa	gaaccaggcc	agcctgtgca	acaccacact	gaactggcac	960
tcccaggatg	gccc当地	ctcctacctg	tctcaggccc	tgc当地	ggaggacaag	1020
aaggagctgg	tgg当地	cccaggcctg	tactacgtgt	tc当地	gaagctgtcc	1080
cccacccctta	caa当地	acacaaggcg	cagggatggg	tgagc当地	gctgcaggct	1140
aagcccccagg	tggacgattt	cgacaacctg	gccctgaccg	tggagctgtt	tc当地	1200
atggagaaca	agctggtgg	tagatcctgg	agccagctgc	tgctgctgaa	ggctggcac	1260
cgccctgagcg	tggc当地	ggcttacctg	cacggagctc	aggacgctta	caggattgg	1320
gagctgtcct	accctaaca	cacatcttc	ggc当地	tggtaagcc	agacaacccc	1380
tgggagtgaa						1389

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

<400> 23

# ES 2 841 300 T5

atgctgctgt tcctgctgtc cgccctggtg ctgctgaccc agcctctggg ctacctggag	60
gccgagatga agaccttattc tcaccggaca atgccaagcg cctgcacact ggtcatgtgc	120
agcagcgtgg agtctggctt gccaggaagg gacggaaggg atggaaggga gggacctaga	180
ggcgagaagg gcgaccctgg cctgccagga gcagcaggac aggcaagaa gccccggcag	240
gcggggcccg tgggacctaa gggcgacaac ggaagcgtgg gagagccagg accaaaggc	300
gataccggcc cttccggacc acctggacca ccaggcgtgc ctggcccagc cggcaggag	360
ggccctctgg gcaagcaggc caatatggc ccacaggga agcccgcccc taagggcgag	420
ggcgccccca agggcgaagt gggcgccctt ggcatgcagg gaagcgcgg agcccgccgc	480
ctggccggac ctaaggcgaa gagaggcgtg cctggagaga ggggcgtgcc aggaaacaca	540
ggcgcagcag gatctgcgg agcaatggga ccccaggca gccctggcgc cagggccct	600
ccaggcctga agggcgacaa gggcatccca ggcataagg gagcaaagg agagagcggc	660
ctgccagatg tggccctccct ggcgcaggag gtggaggccc tgcaaggcca ggtgcagcac	720
ctgcaggccg cctctctca gtacaagaag gtggagctgt ttccaaacgg cgcctgcccc	780
tggggcgtga gcggagcccg ggcctccca ggctctgcgg ccagccctag gctgcgcgag	840
ggaccagagc tgagccaga cgtccagca ggcctgtgg acctgagaca gggaatgttc	900
gcccagctgg tggcccaagaa tgtgctgtc atcgacggcc cactgtcctg gtactctgtat	960
ccaggcctgg cggcgtgtc cctgaccggc ggcctgttataaggagga tacaaaggag	1020
ctgggtgtgg ccaaggccgg cgttactac gtgttattcc agctggagct gaggagatg	1080
gtggcaggag agggatccgg atctgtgagc ctggccctga acctgcagcc cctgcgggtcc	1140
gcccgcaggag ccgcgcgcctt ggcctgtacc gtggacctgc cacctgcctc tagcgaggca	1200
cgcattcccg ctttcggctt tcagggccgg ctgctgcacc tgtctgcgg acagagactg	1260
ggagtgcacc tgcacacccga ggcccgccc agacacgcct ggcagctgac ccaggagca	1320
acagtgcctgg gcctgttag ggtgacacact gagatccag cggcctgcc aagccccccgc	1380
tccgagtga	1389

<210> 24  
<211> 522  
<212> ADN  
<213> *Mus musculus*  
<400> 24

# ES 2 841 300 T5

	atggaggaga tgcctctgag ggagagctcc ccacagaggg ccgagagatg caagaagagc	60
	tggctgctgt gcacatcgcc tctgctgctg atgctgctgt gctctctggg caccctgtac	120
	tacacaagcc tgaagccaac cgccatcgag tcctgtatgg tgaagttcga gctgtctagc	180
	tccaagtggc acatgacatc ccccaagcct cactgcgtga acaccacatc tgacggaaag	240
	ctgaagatcc tgcagagcgg cacctacctg atctacggac aggtcatccc cgtggacaag	300
	aagtacatca aggataacgc cccttcgtg gtgcagatct acaagaagaa cgacgtgtg	360
	cagacactga tgaacgattt tcagatcctg cccatggcg gagtgtacga gctgcacgct	420
	ggcgacaaca tctacctgaa gttcaactcc aaggatcaca tccagaagac caacacatac	480
	tgggaaatca tcctgatgcc agatctgccc tttatctctt ga	522
	<210> 25	
	<211> 600	
5	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 25	
	atgaccctgc acccaagccc catcacatgc gagttcctgt tttctaccgc cctgatcagc	60
	ccaaagatgt gcctgagcca cctggagaat atgcccctgt cccactctcg gacacaggga	120
	gccccagagaa gctccctggaa gctgtggctg ttctgtctta tcgtgtatgt gctgttcctg	180
	tgcagctttt cctggctgtat ctcatcttt ctgcagctgg agacagccaa ggaggattgc	240
	atggccaagt ttggccctct gccatccaag tggcagatgg cctctagcga gcccccttgc	300
	gtgaacaagg tgagcgactg gaagctggag atcctgcaga acggcctgta cctgatctat	360
	ggccagggtgg ccccccaacgc caattacaac gacgtggccc ctttcgaggt ggggtgttat	420
	aagaacaagg atatgtatcca gaccctgaca aataagtctta agatccagaa cgtggccggc	480
	acataacgagc tgcacgtggg cgacaccatc gacctgtatct tcaacagcga gcaccagggtg	540
10	ctgaagaaca atacatattg gggcatcatc ctgtgtggcca acccccagtt tatctcttga	600
	<210> 26	
	<211> 1164	
15	<212> ADN	
	<213> <i>Mus musculus</i>	
	<400> 26	

# ES 2 841 300 T5

	atgctgcctt tcctgtctat gctggtgctg ctggtcagc cactggcaa cctgggagcc	60
	gagatgaaga gcctgtccca gagatccgtg cccaacacct gcacactgtt catgtgtct	120
	cctaccgaga acggcctgcc aggaaggac ggaagagatg gaagggaggg acctcgggaa	180
	gagaagggcg acccaggact gcctggacca atggactga gcccctgca gggaccaaca	240
	ggccccgtgg gacctaagg agagaacgga agcgccggag agccaggacc taagggagag	300
	aggggactgt ccggaccacc tggactgcct ggaatcccag gaccagctgg caaggaggaa	360
	ccatccggca agcaggaaa catcgacca caggaaagc ctggacccaa gggagaggct	420
	ggaccaaagg gagaagtgg cgctcctgga atgcaggctt ccaccggacg caagggtct	480
	acaggacca aaggagagag gggagctccc ggagtgcagg gagccctgg caacgctgga	540
	gcccgtggcc cagccggacc cgctggccct cagggagccc caggcagcag gggaccaccc	600
	ggcctgaagg ggcacagggg cgtgccagga gatagggca tcaaggaga gtctggcctg	660
	ccagacagcg ccgctctgag acagcagatg gaggccctga agggcaagct gcagcggctg	720
	gaggtggctt tctcccaacta ccagaaggcc gctctgtttc cagatggcag cctgaagccc	780
	accgcccattcg agtcctgcat ggtgaagttt gagctgagct cctctaagtgc acatgaca	840
	tctcccaagc ctcactgcgt gaacaccaca tctgacggca agctgaagat cctgcagagc	900
	ggcacctacc tgatctacgg ccaggtcatc cccgtggaca agaagtacat caaggataac	960
	gccccttcg tggtgcatat ctacaagaag aacgacgtgc tgcagacact gatgaacgat	1020
	tttcagatcc tgccaatcgg cggagtgtac gagctgcacg ctggcacaat catctacctg	1080
	aagttcaact ctaaggatca catccagaag accaacacat actggggcat catcctgtat	1140
	ccagatctgc ccttatcag ctga	1164
	<210> 27	
	<211> 1152	
5	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 27	
	atgctgctgt tcctgtgtc tgccctgggt ctgctgaccc agccactggg ctacctggag	60
	gccgagatga agacctattc ccacccaca atgccttctg cctgcacact ggtcatgtgc	120
	agcagcgtgg agagcggctt gccaggaagg gacggaagag atggaaggaa gggacccaga	180
10	ggcgagaagg gcgaccctgg cctgccagga gcagcaggac aggcaggaat gccaggccag	240

# ES 2 841 300 T5

	gccccggccctaa gggcgacaat ggatccgtgg gagagccagg accaaaggc	300
	gataccggcc cttctggacc accttggacca ccaggcgtgc ctggaccacg aggaagagag	360
	ggacctctgg gcaagcaggg aaacatcgga ccacaggca agccaggccc taagggcgag	420
	gcaggccccca agggcgaagt gggcgccct ggcattgcagg gatccgcgg agccaggggc	480
	ctggccggac ctaaggcga gcgcggcgtg cctggagaga gggcggtgcc aggaataaca	540
	ggcgacagcag gatctgcgg agcaatggc ccacaggca gccccggcgc cagaggccct	600
	ccaggcctga agggcgcacaa gggatccct ggcataagg gagcaaagg agagacggc	660
	ctgccagacg tggcctccct gaggcagcag gtggaggccc tgcaggaca ggtcagcac	720
	ctgcaggccg cttcagcca gtacaagaag gtggagctgt ttccaaatgg cgagacagcc	780
	aaggagccct gcatggccaa gttcgccca ctgcccagca agtggcagat ggcctctagc	840
	gagccccctt gcgtgaacaa ggtgagcgt tggagctgg agatcctgca gaacggcctg	900
	tacctgatct atggccaggt ggcaccaac gccaattaca acgacgtggc cccttttag	960
	gtgcggctgt ataagaacaa ggtatgtatc cagaccctga caaataagtc taagatccag	1020
	aacgtggag gcacctacga gctgcacgtg ggcacacaa tcgacctgtat cttcaacagc	1080
	gagcaccagg tgctgaagaa caatacatat tggggcatca tcctgctggc caaccccccag	1140
	tttatctcctt ga	1152
	<210> 28	
	<211> 597	
5	<212> ADN	
	<213> <i>Mus musculus</i>	
	<400> 28	
	atggaggggcg agggagtgcg gcccctggat gagaacctgg agaacggc tcggcctcgc	60
	ttcaagtggc agaagaccct ggggtgggtg gtgtctggaa tcaaggggcgc cggaaatgtgt	120
	ctgtgttttta tctacgtgtg cctgcagctg agtcctctc cggccaaagga tccccctatc	180
	cagaggctga gaggagctgt gaccagggtgc gaggacggac agctgttcat cagctctac	240
	aagaacgagt accagacaaat ggaggtgcag aacaacagcg tggtcatcaa gtgtgtatggc	300
	ctgtacatca tctacctgaa gggatccttc tttcaggagg tgaagatcga cctgcacttt	360
	cgggaggatc acaacccaaat ctctatcccc atgtgtaaacg acggcaggag aatcggttgc	420
	acagtggtgg ccagcctggc ttttaaggac aagggtgtacc tgaccgtgaa cgccccagat	480
	acactgtgcg agcacctgca gatcaacgcg ggagagctga tcgtggtgca gctgacccct	540
10	ggctactgtg ctccagaggg atcttaccac agcacagtga accaggtgcc cctgtga	597
	<210> 29	
	<211> 552	
	<212> ADN	
15	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 29	

## ES 2 841 300 T5

atggagaggg tgcagccccct ggaggagaac gtgggaaatg ccgcggccgtagattcgag 60  
 aggaacaacgc tgctgtgtgtt ggcctctgtg atccaggggcc tggggctgtgt gctgtgtttc 120  
 acctacatct gtctgcactt ttctgccttg caggtgagcc acagataccc ccgcataccag 180  
 agcatcaagg tgcagttcac cgagtataag aaggagaagg gctttatctt gacatcccag 240  
 aaggaggacg agatcatgaa ggtgcagaac aattctgtga tcataactg cgatggcttc 300  
 tacctgtatct ccctgaaggg ctattttctt caggaagtgtat atatcagcct gcactatcag 360  
 aaggacgagg agccactgtt tcagctgtgtt aaggtgcggaa gcgtgaattc cctgtatgg 420  
 gccagcctga cctacaagga caaggtgttat ctgaacgtgtt ccacagataaa tacatccctg 480  
 gacgatttcc acgtgtgtgtt cggcgagctg atcctgtatcc accagaatcc cggcgagttt 540  
 tgcgtgtgtt ga 552

<210> 30  
 <211> 1215  
 5 <212> ADN  
 <213> *Mus musculus*

<400> 30

atgcgtccct tcctgtccat gctgggtgtt ctgggtcaggc ctctggcaaa cctggggagcc 60  
 gagatgaagt ctctgagcca gagatccgtt ccaaacaccc gcacactgtt catgtgtctt 120  
 cccaccgaga acggcctgcc ttggaaaggac ggaagagatg gaagggaggg accccgggg 180  
 gagaagggcg atcctggactt gcccaggacccat atggggactgtt gccggcctgtca gggaccac 240  
 ggccccgtgg gacctaaggag agagaacggg agcgccggag agccaggacc aaagggagag 300  
 aggggactgtt ccggccacc ttggactgtt ggaatccctg gaccagctgg caaggaggaa 360  
 cttccggca agcaggaaa catcggttccat caggaaaggcc caggacccatggg gggagggct 420  
 ggaccaaagg gagaagtggg cgctcccgatccat atgcagggtt ctaccggacc caagggcacc 480  
 acaggacccatccat agggagagag gggaggttccat ggagtgcagg gagccccggg caacgctgg 540  
 gctgctggac cagctggacc agctggccctt cagggagccccc caggctcttag gggaccacca 600  
 ggcctgaagg gcgacaggggg cgtgccagga gatagggccat tcaagggaga gaggccctgt 660  
 ccagattcccg ccgcctgtttagt acagcaggatg gaggccctgtttagt agggcaagctt gcagcggctgt 720  
 gaggtggctt tcagccactt ccagaaggcc gctctgtttt ctgacggcagg ctccctatccat 780  
 gccaaggatccatccat gggctgcgc gtagctgtgtttagt ccaggtgcga ggtatggccag 840  
 ctgttcatca gctccctatccat gaaacggtttagt cagacaatgg aggtgcagaa caactctgtt 900  
 gtcatcaagt gtgacggccctt gtacatcatc tacctgtttagt gcagcttctt tcaggagggtt 960

aagatcgacc tgcacttttagt agaggatcac aaccatctt ccacccat gctgaacgac 1020  
 ggcaggagaa tcgtgtttcac cgtggggcc tctctggctt ttaaggacaa ggtgtacctgt 1080  
 accgtgtttagt ccccccgtttagt actgtgcgtttagt cacctgtgtttagt tcaacgacgg cgagctgtttagt 1140  
 gtgggtgcaggc tgacccctgg atactgtgtttagt ccagagggtttagt cctaccactc tacagtgtttagt 1200  
 10 caggtgcctc tgtgtttagt 1215

&lt;210&gt; 31

## ES 2 841 300 T5

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

5      <400> 31

atgatgctgt	tcctgcttag	cgcctggtg	ctgctgaccc	agccactggg	ctaccctggag	60
gccgagatga	agacctattc	ccacagaaca	atgccttctg	cctgcacact	ggtcatgtgc	120
agcagcgtgg	agtccggct	gccaggaagg	gacggcagag	atggcaggg	gggccccagg	180
ggcgagaagg	gcgaccccg	cctgcctgga	gcagcaggcc	aggccggcat	gccaggccag	240
gcccggcccaq	tgggccccaa	gggcgacaac	ggcagcgtgg	gcgagcccg	ccctaagggc	300
gataccggcc	cctccggccc	ccctggccca	cccgccgtgc	caggaccagc	aggaagggag	360
ggaccactgg	gcaagcaggg	caatatcgga	cctcagggca	agcctggacc	aaagggagag	420
gcaggaccaa	agggagaagt	gggcgcacct	ggcatgcagg	gatctgcgg	agccgggggc	480
ctggccggcc	ccaagggcga	gagaggcgtg	cccgccgaga	ggggcgtgcc	tggcaacaca	540
ggagccggcc	gctccggccgg	cccatggga	cctcagggtct	ctccaggagc	cagaggccct	600
ccaggcctga	agggcgacaa	ggaatccct	ggcgataagg	gagcaaagg	agagagcggc	660
ctgccagacg	tggcctccct	ggggcagcag	gtggaggccc	tgcagggcca	ggtgcagcac	720
ctgcaggccg	cttcagcca	gtacaagaag	gtggagctgt	ttcctaattgg	cgtgtctcac	780
cgtatccac	ggatccagag	catcaaggtg	cagttcaccc	agtataagaa	ggagaagggc	840
tttatcctga	catctcagaa	ggaggacgag	atcatgaagg	tgcagaacaa	tagcgtgatc	900
atcaactgcg	atggcttcta	cctgatcagc	ctgaagggtct	atttttccca	ggaagtgaat	960
atctctctgc	actatcagaa	ggatgaggag	cctctgtttc	agctgaagaa	ggtgagatct	1020
gtgaacagcc	tgttgtggc	ctccctgacc	tacaaggaca	aggtgtatct	gaacgtgacc	1080
acagataata	catctctgga	cgatttccac	gtgaacggcg	gcgagctgat	cctgatccac	1140
cagaatcccg	gcgagtttg	cgtgctgtga				1170

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

<400> 32

15

## ES 2 841 300 T5

atgcagctga agtgtccatg cttcgtgtcc ctggaaacaa gacagcccg	60
ctgcacgtga gctccggctt ctttagcgcc ctggggctgt ttctgctgt gctgtctagt	120
ctgtgcgcgg cttccgcaga gactgaagtc ggagccatgg tggcagtaa cgtggctctg	180
tcatgcatcg acccacacccg acggcatttc aacctgtctg gcctgtacgt gtattggcag	240
attgagaatc ccgaagtgtc agtcacctac tatctgcattt acaagagccc agggatcaac	300
gtggactcaa gctataaaaa tagggggcac ctgtccctgg attctatgaa gcaggaaac	360
ttcagcctgt acctgaaaaaaaaa tgtgaccctt caggacacac aggagttcac ttgtcgctc	420
tttatgaaca ctgcaaccga actggtaag attctggagg aagtggtccg gctgagagtc	480
gcagccaaact ttagcactcc tgtgatctct accagtgatt cctctaattcc aggccaggag	540
cggacatata cttgcatgtc taagaacgga taccggaaac ctaatctgtt ttggatcaac	600
accacagaca atagtctgtat tgataccgct ctgcagaaca atacagtcta cctgaacaag	660
ctggggctgt atgacgtgtat ctctactctg cggctgccat ggaccagtag aggagatgt	720
ctgtgctgctg tggagaacgt ggcctgcac cagaatatca cctcaatttg ccaggctgag	780
tcctttacccg gcaacaatac aaagaatcct caggagacac ataacaatga actgaaagt	840
ctgggtccag tgctggccgt cctggctgca gcagcttcg tgtctttat catctacaga	900
aggacccgccc ctcaccgctc atacactgga cctaagacccg tgcagctgga actgacagac	960
catgcttga	969

5

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

&lt;400&gt; 33

# ES 2 841 300 T5

atgcgtctgg gttcacctgg tctgctgttt ctgctgtttt caagtctgcg tgctgatact	60
caggagaagg aagtccgggc tatggtcgga agtgacgtgg agctgtcatg cgcttgtccc	120
gaagggtccc ggttcgacct gaacgatgtc tacgtgtatt ggcagacctc tgagagtaag	180
accgtggtca cataccacat ccctcagaac tccagctgg aaaatgtgga ttcaaggtat	240
cggaacagag ccctgatgtc ccctgctggc atgctgcggg gagacttctc tctgagactg	300
ttaatgtga caccacagga tgagcagaaa ttccattgcc tggctctgtc acagtccctg	360
ggatttcagg aggtgcttag tgcgaagtg actctgcacg tcgcgcctaa tttctccgtg	420
cctgtggtca gcgcaccaca tagccccctc caggacgago tgacctttac atgtacttcc	480
atcaacggct acccccggcc taacgtgtac tggattaaca agactgacaa tagcctgctg	540
gatcaggcac tgcagaacga caccgtgttt ctgaatatgc gaggactgta cgatgtggtc	600
agcgtcctgc gtattgccag gaccccatct gtgaacatcg ggtgctgtat tgagaacgtc	660
ctgctgcagc agaatctgac agtggggagc cagactggta atgacatcg cgagagggat	720
aagattacccg aaaacccctgt gagtacaggc gagaagaacg cagccacatg gtcaatcctg	780
gctgtgtgt gcctgctggt ggtcgtggct gtcgcaattg gctgggtgtg ccgcgatcgg	840
tgtctgcagc actcttatgc cggtgcttgg gcagtggatc cagagactga actgaccggc	900
<b>catgtctaa</b>	<b>909</b>

5

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

<400> 34

## ES 2 841 300 T5

cttaagatgg aaactgatac tctgctgctc tgggtgctgc tcctctgggt gcctggttca	60
actggggaca ttgcacgggc tgacattgtg atgaccaga ccacactgag cctgcccgta	120
tccctgggcg accaggccag catctcctgc cggagctccc agtctatcgt gcacagcaac	180
ggaaacacat acctggagtg gtatctgcag aagcctggcc agtccccaaa gctgctgatc	240
tacaagggtgt ccaacaggtt cagcggcgtg cctgaccgct tttctggaag cggctccgga	300
acagatttca ccctgaagat cagcagggtg gaggctgagg acctggcgt gtactactgc	360
ttccaggat cccacgtgcc ttacacctt ggccggaggca caaagctgga gatcaagaga	420
gccgatgctg ctccaaccgt gtctggaagc ggaggcgggg gttctggagg cggcggcgc	480
ggtggcggag ggtctgaggc taagctgcag gagagcggcc cctgcttgtt gaagcctgga	540
gccagcgtga agatgtcctg taaggattct gatacacact tcacagacta ctacatgaac	600
tgggtgaagc agagccacgg caagtccctg gagtgatcg gagtgatcaa cccttacaac	660
ggcgcacacct cttacaacca gaagtttaag ggcaaggcca ccctgacagt ggataagtct	720
agctccaccc cttacatgga gctgaacagc ctgacatccg aggattctgc cgtgtactac	780
tgtgcttaggt actacggaag ctgggtcgcc tactggggcc agggAACACT gatcaccgtg	840
tccacagcca agaccacacc ccctagcgtg taccctctgg ctcttagtgc tagcagaggc	900
tgcaagccat gcatctgtac cgtccccgag gtgagcagcg tttcatctt tccacccaaag	960
cccaaggacg tgctgaccat cacactgacc cctaagggtga catgcgttgtt ggtggatatac	1020
agcaaggacg atccagaggt gcagttctcc tggttgtgg acgtatgttga ggtgcacacc	1080
gccccagacac agccaaggga ggagcagttc aactccacct ttagatccgt gtctgagctg	1140
cccatcatgc accaggactg gctgaacgga aaggagttca agtgcgggt gaactccgccc	1200
gctttctctg ctccaatcga gaagaccatc tctaagacaa agggccccc aaaggctcca	1260
caggtgtaca ccatccctcc acccaaggag cagatggcta aggataaggt gagctgacc	1320
tgtatgatca cagacttctt tcccgaggat atcacagtgg agtggcagtg gaacggacag	1380
cctgccgaga actacaagaa caccagcca atcatggaca cagatggctc ttacttcgtg	1440
tacagcaagc tgaacgtgca gaagtctaac tgggaggctg gcaacacctt cacctgcagg	1500
gtgctgcacg aaggcttcca taatcaccac accgaaaaga gcctcagtca cagccctggg	1560
aatgaggcg cgcc	1574

&lt;210&gt; 35

&lt;211&gt; 1484

&lt;212&gt; ADN

<213> *Homo sapiens*

5

&lt;400&gt; 35

# ES 2 841 300 T5

	cttaagatgg aaactgacac cctgctgctg tgggtactgc tgctgtgggt gcctggatcc	60
	accggcgata tcgtgctgac ccagtctcct gcacactgat gtctgtcacc aggggaggcga	120
	gcaacactgt cttgttagagc cagccagtct gtggaaagct cttacctggc ttggtatcag	180
	cagaagccag gccaggcacc caggctgctg atctacggag cttcagccg ggccactggc	240
	attccagaca gtttctctgg aagtggctca gggaccgact tcaccctgac catcagccga	300
	ctggagcccg aagacttcgc cgttactat tgccagcagt acggctctag tccttgact	360
	tttggacagg gcaccaaagt ggagatcaag cgccgggggg gaggctctgg gggaggcggg	420
	agtggaggcg ggggatcaca ggtccagctg gtggaaagcg gcgggggagt ggtccagcca	480
	ggccggagcc tgccgctgag ctgcggcgct tcaggattca cattttcaag ctataccatg	540
	cactgggtcc ggcaggcacc agggaaaggga ctggagtggg tgaccttcat cagctatgac	600
	ggcaacaaca agtattacgc tgattccgtg aaaggaggt ttaccattag ccgcgacaac	660
	tccaaaata cactgtaccc gcagatgaac agcctgcggg ccgaggatac tgctatctac	720
	tattgcgcaa gaaccgggtg gctgggaccc ttcgactatt ggggccaggg gactctggc	780
	accgtgtcct ctgataagac acacacatgc cttccctgac ctgcaccaga gctgctggc	840
	gggcacatccg tttcctgtt tccacccaag cctaaagaca ccctgatgat cagccggaca	900
	cctgaagtca cttgcgttgt cgtggacgtg agtcacgagg atccagaagt caagttaac	960
	tggtacgtgg atggcgtcga ggtcataat gccaagacca aacctcgcga ggaacagtac	1020
	aatagcacat atcgagtctg gtccgtcctg actgtgctgc atcaggattg gctgaacggc	1080
	aaagagtata agtgc当地 agtgc当地 agtgc当地 ccccaatcga gaaaacaatt	1140
	tccaggcata aaggccagcc cagggAACCT caggtgtaca ctctgcctcc aagtccggag	1200
	gaaatgacca agaaccagggt gagcctgacc tgtctggta aagggttcta tccatcagac	1260
	attgcagtgg agtggaaaag caatggacag cccgaaaaca attacaagac cacacccct	1320
	gtgctggaca gcgatggcgc cttctttctg tattctaagc tgactgtgga taaaagtgc	1380
	tggcagcagg ggaacgtctt tagctgttcc gtgtgcatac aggctctgca caatcattac	1440
	acacagaagt ctctgagtc gtcacccggc aaatgaggcg cgcc	1484
	<210> 36	
	<211> 632	
5	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> promotor CMV	
10	<400> 36	

# ES 2 841 300 T5

	gttgacattt attattgact agttatataat agtaatcaat tacggggtca ttagttcata	60
	gccccatataat ggagttccgc gttacataac ttacggtaaa tggcccgct ggctgaccgc	120
	ccaacgaccc ccgcccattt acgtcaataa tgacgtatgt tcccatagta acgccaataag	180
	ggactttcca ttgacgtcaa tgggtggagt attacggta aactgcccac ttggcagttac	240
	atcaagtgtt tcatatgcca agtacgcccc ctattgacgt caatgacggt aaatggcccg	300
	cctggcatta tgcccatgtac atgaccttat gggactttcc tacttggcag tacatctacg	360
	tattagtcat cgcttattacc atgggtatgc ggtttggca gtacatcaat gggcgtggat	420
	agcgggttga ctcacgggaa tttccaagtc tccacccat tgacgtcaat gggagttgt	480
	tttggcacca aaatcaacgg gactttccaa aatgtcgtaa caactccgccc ccattgacgc	540
	aaatgggcgg taggcgtgtt cgggtggagg tctatataag cagagctctc tggcttaacta	600
	gagaacccac tgcttactgg cttatcgaaa tt	632
5	<210> 37 <211> 394 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> promotor RSV <400> 37	
	tgtacgggcc agatataacgc gtatctgagg ggacttagggt gtgttttaggc gaaaagcggg	60
	gcttcgggtt tacgcggtta ggagtccctt caggatatacg tagttcgct tttgcataagg	120
	gagggggaaa tgttgtctt tgcaatacac ttgttgtctt gcaacatggt aacgatgagt	180
	tagcaacatg ctttacaagg agagaaaaag caccgtgcat gccgatttgtt ggaagtaagg	240
	tggtacgatc gtgccttattt aggaaggcaa cagacaggcc tgacatggat tggacgaacc	300
	actgaattcc gcattgcaga gataattgtt ttaagtgcc tagctcgata caataaacgc	360
	catttgcacca ttcaccacat tggtgtgcac ctcc	394
15	<210> 38 <211> 188 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> poliA de BGH <400> 38	
	ctgtgccttc tagttgccag ccatctgtt tttgccttc cccctgtgcct tcattgaccc	60
	tggaaagggtgc cactcccaact gtccttcctt aataaaatgtt gggaaattgca tcgcattgtc	120
	tgagtaggttgc tcattctattt ctgggggtt ggggtggggca 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	
5	<400>	39	
	gacatgataa gatacattga tgagtttggaa caaaccacaa ctagaatgca gtgaaaaaaaaa	60	
	tgcttttattt tgaaaatttg ttagtgcattt gctttatggaa attttgtt gatgttattt	120	
	ctttatgtt aaccattata agctgcaata aacaagttaa caacaacaat tgcatttattt	180	
	ttatgtttca ggttcagggg gaggtgtggg aggtttttt aagcaagtaa aacctctaca	240	
	aatgtggta	249	
10	<210>	40	
	<211>	345	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia artificial	
15	<220>		
	<223>	promotor potenciador de SV40	
	<400>	40	
	gctgtggaaat gtgtgtcagt taggggtgtgg aaagtccccca ggctcccccag caggcagaag	60	
	tatgcaaagc atgcatactca attagtcagc aaccagggtgt ggaaagtccc caggctcccc	120	
	agcaggcaga agtatgcaaa gcatgcatact caatttagtca gcaaccatag tcccgccact	180	
	aactccgccc atcccgcccc taactccgccc cagttccgccc cattctccgc cccatggctg	240	
	actaattttt tttatattatg cagaggccga ggccgcctcg gcctctgagc tattccagaa	300	
	gtagtggaa ggctttttt gaggcctagg cttttgc当地 aagct	345	
20	<210>	41	
	<211>	99	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia artificial	
25	<220>		
	<223>	poliA de beta-globina de conejo	
	<400>	41	
	gacctctggc taataaaagga aattttttt cattgcaata gtgtgttggaa atttttttgt	60	
30	tctctcaactc ggaaggacat atggggggc aaatcattt	99	
	<210>	42	
	<211>	723	
	<212>	ADN	
35	<213>	Secuencia artificial	
	<220>		
	<223>	GFP	
40	<400>	42	

# ES 2 841 300 T5

	accatggta gcaaggcgca ggagctgttc accggggtgg tgcccatcct ggtcgagctg	60
	gacggcgacg taaacggcca caagttcagc gtgtccggcg agggcgaggg cgatgccacc	120
	tacggcaagc tgaccctgaa gttcatctgc accacccgca agctgcccgt gccctggccc	180
	accctcgtga ccaccctgac ctacggcgtg cagtgttca gccgctaccc cgaccacatg	240
	aagcagcacg acttcttcaa gtccgcatg cccgaaggct acgtccagga gcgcaccatc	300
	ttcttcaagg acgacggcaa ctacaagacc cgccgcccagg tgaagttcga gggcgacacc	360
	ctggtaacc gcatcgagct gaagggcatc gacttcaagg aggacggcaa catcctgggg	420
	cacaagctgg agtacaacta caacagccac aacgtctata tcatggccga caagcagaag	480
	aacggcatca aggtgaactt caagatccgc cacaacatcg aggacggcag cgtcgagctc	540
	gccgaccact accagcagaa caccggcatc ggcgacggcc ccgtgctgct gcccggacaac	600
	cactacctga gcacccagtc cgcctgagc aaagacccca acgagaagcg cgatcacatg	660
	gtcctgctgg agttcgtgac cgccgccccgg atcactctcg gcatggacga gctgtacaag	720
	taa	723
5	<210> 43 <211> 454 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> LTR MoMuLV <400> 43	
	ttaattaagt aacgccattt tgcaaggcat ggaaaaatac ataactgaga atagagaagt	60
	ttagatcaag gtcaggaaca gatggaacag ctgaatatgg gccaaacagg atatctgtgg	120
	taaggcgttc ctgccccggc tcagggccaa gaacagatgg aacagctgaa tatgggccaa	180
	acaggatatac tgtggtaagc agttcctgcc ccggctcagg gccaaagaaca gatggcccc	240
	agatgcggtc cagccctcag cagttctag agaaccatca gatgtttcca gggtgcccc	300
	aggacctgaa atgaccctgt gccttatttg aactaaccaa tcagttcgct ttcgtttct	360
	gttcgcgcgc ttctgctccc cgagctcaat aaaagagccc acaacccttc actcggggcg	420
	ccagtcctcc gattgactga gtcggccgct taag	454
15	<210> 44 <211> 1349 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Promotor EFlalfa <400> 44	

# ES 2 841 300 T5

ttaattaaga gtaattcata caaaaggact cgccccgtgcc ttggggaaatc ccagggaccg	60
tcgttaaact cccactaacg tagAACCCAG agatcgctgc gttccccc cctcacccgc	120
ccgctctcgat catcaactgag gtggagaaga gcatgcgtga ggctccggtg cccgtcagtgc	180
ggcagagcgc acatcgccca cagtccccga gaagttgggg ggaggggtcg gcaattgaac	240
cggtgtccatg agaagggtggc gcggggtaaa ctggggaaagt gatgtcgtgt actggctccg	300
ccttttcccc gagggtgggg gagaaccgta tataagtgcata gtagtcggcc tgaacgttct	360
ttttcgcaac gggtttgcgg ccagaacaca ggtaagtgcctt gtgtgtggtt cccgcggggcc	420
tggcctctttt acgggttatg gcccttgcgt gccttgcattt acttccacgc ccctggctgc	480
agtacgtgat tcttgcattt gagcttcggg ttggaaagtgg gtgggagagt tcgaggcatt	540
gcgggttaagg agcccccattcg cctcgatgcattt gagttgaggc ctggcttggg cgctggggcc	600
gcgcgcgtgcg aatctgtgg caccttcgcg cctgtctgcg tgcttcgat aagtctctag	660
ccatTTTTAAATTTTGTGATGA CCTGCTGCATA CGCTTTTTCTGGCAAGAT AGTCTGTAA	720
ATGCAGGGCCA AGATCTGCAC ACTGGTATTG CGGTTTTGG GGCGCGGGGC GGCGACGGGG	780
CCCGTGCCTC CCAGCGCACA TGTTCGGCATA GGCGGGGCCT GCGAGCGCGG CCACCGAGAA	840
TGGGACGGGG GTAGTCCTAA GCTGGCCGGC ATGCTCTGGT GCCTGGCCTC GCGCGCCGT	900
GTATCGCCCC GCCCTGGCGC GCAAGGGCTGG CCCGGTCCGG ACCAGTTGC GTAGCGGAAA	960
GATGGCCGCT TCCCGCCCT GCTGCAGGGG GCTCAAATG GAGGACCGGG CGCTCGGGAG	1020
AGCGGGCGGG TGAGTCACCC ACACAAAGGA AAAGGGCCTT TCCGTCTCA GCGTCTGGTT	1080
CATGTGACTC CACGGAGTAC CGGGCGCCGT CCAGGCACCT CGATTAGTT TCAGAGTTTT	1140
GGAGTACGTC GTCTTAGGT TGGGGGGAGG GTTTTATGC GATGGAGTT CCCCACACTG	1200
AGTGGGTGGA GACTGAAGTT AGGCCAGCTT GGCACATTGAT GTAATTCTCC TTGGAATTG	1260
CCCTTTTGAGTTGGATCT TGTTTCATTCA CAAGCCTCA GACAGTGGTT CAAAGTTTT	1320
TTCTTCATTCA TAGGTGTCG TGACTTAAG	1349

<210> 45

<211> 481

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> poliA de HGH

10

<400> 45

ES 2 841 300 T5

## 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.
- 5 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.
- 10 3. El virus de la reivindicación 1 o 2, que además comprende un gen que codifica la proteína fusogénica.
- 15 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 infeccional equina (EIAV) de los que se ha delecionado el péptido R.
- 20 5. El virus de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que codifica más de una molécula activadora de la vía inmunitaria coestimuladora.
- 25 6. El virus de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que es:
- (i) un VHS1; y/o
  - (ii) un VHS que:
- 30      (a) no expresa ICP34.5 funcional;
- (b) no expresa ICP47 funcional; y/o
- (c) expresa el gen US 11 como un gen temprano inmediato.
- 35 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;
- 40      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;
- 45      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.
- 50 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 retrovírico, 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 retrovírico, respectivamente, en donde el promotor de LTR retrovírico 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.

5 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.

10 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:

15 (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;

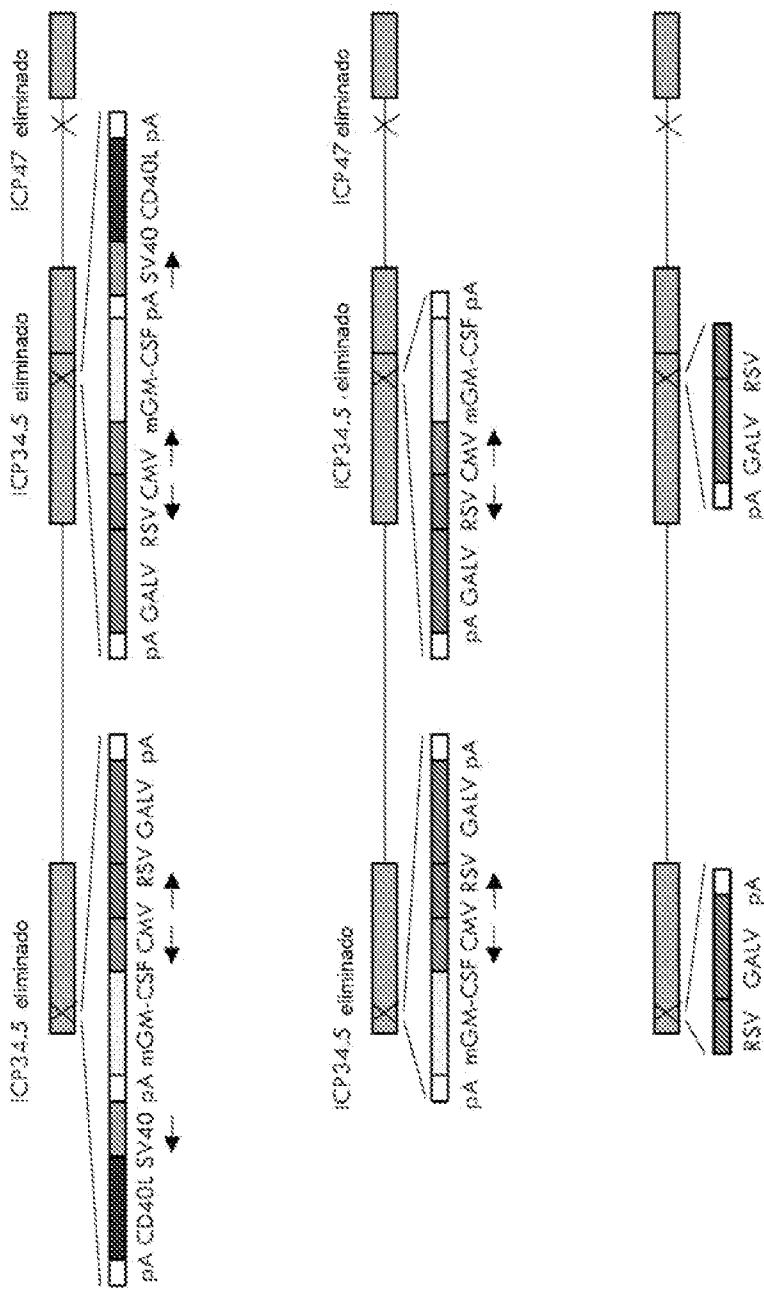
20 (ii) el agente anticáncer adicional es un anticuerpo;

(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

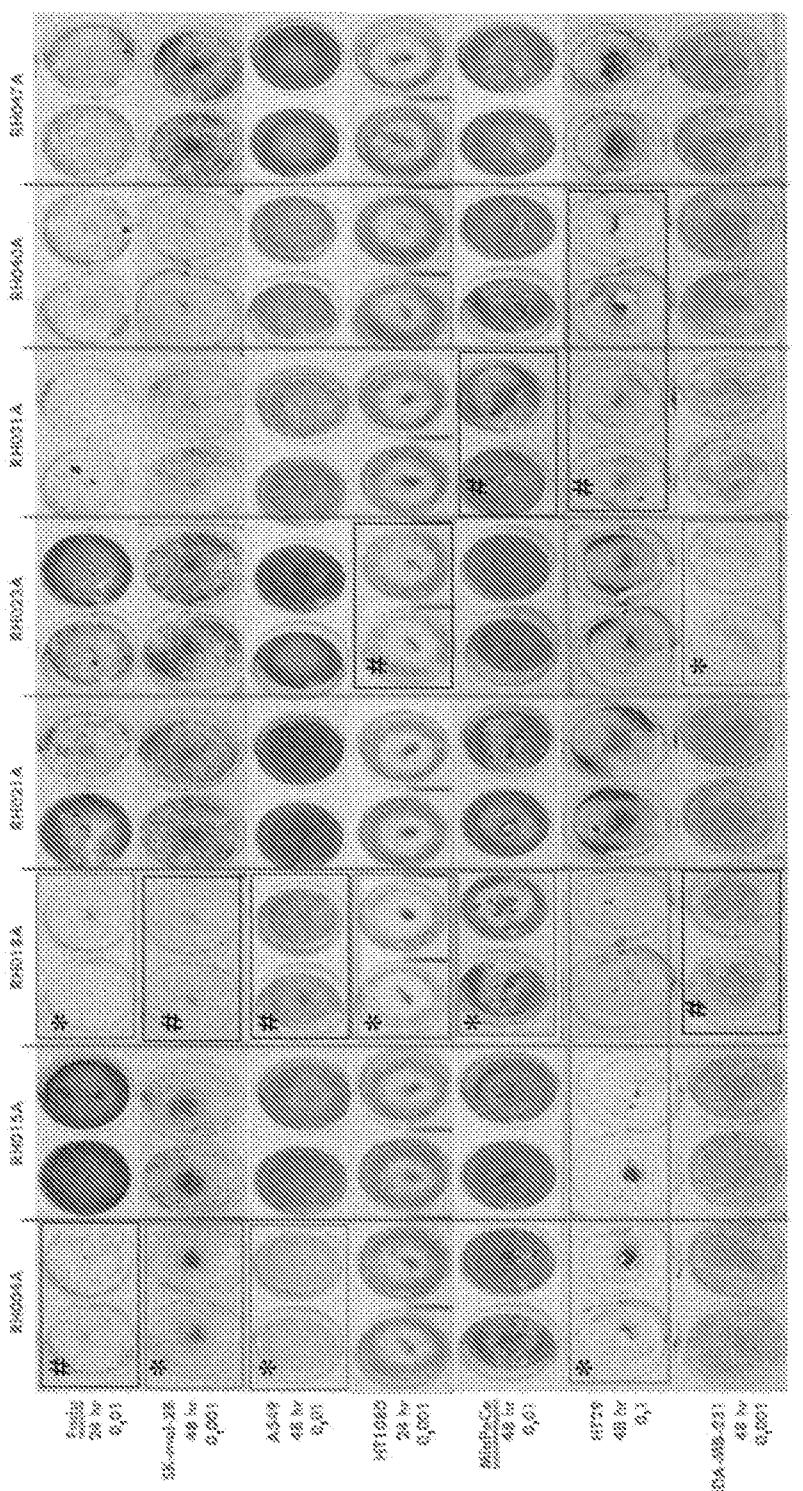
30 (v) el cáncer es un tumor sólido.

Figura 1



# ES 2 841 300 T5

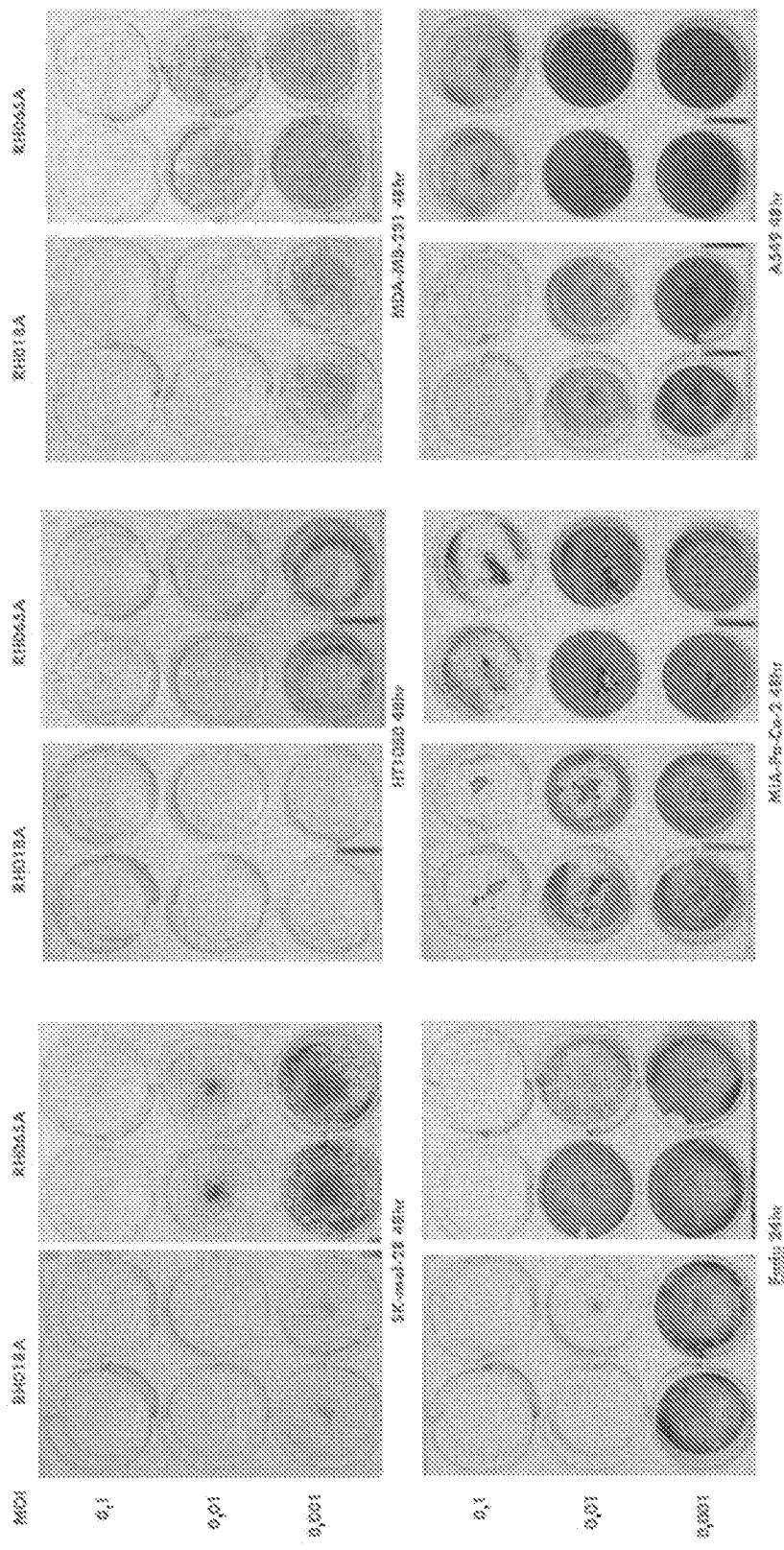
**Figura 2**



# ≈ clasificado 1º en la línea celular indicada  
\* ≈ clasificado 1º en la línea celular indicada  
 (basado en todos los efectores y puntos de tiempo)

# ES 2 841 300 T5

**Figura 3**



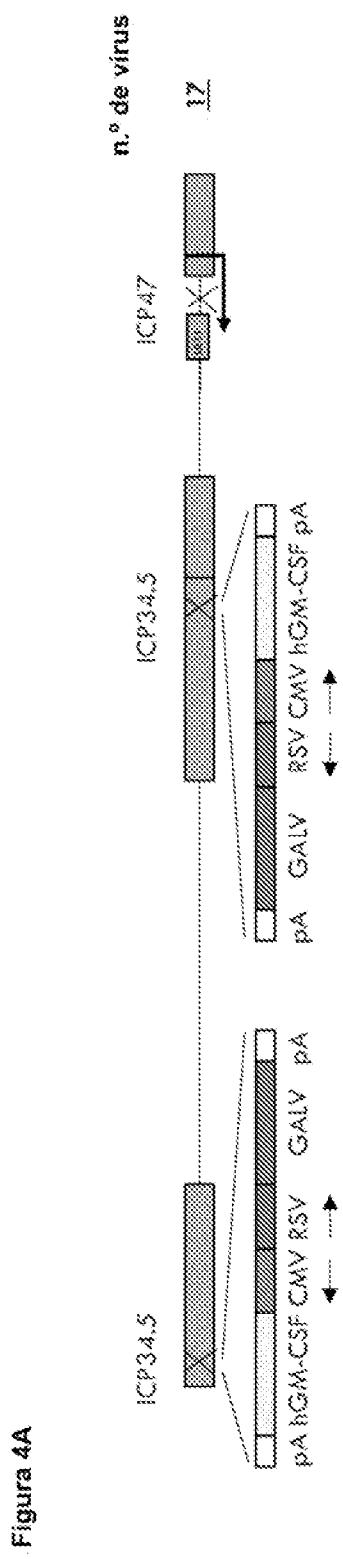


Figura 4A

Figura 4B

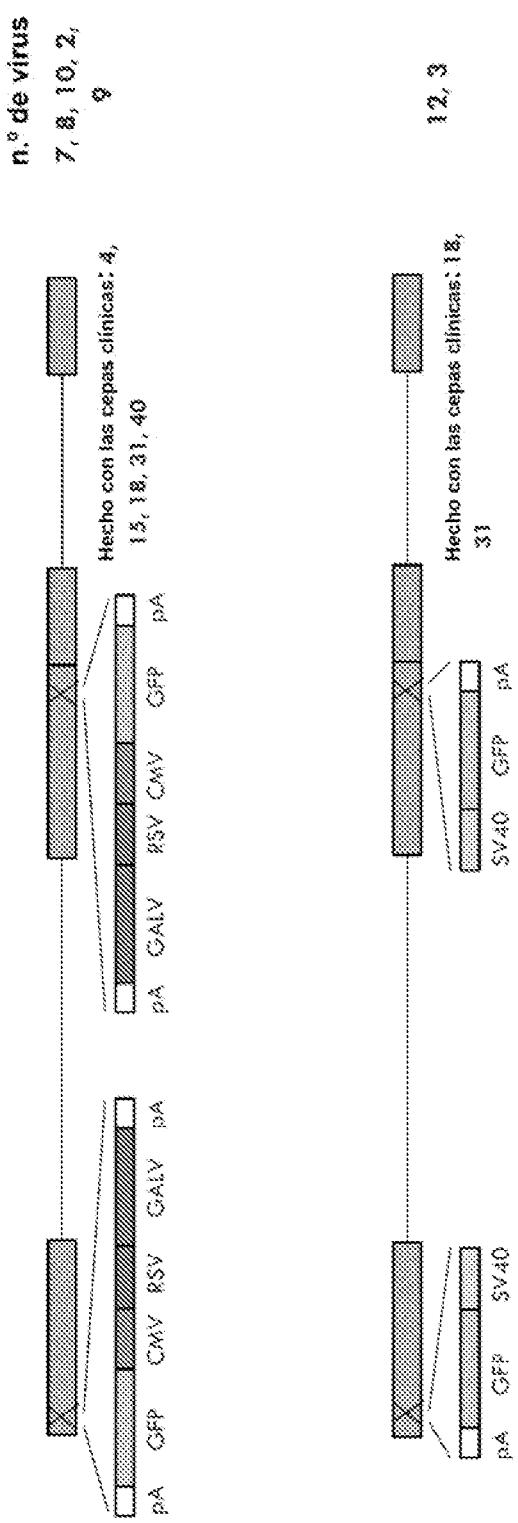


Figura 4C

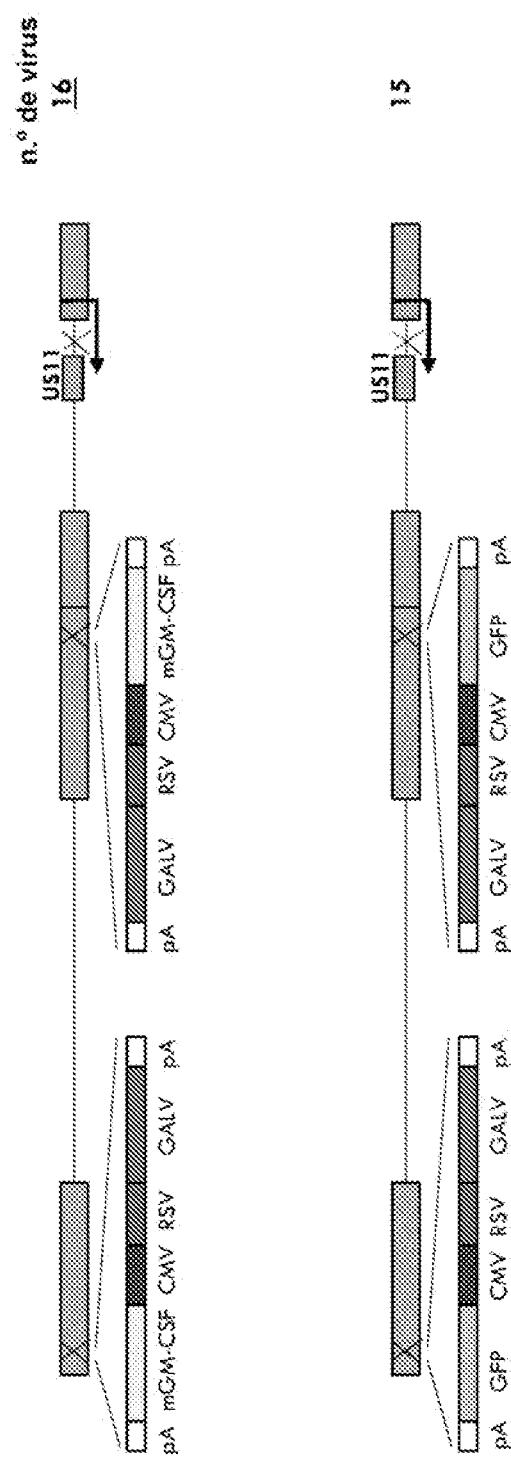
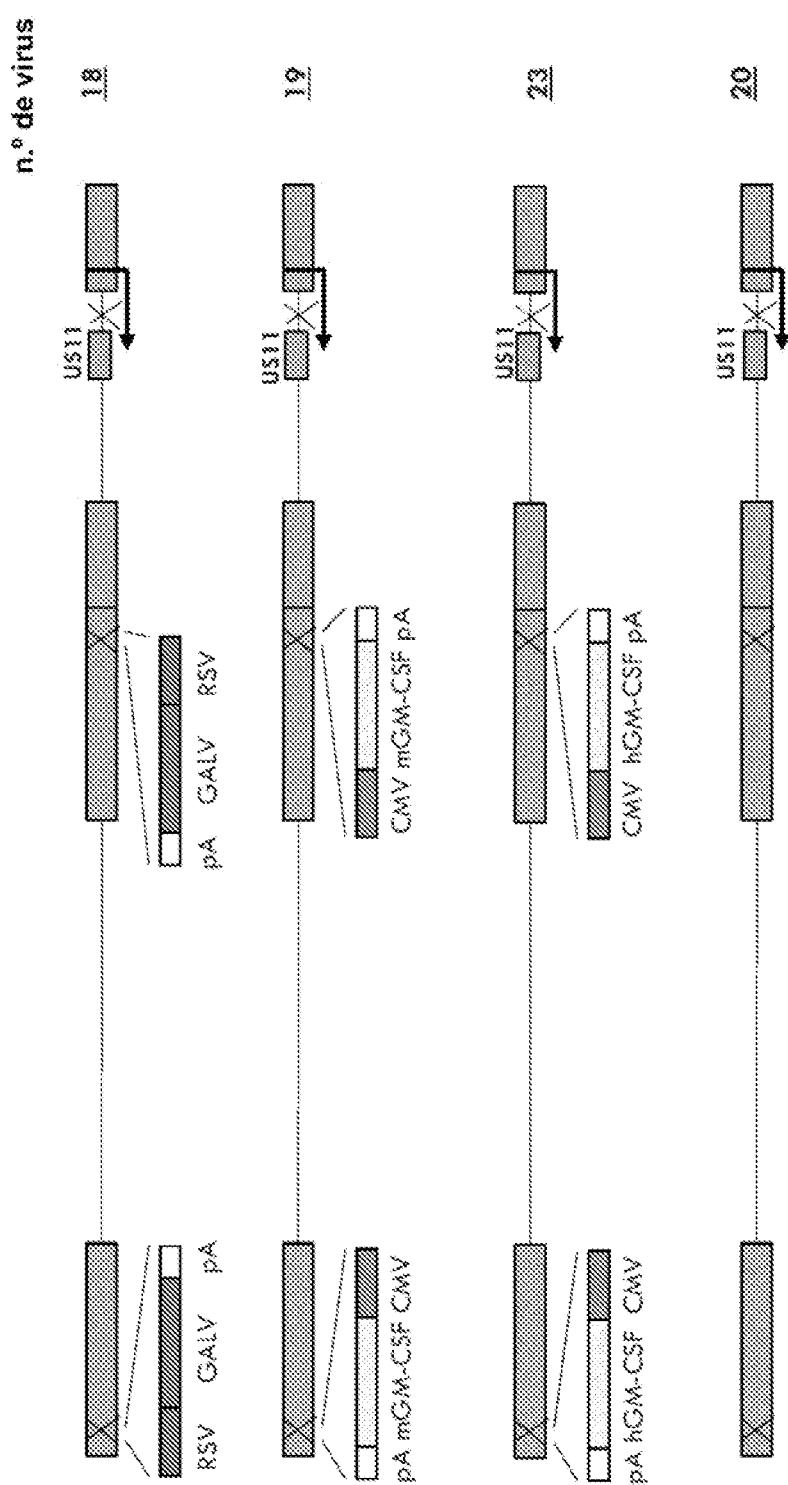


Figura 4D



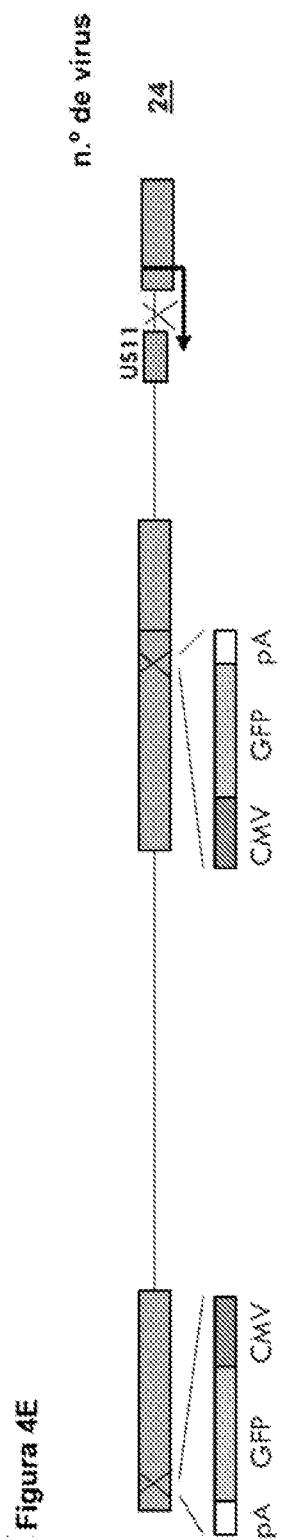
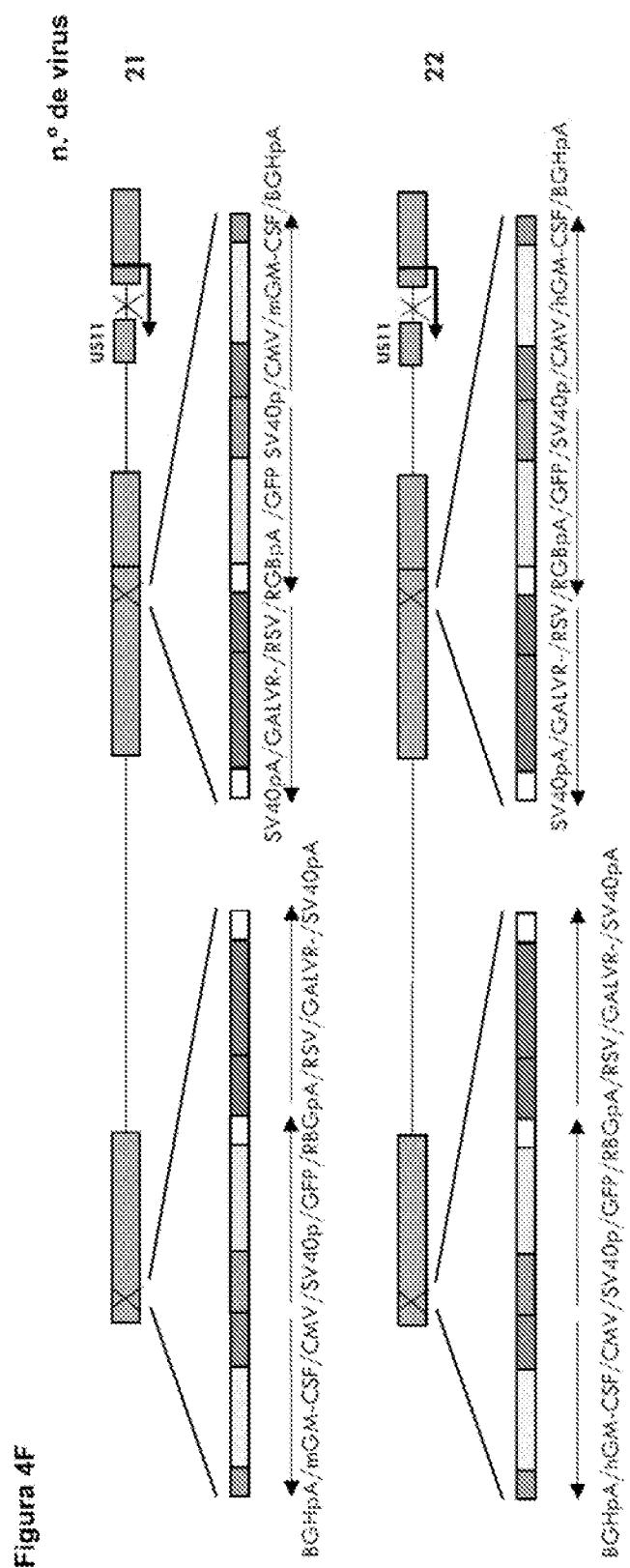


Figura 4E



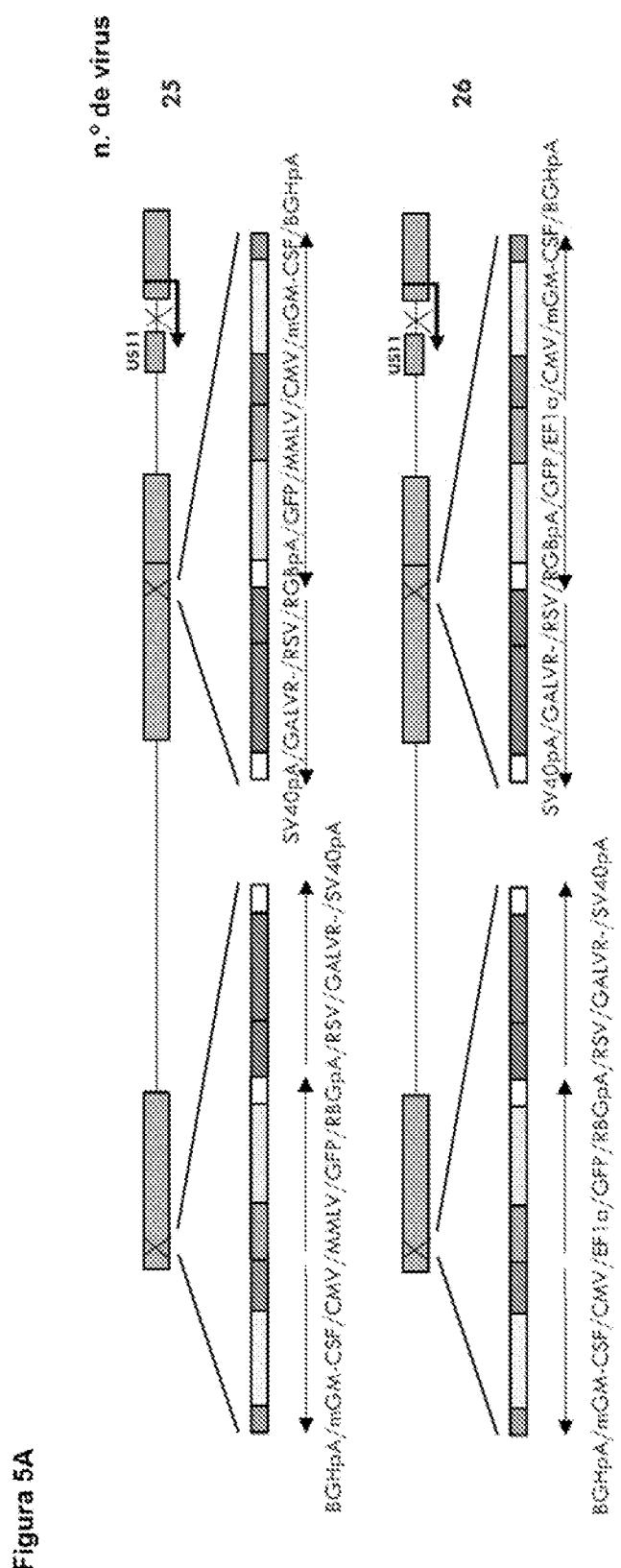


Figura 5A

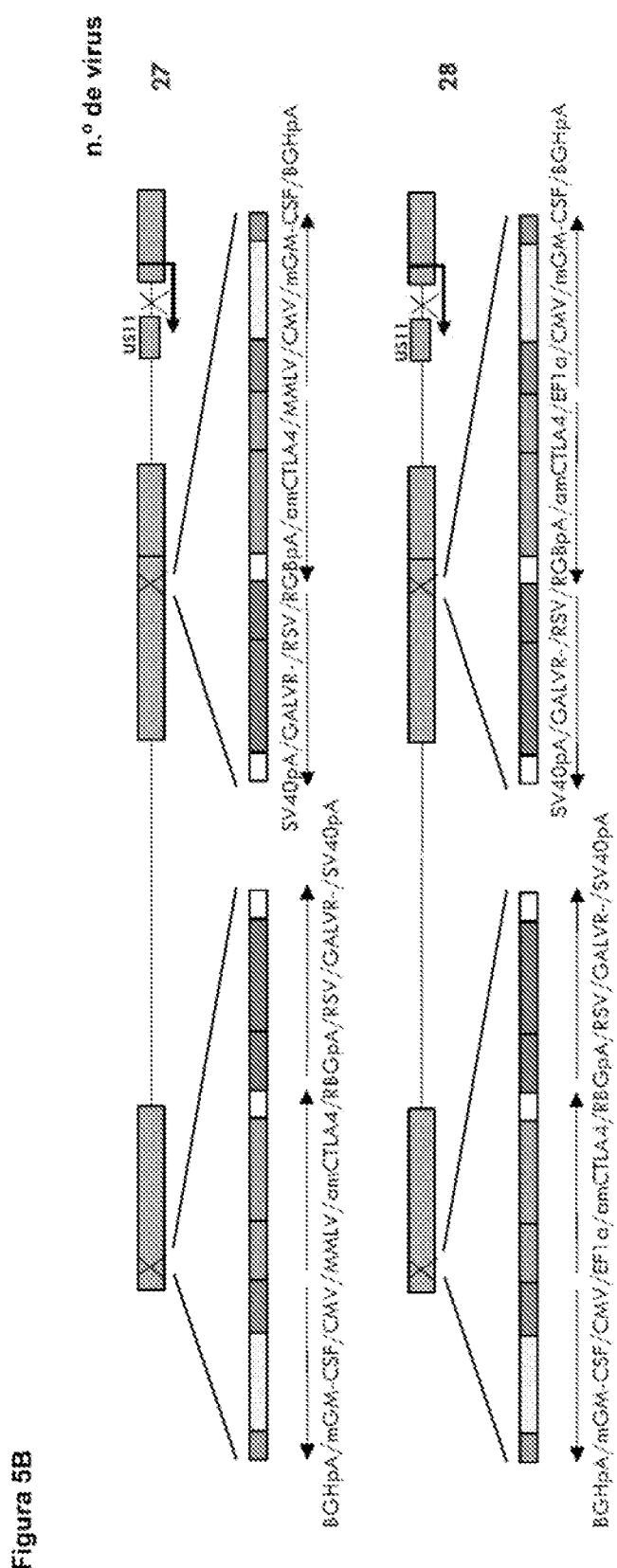


Figura 5B

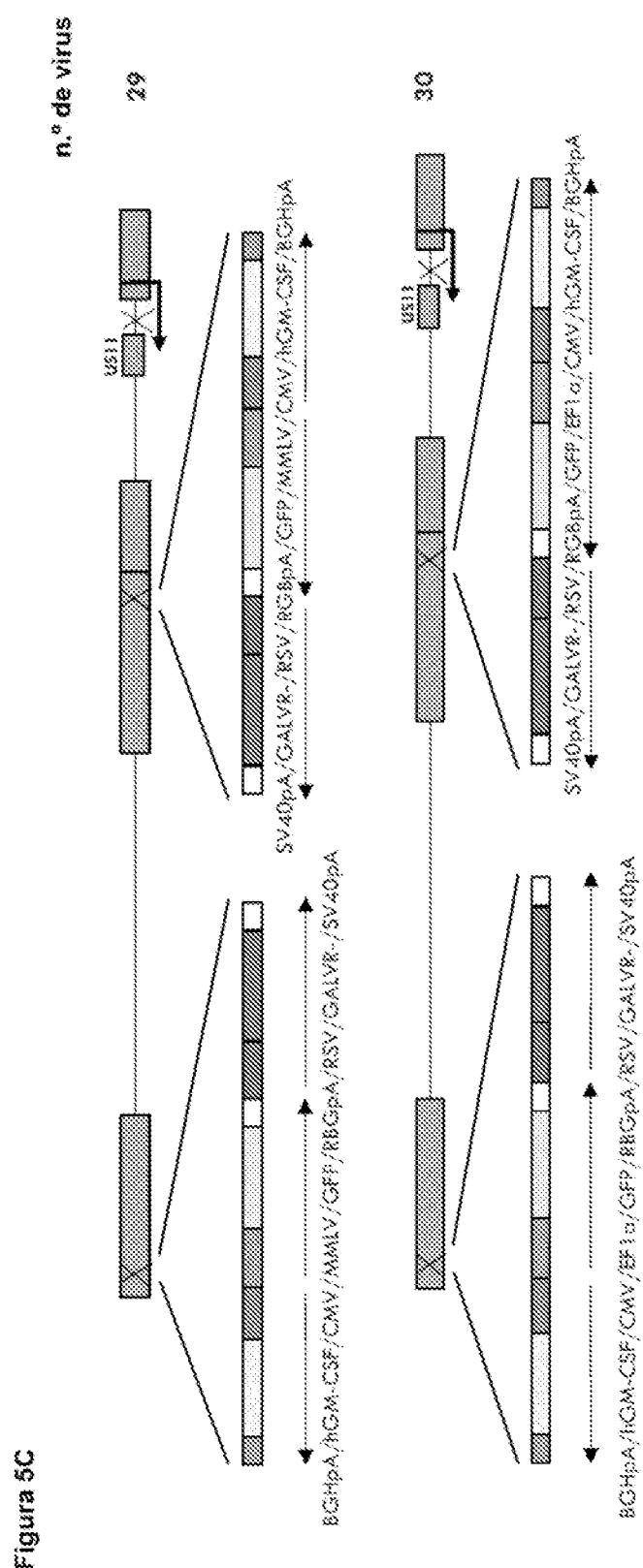


Figura 5C

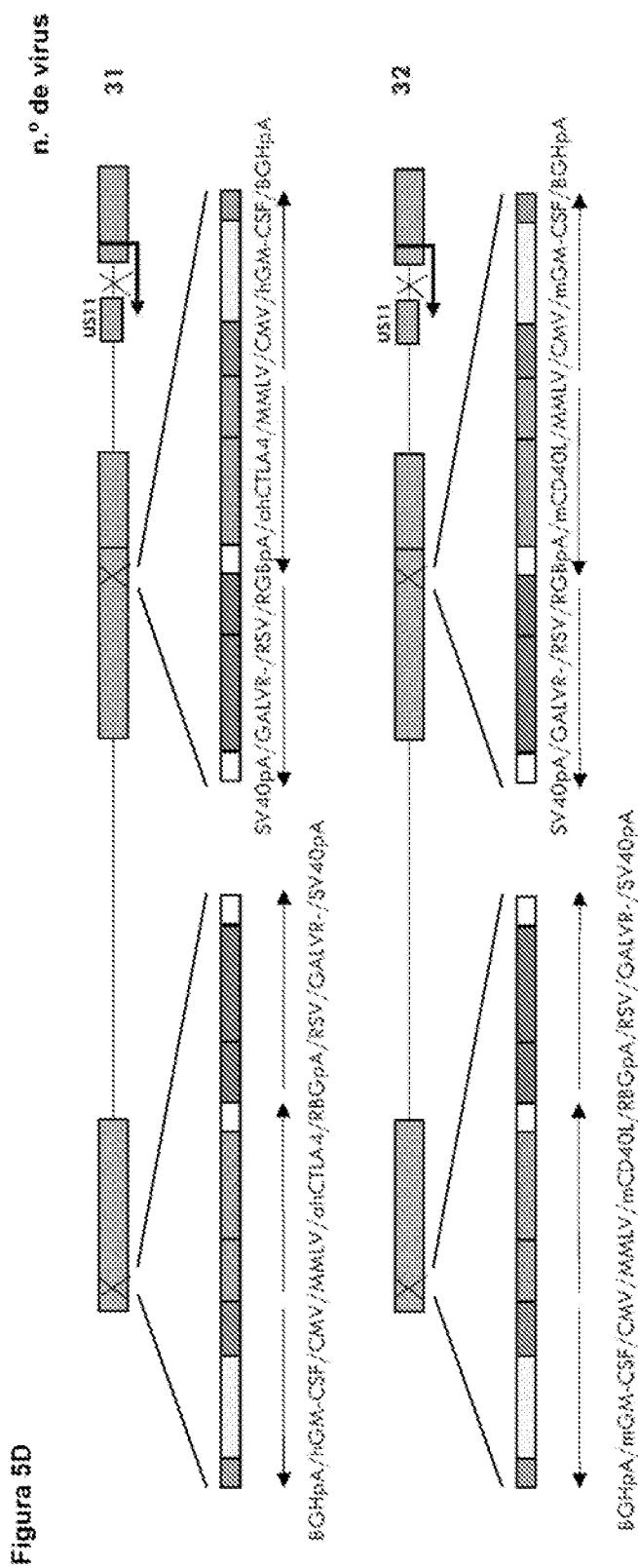


Figura 5D

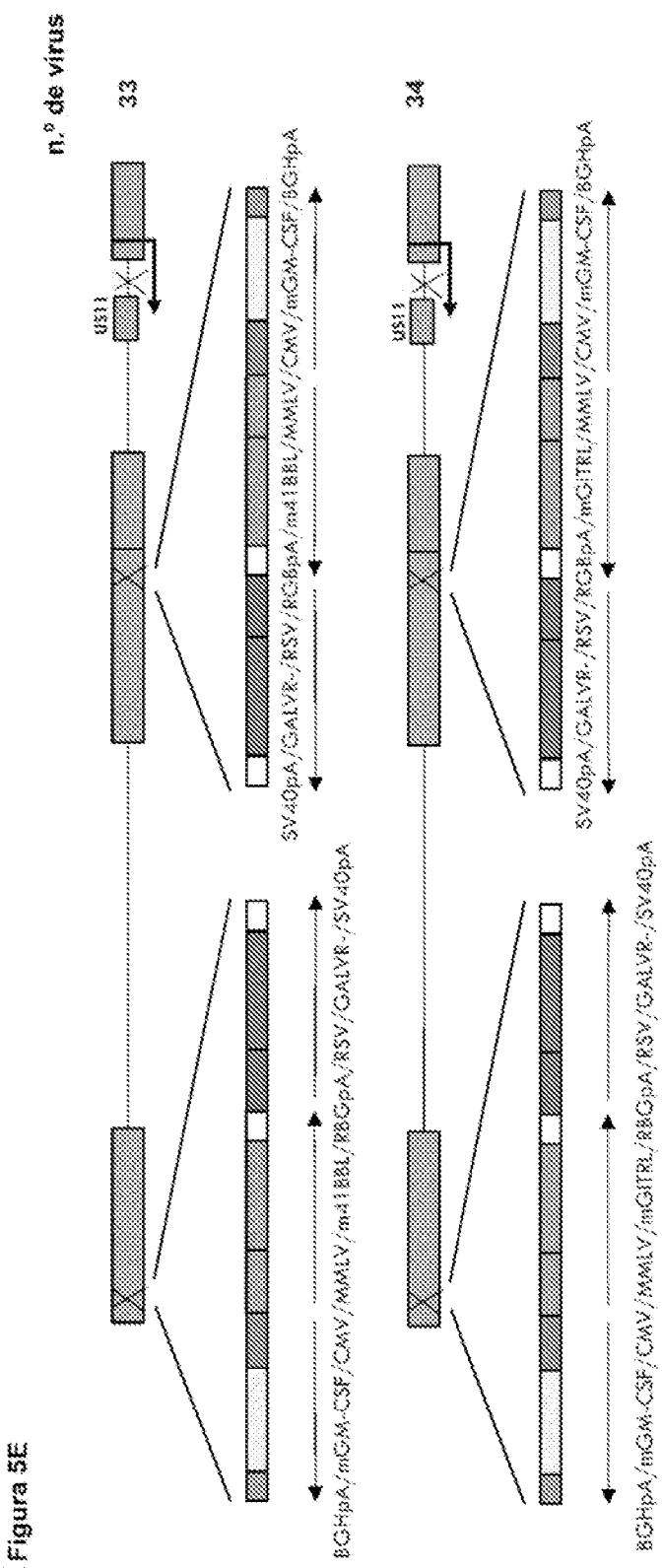
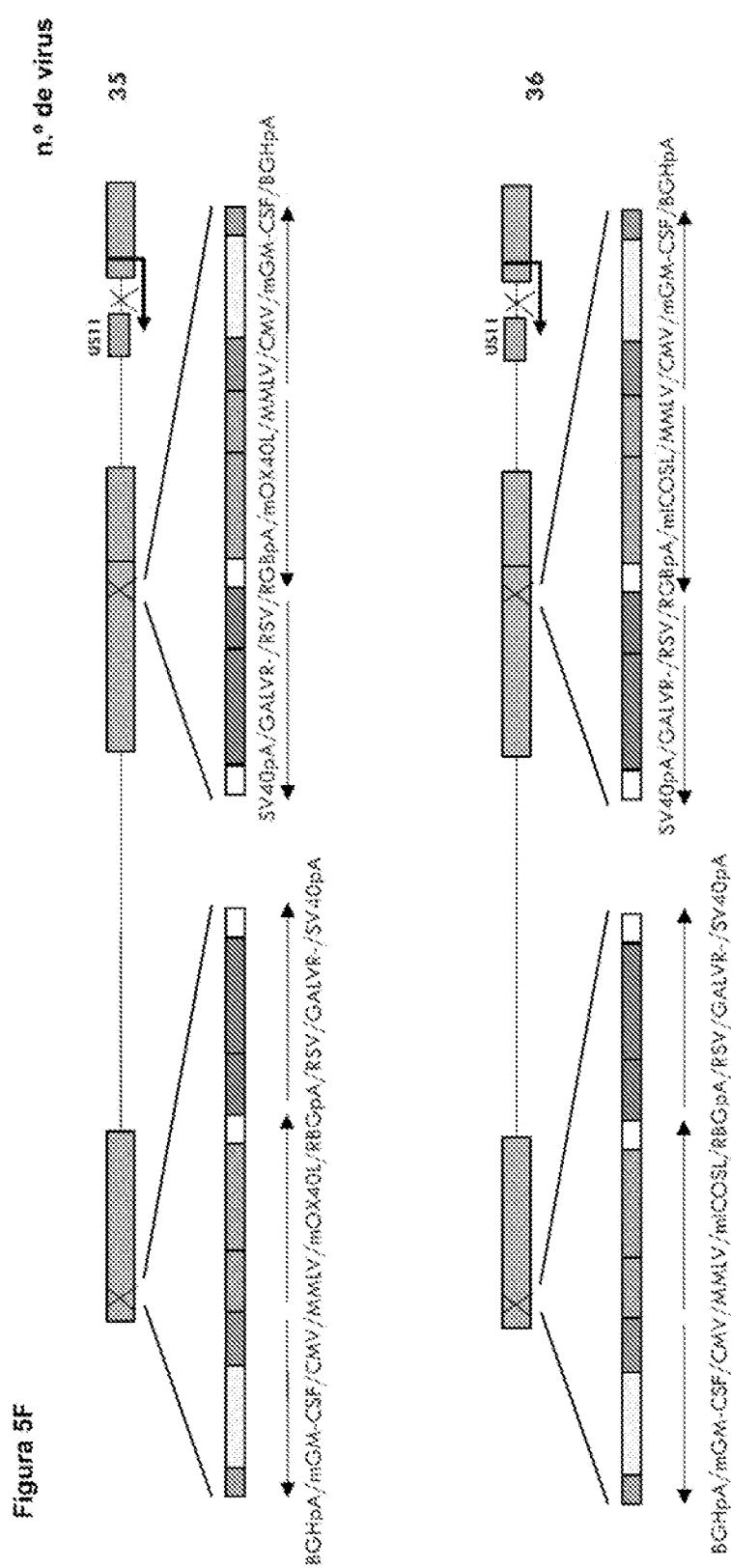


Figura SE



**Figura 6**

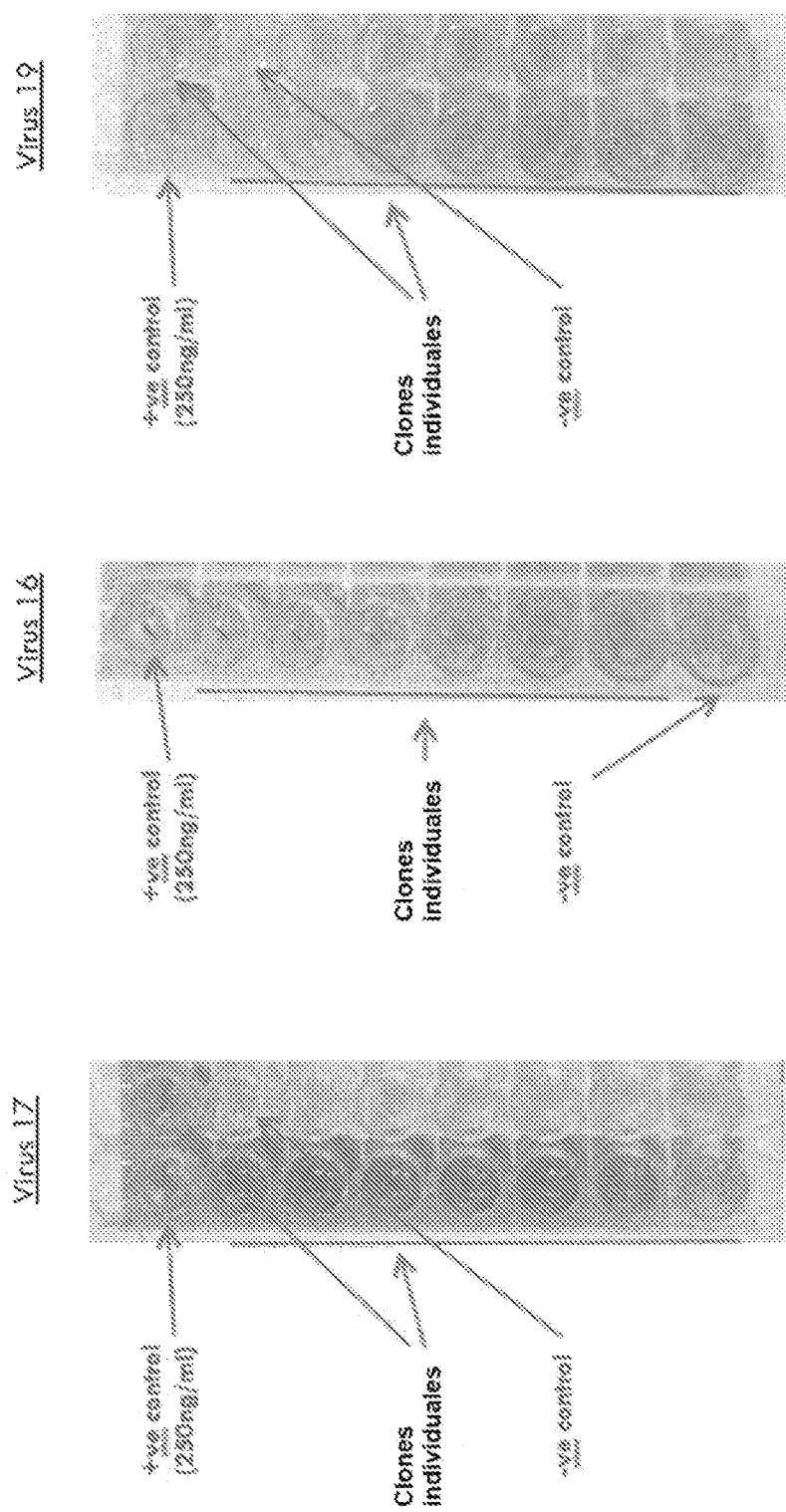


Figura 7A

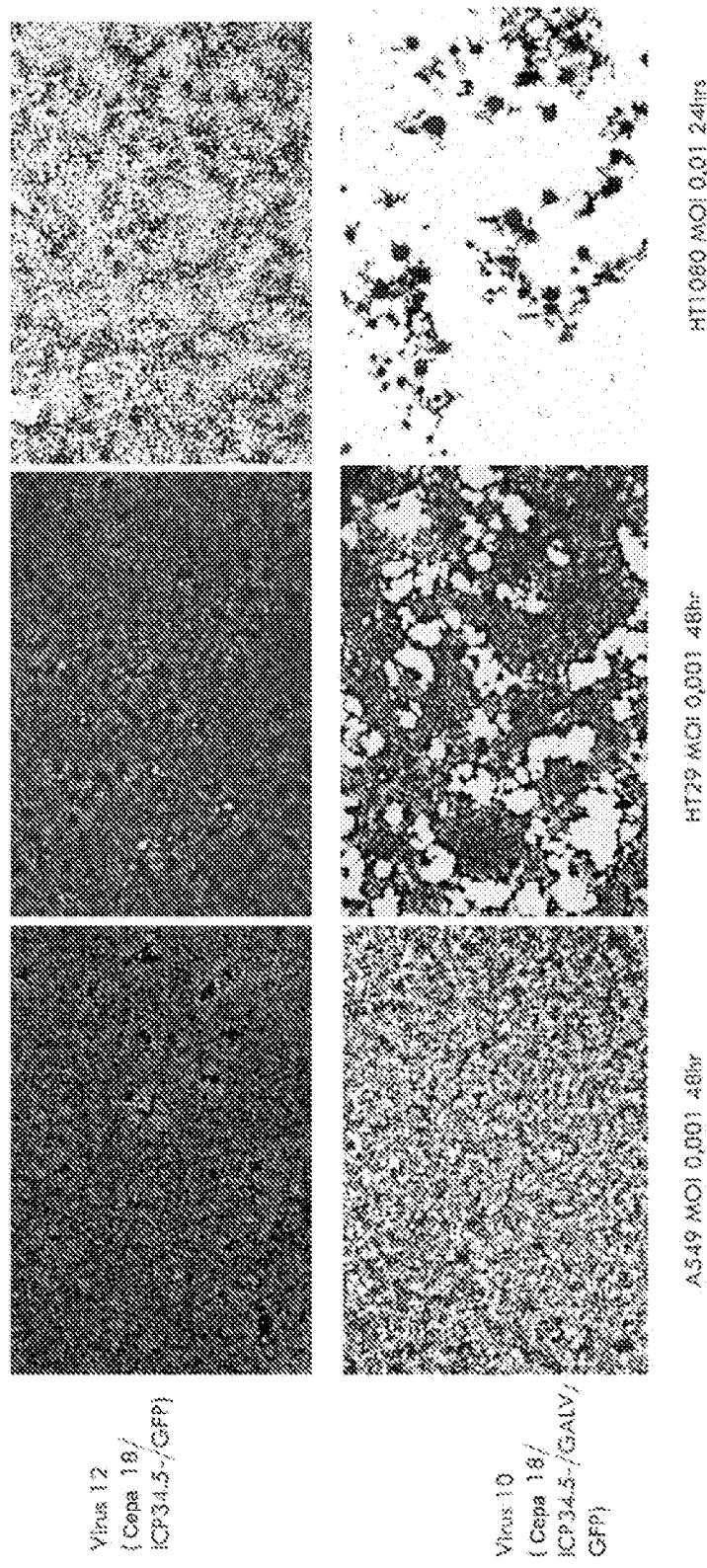
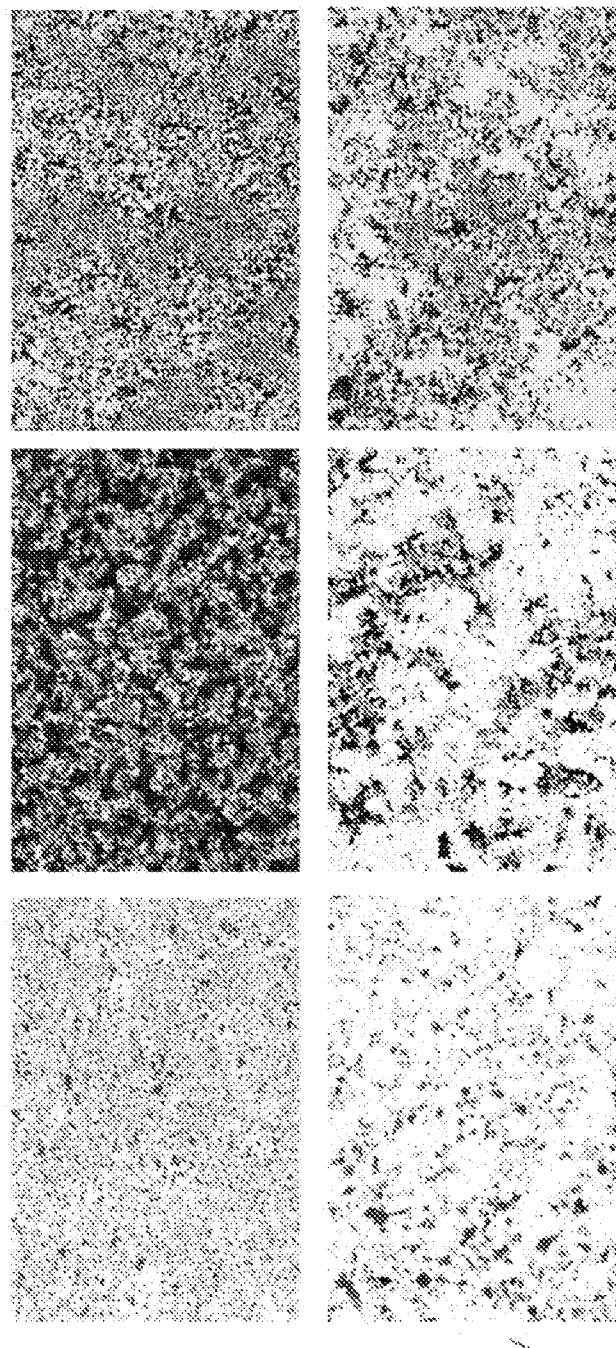


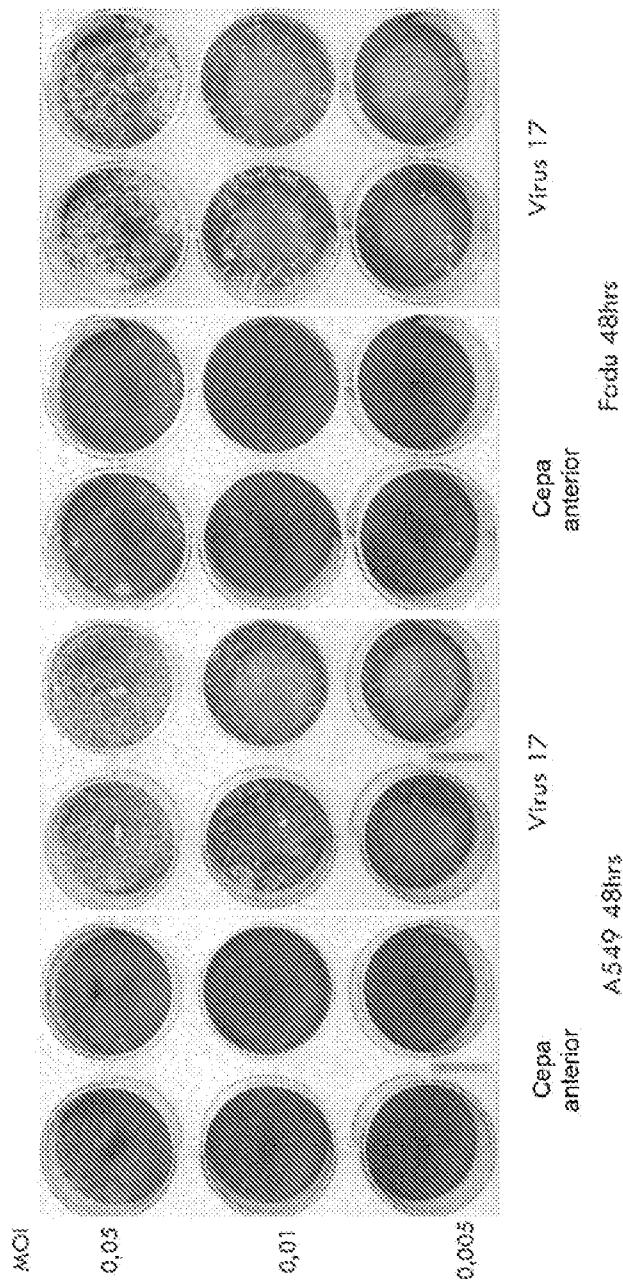
Figura 7B



MCA-MD-S21 MOI 0,01 48hr  
MCA-Po-Ca-2 MOI 0,01 48hr  
SK-nel-28 MOI 0,001 24hrs

Muerte celular evaluada por tinción de cristal violeta: baja magnificación

Figura 8A



# ES 2 841 300 T5

Figura 8B

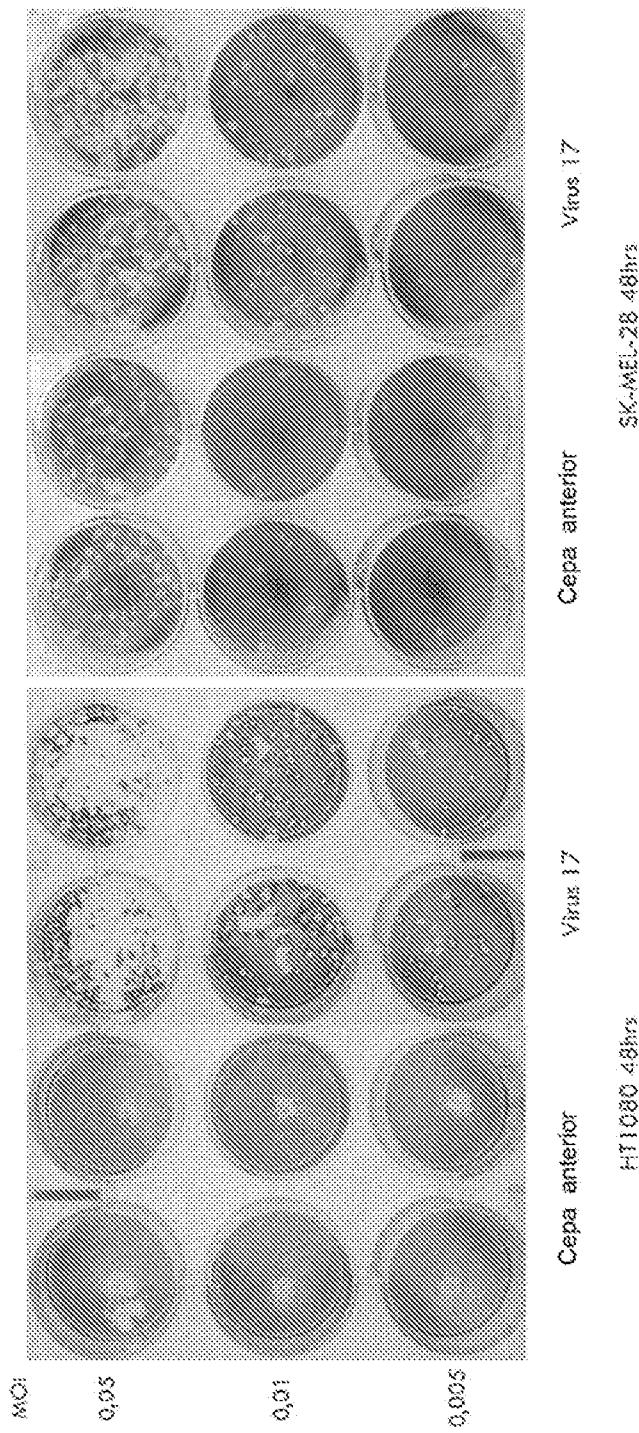


Figura 9

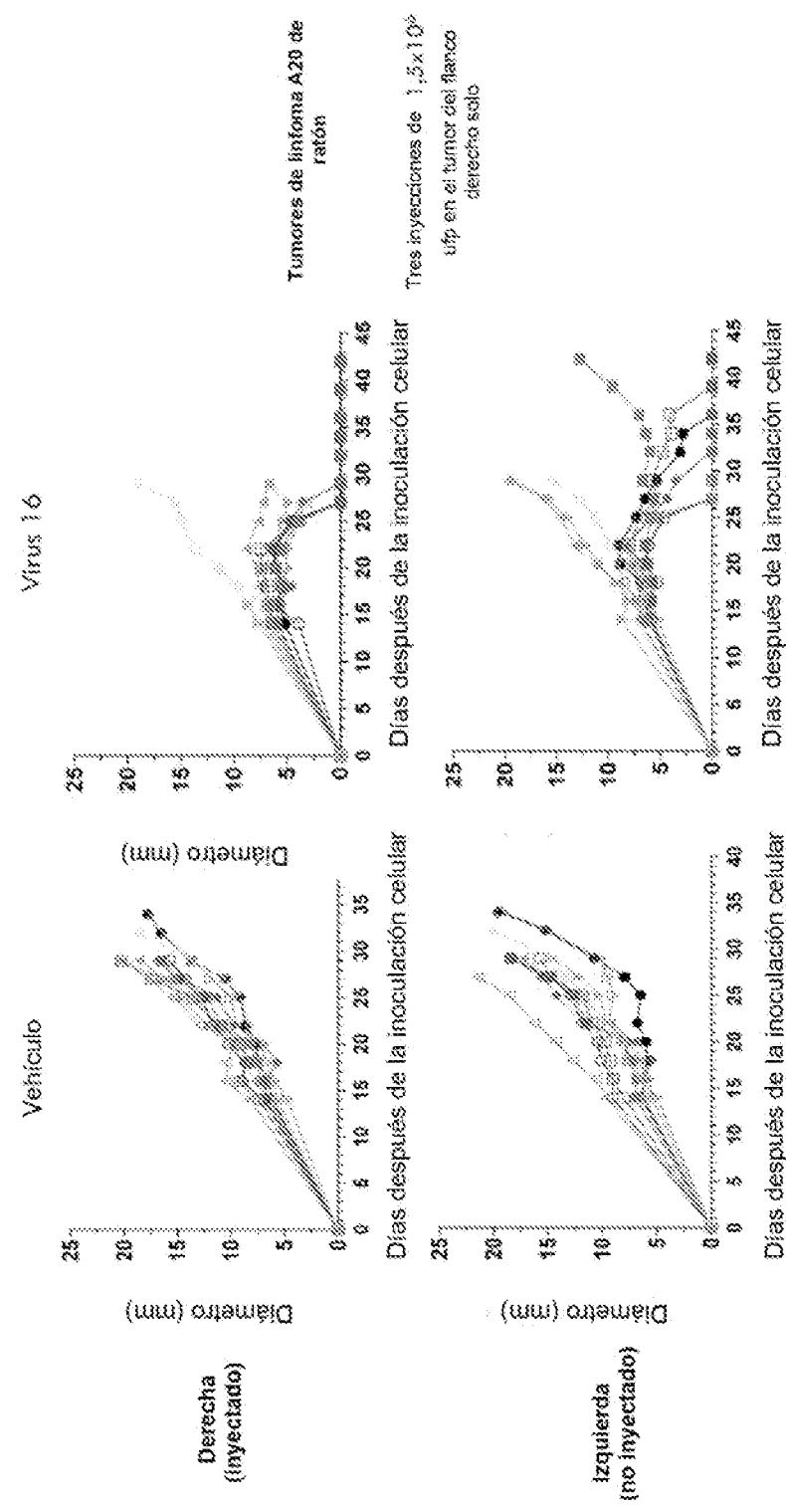


Figura 10

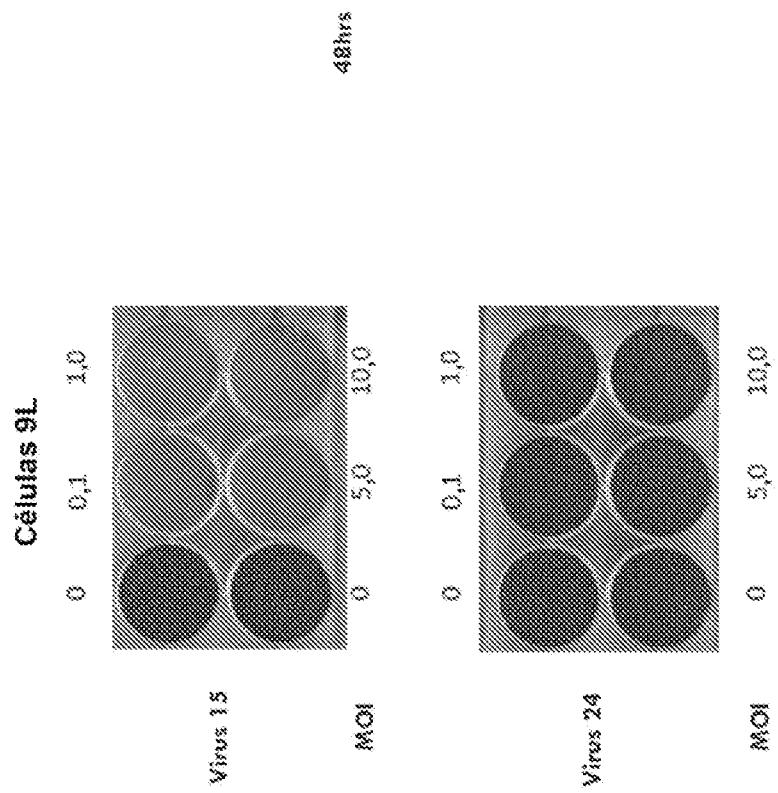
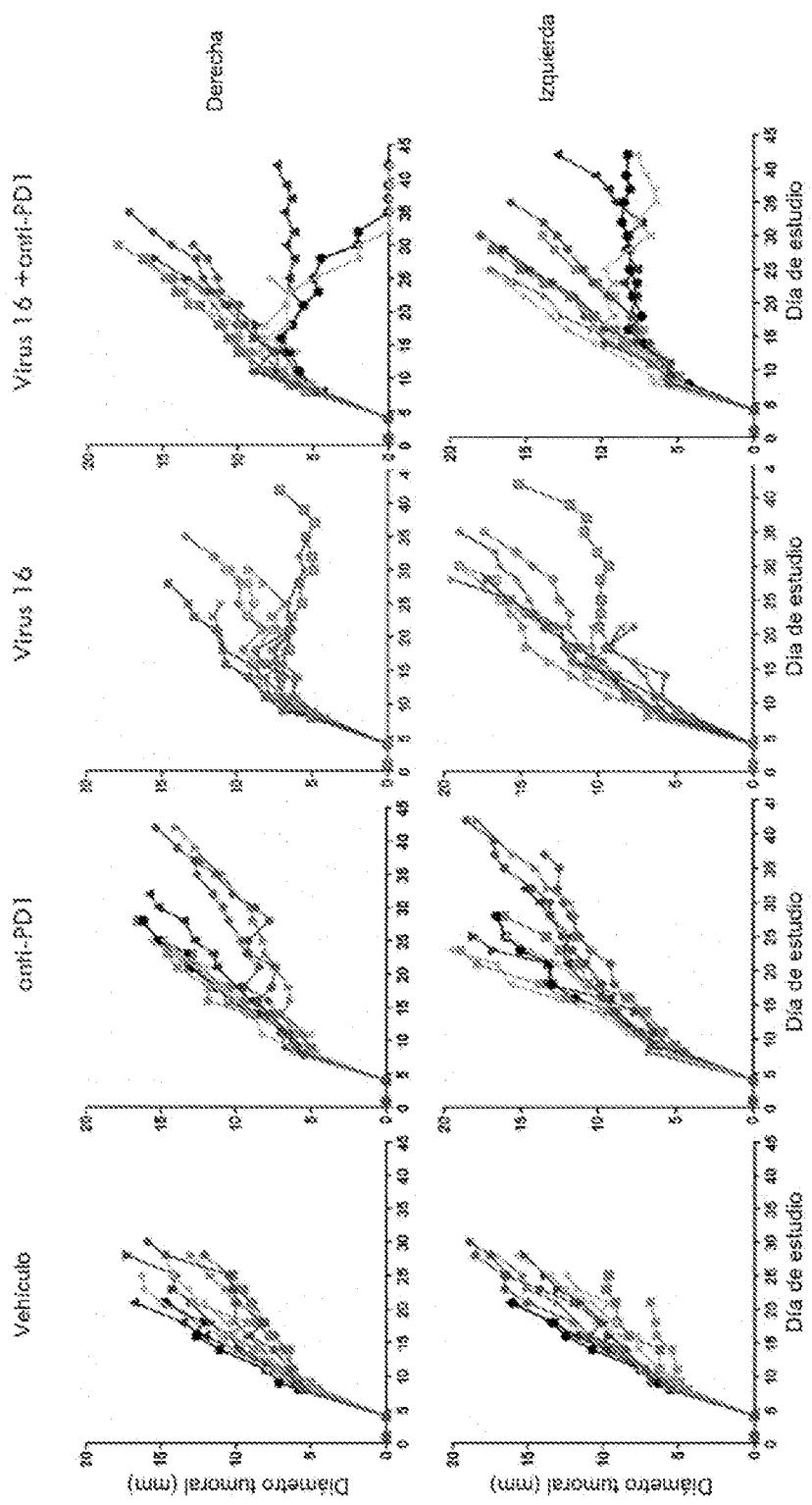
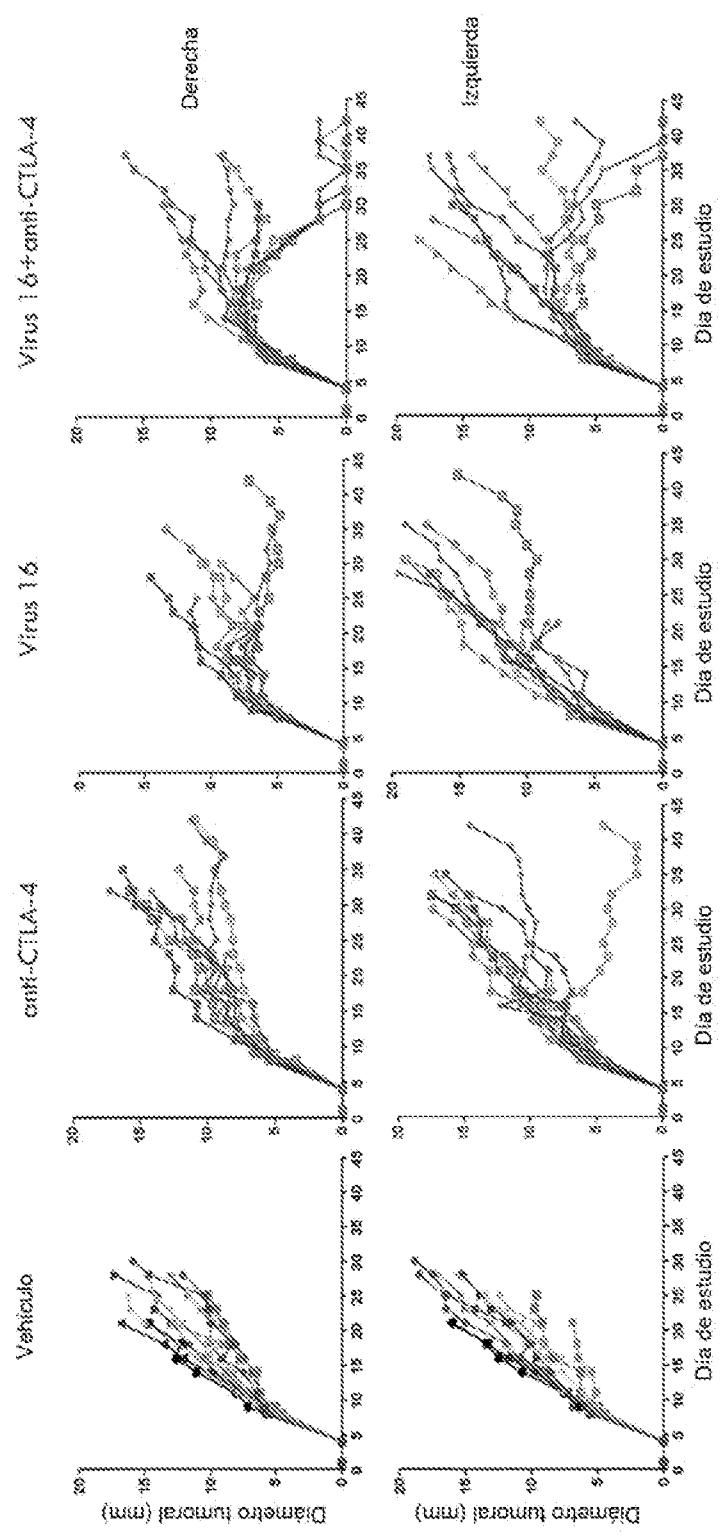


Figura 11A



Virus: 5 inyecciones de 5x10<sup>6</sup> dfu en el tumor del flanco derecho solo  
Anti-PD1: 10mg/kg i.p. Q3Dx9 {días: RMPI-14; BioXCell}

Figura 11B



Virus: 5 inyecciones de  $5 \times 10^6$  ifp en el tumor del flanco derecho solo  
Anti-CTLA-4 3mg/kg ip. Q3Dx9 (clon 9D9; BioXCell)

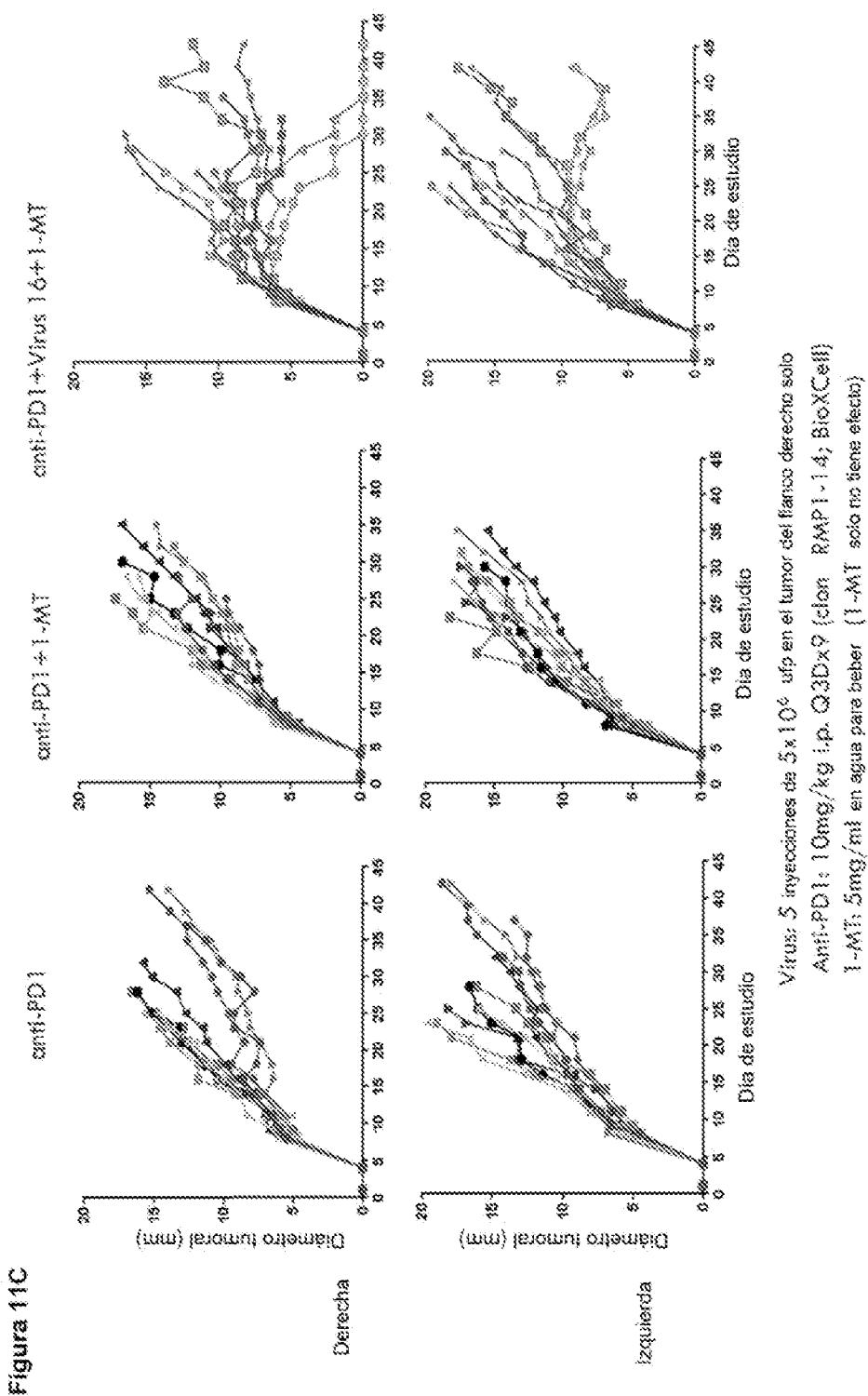
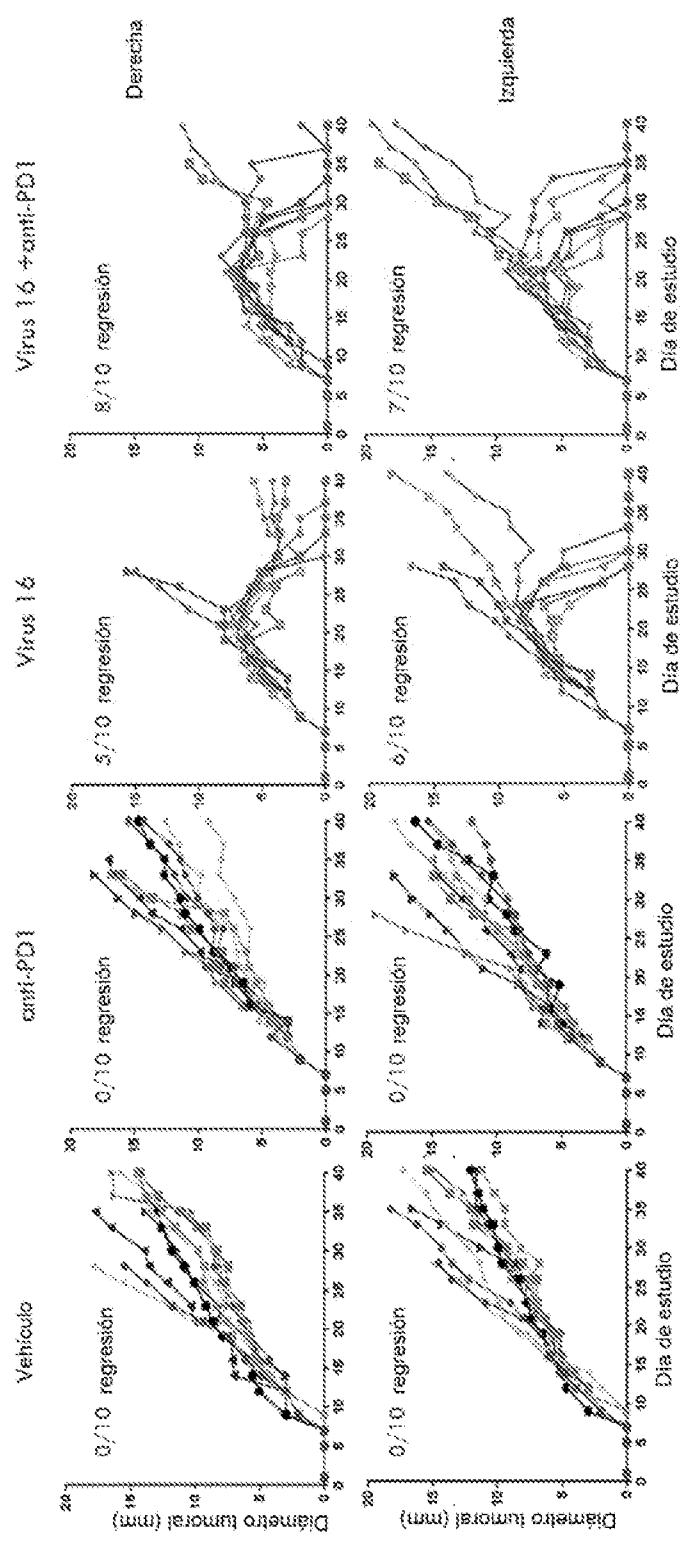


Figura 12A



Virus: 3 inyecciones de  $5 \times 10^6$  ufp en el tumor del flanco derecho solo  
 Anti-CD41: 10mg/kg i.p. Q 3Dx9 (clon RMP 1-14; BioXCell)

ES 2 841 300 T5

Figura 12B

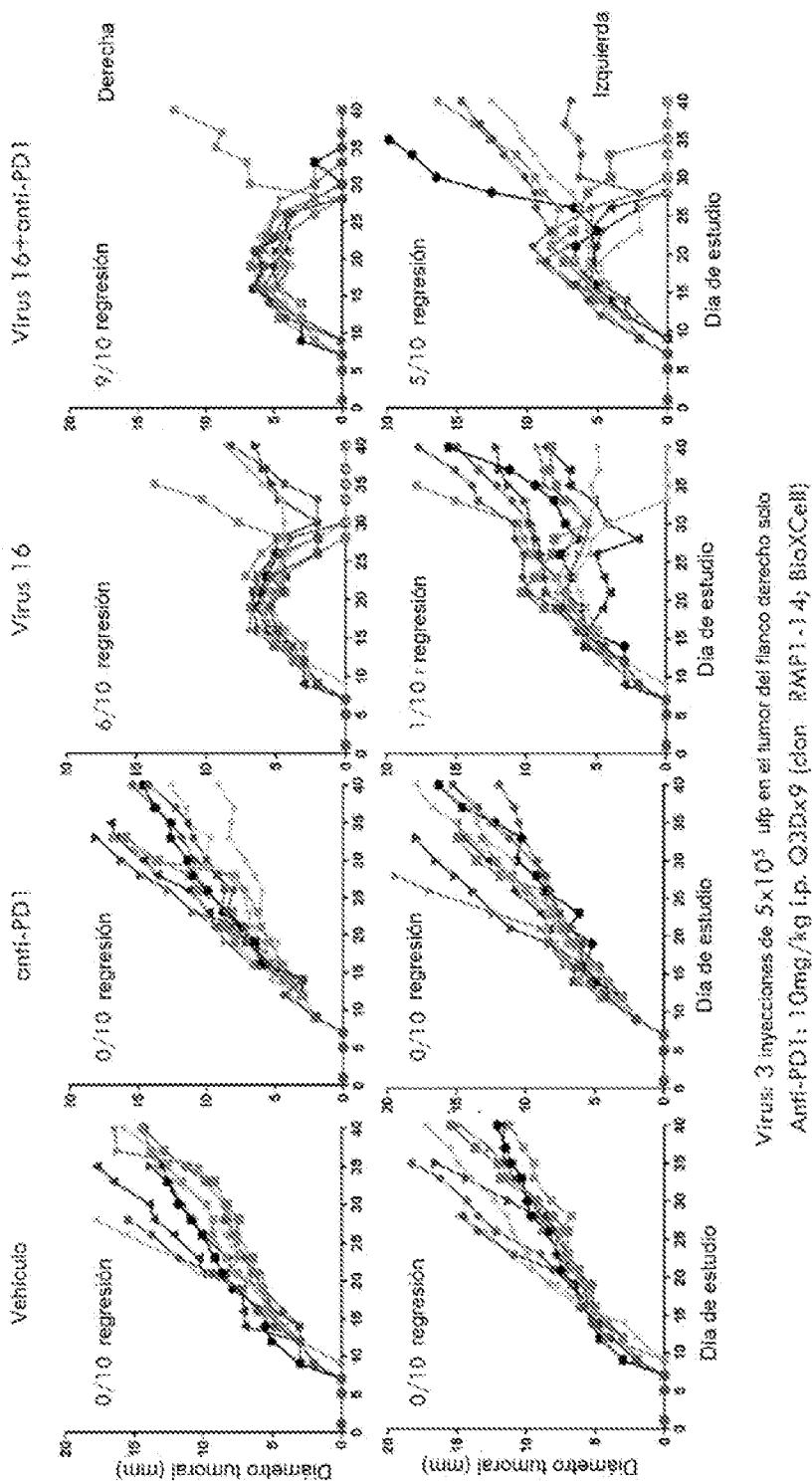


Figura 12C

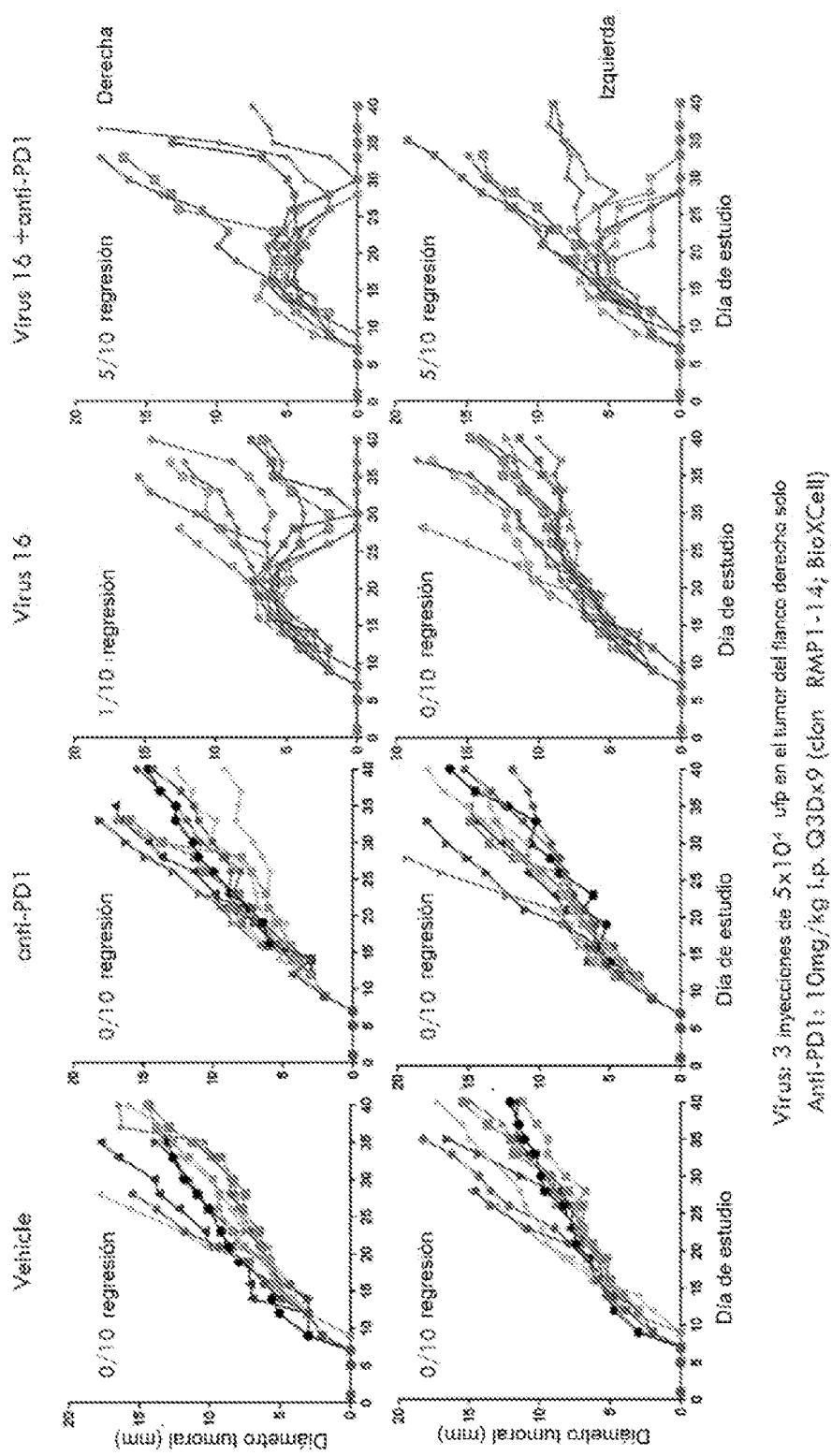
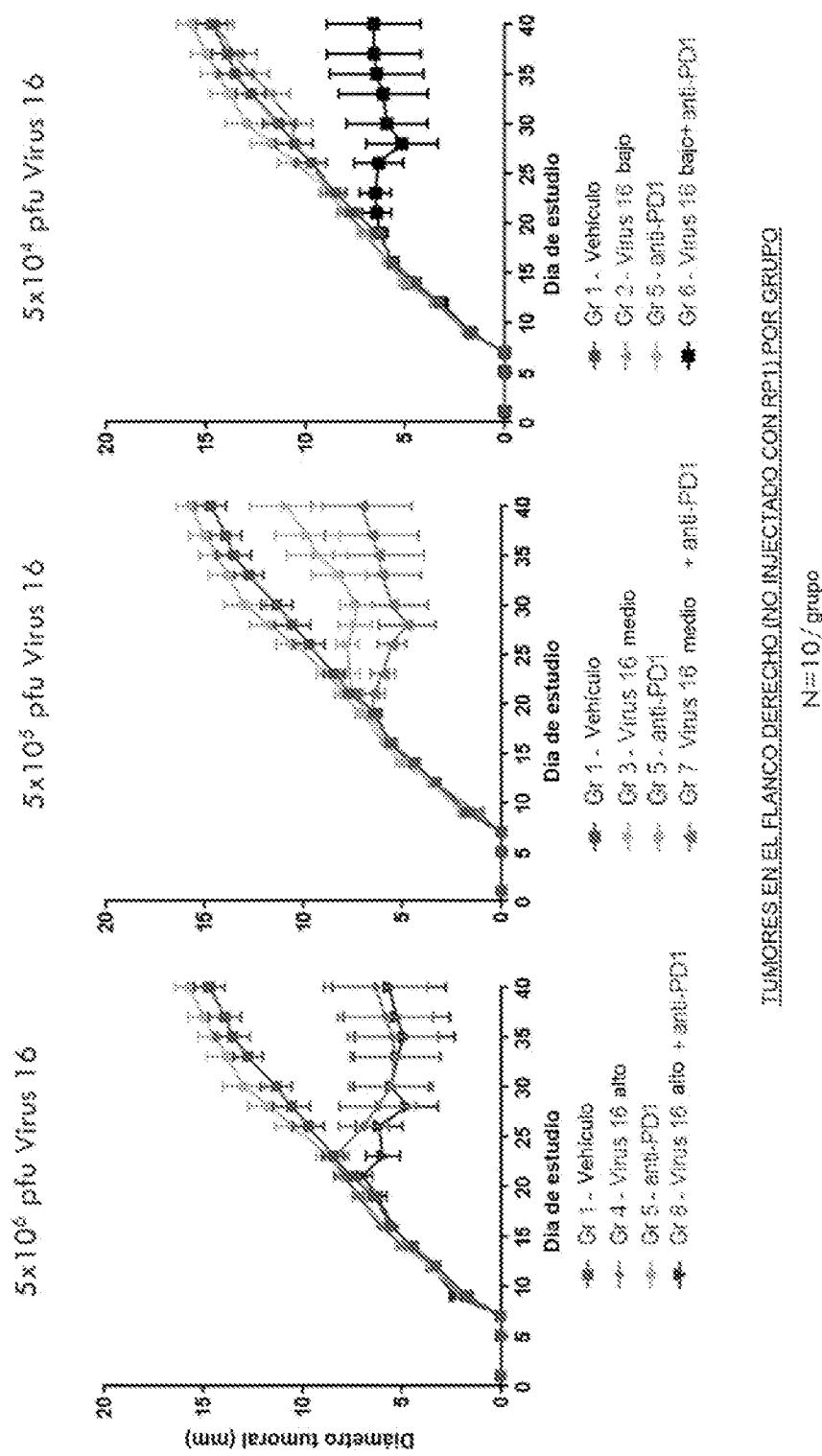


Figura 12D



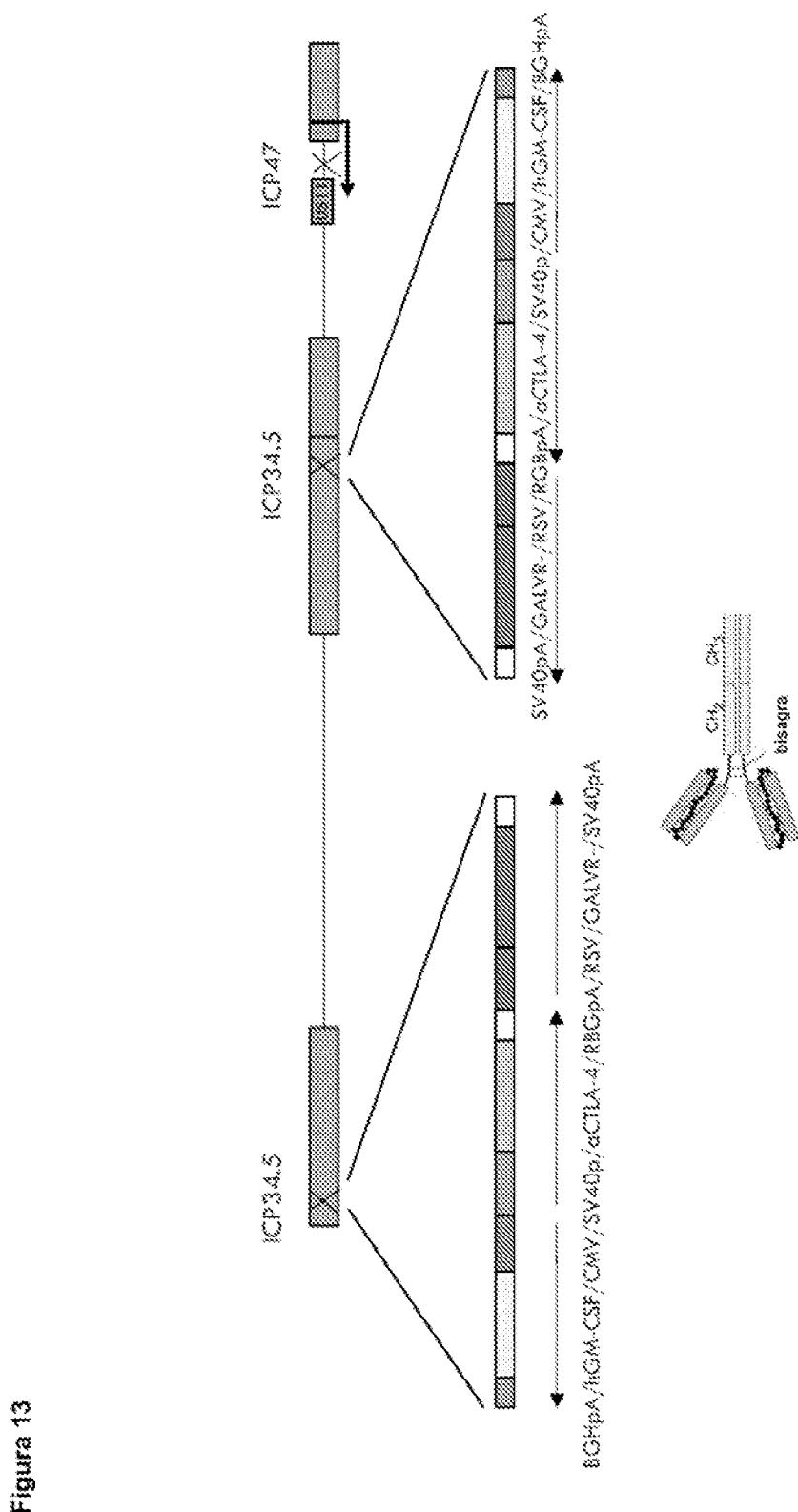
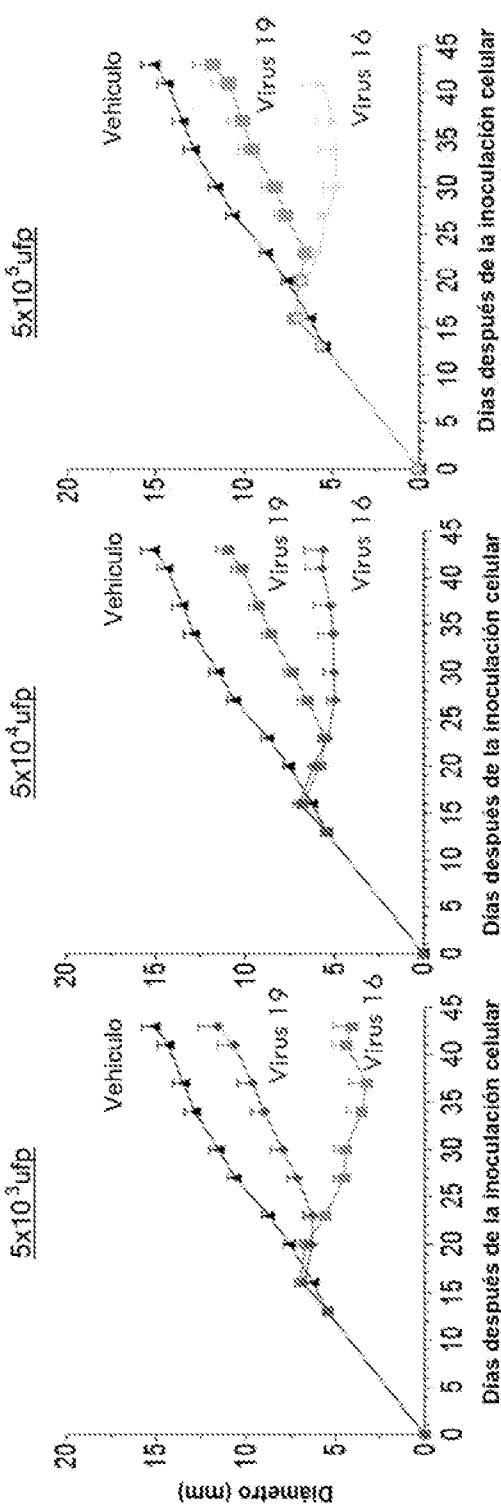


Figura 13

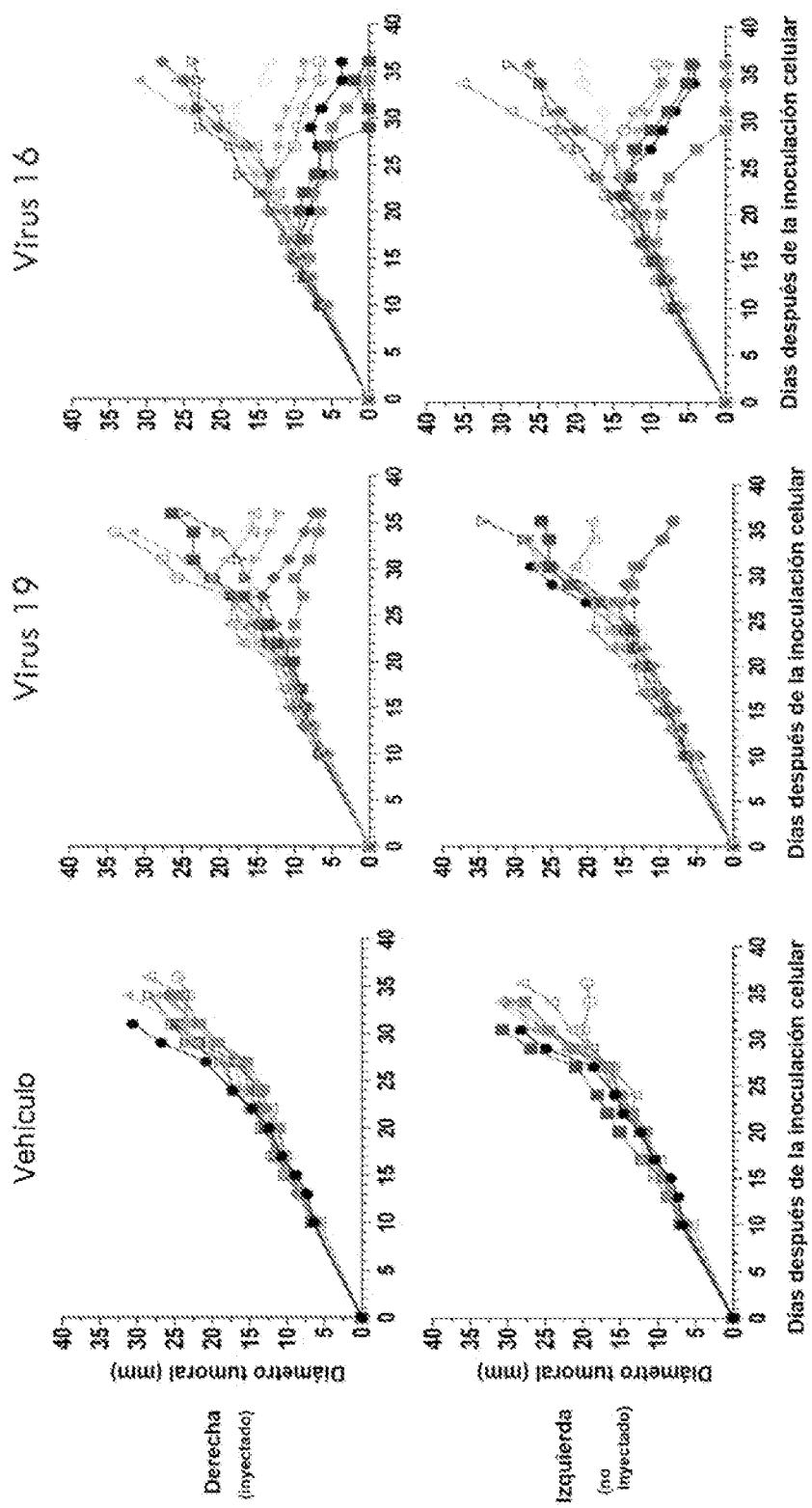
Figura 14



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

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

Figura 15

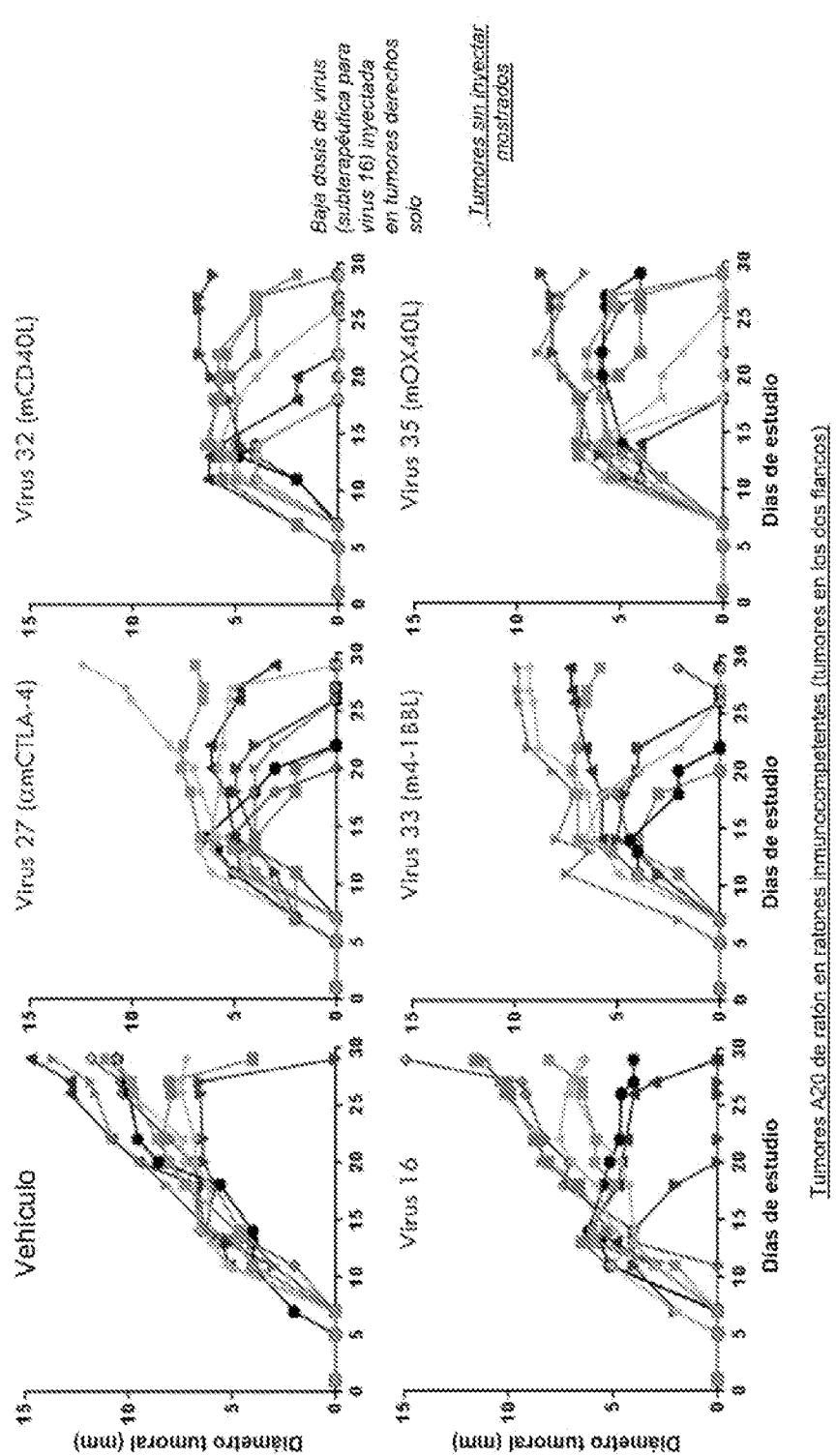


Tumores de glioma GL de rata en ratas inmunocompetentes

Virus:  $5 \times 10^5$  pfu/p inyectado 3x/semana en el tumor derecho solo durante 3 semanas

Dias después de la inoculación celular

Figura 16



Virus : 5x 10<sup>6</sup> UPF del virus indicado inyectado 3x en el tumor derecho solo