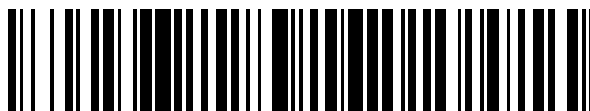


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 779 149**

51 Int. Cl.:

C12N 15/867 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.03.2015** **PCT/US2015/022512**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.10.2015** **WO15148683**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.03.2015** **E 15769100 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.12.2019** **EP 3122884**

54 Título: **Vector retroviral que tiene actividad inmunoestimuladora**

30 Prioridad:

26.03.2014 US 201461970823 P

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

13.08.2020

73 Titular/es:

**TOCAGEN INC. (100.0%)
3030 Bunker Hill Street Suite 230
San Diego, CA 92109, US**

72 Inventor/es:

**GRUBER, HARRY, E.;
JOLLY, DOUGLAS, J.;
LIN, AMY, H.;
ROBBINS, JOAN, M. y
OSTERTAG, DEREK, G.**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 779 149 T3

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

DESCRIPCIÓN

Vector retroviral que tiene actividad inmunoestimuladora

Campo técnico

5 Esta descripción se refiere a la terapia del cáncer y, más específicamente, a la inhibición del crecimiento de un tumor utilizando distintas construcciones de vectores.

Antecedentes

10 El cáncer es el responsable de una gran parte de la morbilidad y mortalidad en los Estados Unidos y es la segunda causa principal de muerte. El cáncer se caracteriza típicamente por la división incontrolada de una población de células. Esta división incontrolada da lugar típicamente a la formación de un tumor, que puede metastatizar posteriormente a otros sitios. Existe una necesidad de terapéuticos y estrategias adicionales para el cáncer no solo para tratar los tumores sólidos, sino las micrometástasis que se producen durante la progresión del cáncer.

La técnica anterior incluye WO 2010/036986. Este documento describe vectores MLV competentes para la replicación con insertos que codifican moléculas de ARN inhibitoras capaces de dar lugar a una expresión disminuida de Bma-1.

Resumen

15 La invención a la que pertenece la presente memoria descriptiva se muestra en las reivindicaciones adjuntas a esta descripción.

La descripción proporciona un vector retroviral recombinante que comprende al menos un casete de expresión que comprende al menos un agente que regula a la baja un agente inmunoinhibidor. En una realización, el vector comprende al menos dos casetes. En la presente memoria se describe que el vector retroviral recombinante
20 comprende dos agentes que regulan a la baja un agente inmunoinhibidor. En cualquiera de las realizaciones anteriores, el al menos un agente comprende una secuencia de ácido nucleico inhibitora. En otras realizaciones más de lo anterior, el al menos un agente comprende una secuencia de ácido nucleico inhibitora y un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene actividad citosina desaminasa. En la presente memoria se describe que el al menos un agente comprende una secuencia de ácido nucleico inhibitora y en donde el vector comprende además un segundo
25 agente seleccionado del grupo que consiste en (i) una segunda secuencia de ácido nucleico inhibitora, (ii) un polinucleótido que codifica un anticuerpo de cadena única, (iii) un polinucleótido que codifica un polipéptido que convierte un profármaco en un fármaco citotóxico, y (iv) un polinucleótido que codifica una citoquina o quimioquina. En otra realización, un primer casete comprende un promotor polIII unido operativamente a una secuencia de ácido nucleico inhibitora; y un segundo casete comprende un mini-promotor unido operativamente a un polinucleótido que
30 codifica un polipéptido que tiene citosina desaminasa o un anticuerpo de cadena única. En otra realización más, un primer casete comprende un promotor polIII unido operativamente a una primera secuencia de ácido nucleico inhibitora; y un segundo casete comprende un mini-promotor unido operativamente a una segunda secuencia de ácido nucleico inhibitora. En otra realización más de cualquiera de lo anterior, el vector retroviral es competente para la replicación. En una realización, el vector retroviral competente para la replicación comprende la estructura general de 5' a 3' que comprende una repetición terminal larga (LTR)-secuencia gag-secuencia pol-secuencia env-(al menos un
35 casete de expresión)-LTR. En la presente memoria se describe que el vector comprende una secuencia de polinucleótido retroviral derivada del virus de la leucemia murina (MLV), virus de la leucemia murina de Moloney (MoMLV), virus de la leucemia felina (FeLV) o virus de la leucemia de monos gibbon (GALV). En la presente memoria se describe que el MLV es un MLV anfotrópico. En otra realización más del vector retroviral competente para la
40 replicación, el vector comprende: una proteína retroviral GAG; una proteína retroviral POL; una cubierta retroviral; un polinucleótido retroviral que comprende: secuencias de repetición terminal larga (LTR) en el extremo 3' de la secuencia de polinucleótido retroviral, una secuencia promotora en el extremo 5' del polinucleótido retroviral, siendo dicho promotor adecuado para la expresión en una célula de mamífero, un dominio de ácido nucleico *gag*, un dominio de ácido nucleico *pol*; y un dominio de ácido nucleico *env*; al menos un casete que comprende una secuencia de ácido
45 nucleico heterólogo, en donde el casete está posicionado en 5' respecto a la 3' LTR y en 3' respecto al dominio de ácido nucleico *env* que codifica la cubierta retroviral; y secuencias que actúan en cis necesarias para la transcripción inversa, empaquetamiento e integración en una célula diana. En la presente memoria se describe que el promotor comprende un promotor de CMV que tiene una secuencia como se muestra en la SEQ ID NO: 1, 7-15 o 16 desde el nucleótido 1 hasta aproximadamente el nucleótido 582 y puede incluir la modificación de una o más bases del ácido
50 nucleico y que es capaz de dirigir e iniciar la transcripción. En la presente memoria se describe que el promotor comprende una secuencia como se muestra en la SEQ ID NO: 1, 7-15 o 16 desde el nucleótido 1 hasta aproximadamente el nucleótido 582. En la presente memoria se describe que el promotor comprende un polinucleótido del dominio CMV-R-U5. En la presente memoria se describe que el dominio CMV-R-U5 comprende el promotor inmediato temprano del citomegalovirus humano unido a una región R-U5 de MLV. En la presente memoria se describe que el polinucleótido del dominio CMV-R-U5 comprende una secuencia como se muestra en la SEQ ID NO: 1, 7-15 o

16 desde aproximadamente el nucleótido 1 hasta aproximadamente el nucleótido 1202 o secuencias que son al menos 95 % idénticas a una secuencia como se muestra en la SEQ ID NO: 1, 7-15 o 16 desde el nucleótido 1 hasta aproximadamente el nucleótido 1202, en donde el polinucleótido promueve la transcripción de una molécula de ácido nucleico unida operativamente al mismo. En otra realización, el dominio de ácido nucleico *gag* comprende una secuencia desde aproximadamente el número de nucleótido 1203 hasta aproximadamente el nucleótido 2819 de SEQ ID NO: 1, 7-15 o 16. En otra realización más, el dominio *pol* puede comprender una secuencia desde aproximadamente el número de nucleótido 2820 hasta aproximadamente el nucleótido 6358 de SEQ ID NO: 1, 7-15 o 16. En una realización adicional, el dominio *env* codifica una proteína env anfotrópica. En una realización adicional más, el dominio *env* puede comprender una secuencia desde aproximadamente el número de nucleótido 6359 hasta aproximadamente el nucleótido 8323 de SEQ ID NO: 1, 7-15 o 16. En otra realización, el al menos un casete comprende un promotor polIII unido operativamente a una secuencia de ácido nucleico inhibidora, de manera que se expresa la secuencia de ácido nucleico inhibidora. En una realización adicional, el promotor polIII comprende un promotor H1 o un promotor U6. En una realización adicional, el promotor H1 comprende una secuencia como se muestra en la SEQ ID NO: 7 o 12 desde aproximadamente 8330 a 8553 y comprende secuencias de terminación polIII desde aproximadamente 8885 a 8889 y 8925 a 8930. En otra realización, el promotor U6 comprende una secuencia como se muestra en la SEQ ID NO: 8 o 13 desde aproximadamente 8330-8595 y comprende secuencia de terminación polIII desde aproximadamente 8922-8926 y 8962 a 8967. En otra realización, el al menos un casete comprende un mini-promotor. En una realización adicional, el mini-promotor es un promotor de RSV. En una realización adicional más, el promotor de RSV comprende una secuencia desde aproximadamente 8330 a aproximadamente 8591 de SEQ ID NO: 9, 10, 14, 15, o 16. En otra realización más, el promotor de RSV está unido operativamente a una secuencia de ácido nucleico inhibidora. En otra realización, el promotor de RSV está unido operativamente a un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene actividad citosina desaminasa. En otra realización más, el promotor de RSV está unido operativamente a un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene citosina desaminasa seguido de y unido operativamente a una secuencia de ácido nucleico inhibidora. En otra realización más de lo anterior, el al menos un casete comprende dos casetes. En una realización adicional, un primer casete comprende un promotor H1 o U6 unido a una secuencia de ácido nucleico inhibidora y el segundo casete comprende un promotor de RSV unido operativamente a un polinucleótido que codifica un polipéptido. En una realización de especificación, el vector comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 7-15 y 16. En otra realización más, en donde el vector comprende un casete que codifica un polipéptido, el polinucleótido que codifica el polipéptido está optimizado para codones humanos. En la presente memoria se describe que el polipéptido que tiene actividad citosina desaminasa está estabilizado con calor. En otra realización más, la secuencia de ácido nucleico inhibidora inhibe PDL1 o IDO1. En una realización adicional, el vector comprende al menos dos casetes. En otra realización más, al menos uno de los al menos dos casetes comprende un gen de interferón- γ (IFN γ). En una realización adicional, al menos uno de los casetes comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene actividad citosina desaminasa. En la presente memoria se describe que al menos un casete comprende una secuencia de ácido nucleico inhibidora y la secuencia heteróloga está precedida de un promotor polIII o un promotor RSV.

La descripción también proporciona un vector retroviral recombinante como se describe en la presente memoria para uso en el tratamiento de un cáncer o de un trastorno de la proliferación celular.

Los detalles de una o más realizaciones de la descripción se muestran en los dibujos adjuntos y la descripción siguiente. Otras características, objetos, y ventajas serán evidentes a partir de la descripción y dibujos, y a partir de las reivindicaciones.

Descripción breve de los dibujos

La **Figura 1A-C** muestra construcciones esquemáticas de la descripción. (A) Muestra un núcleo de RRV con un sitio de clonación MluI/NotI para la inserción de un casete que contiene un pri-miARN o un pri-miARN dirigido por un promotor H1. (B) Muestra un núcleo de pAC3-yCD2 con un casete IRES o de promotor RSV con un sitio de clonación NotI para la inserción de un casete que comprende un promotor H1 que dirige un pre-ARNmi. (C) Muestra un núcleo pAC3 con un casete IRES o de promotor RSV unido a un anticuerpo (p. ej., un anticuerpo de cadena única (scAB) y un sitio de clonación NotI para el casete opcional que comprende un promotor H1 que dirige un pre-ARNmi.

La **Figura 2** muestra la expresión de la proteína IDO1 en distintas líneas celulares de glioma.

La **Figura 3** muestra la expresión en la superficie celular de PD-L1 en distintas líneas celulares de cáncer.

La **Figura 4** muestra la expresión génica de las isoformas TGF β 1, 2 y 3 en distintas líneas celulares de cáncer.

La **Figura 5** muestra esquemas de vectores RRV-ARNsh de la descripción.

La **Figura 6** muestra la inactivación de la expresión de IDO1 por RRV-U6-IDO1ARNsh y RRV-U6-IDO1miR30ARNsh.

La **Figura 7** muestra la inactivación de la expresión en la superficie celular de PDL1 por RRV-U6-PDL1ARNsh y RRV-U6-PDL1miRARNsh.

La **Figura 8** muestra la inactivación de la expresión de TGFβ2 por RRV-U6-TGFβ2ARNsh y RRV-U6-TGFβ2miRARNsh.

5 La **Figura 9** muestra la estabilidad del vector de vectores RRV-U6-miR30ARNsh dirigidos a IDO1, PDL1 y TGFβ2.

La **Figura 10** muestra la inactivación de la expresión de IDO1 por RRV-H1-IDO1miR30ARNsh, RRV-RSV-IDO1miR30ARNsh, RRV-RSV-yCD2-IDO1miR30ARNsh y RRV-RSV-yCD2-U6-IDO1miR30ARNsh.

La **Figura 11** muestra la inactivación de la expresión en la superficie celular de PDL1 por RRV-H1-PDL1miR30ARNsh.

10 La **Figura 12** muestra la estabilidad del vector de RRV-U6-miR30ARNsh, RRV-H1-miR30ARNsh, RRV-RSV-miR30ARNsh, RRV-RSV-yCD2-miR30ARNsh y RRV-RSV-yCD2-U6-miR30ARNsh dirigidos a IDO1 y PDL1.

La **Figura 13** muestra la inactivación de la expresión en la superficie celular de PDL1 por RRV-RSV-PDL1miR30ARNsh.

La **Figura 14** muestra la inactivación de la expresión en la superficie celular de PDL1 por RRV-RSV-yCD2-PDL1miR30ARNsh.

15 La **Figura 15** muestra la inactivación de la expresión en la superficie celular de PDL1 por RRV-RSV-yCD2-U6-PDL1miR30ARNsh.

La **Figura 16A-C** muestra la separación por FACS de células TIL (IFNγ en el eje de las y; CD8 en el eje de las x).

La **Figura 17** muestra un diagrama esquemático de vectores retrovirales no replicativos pBA9b-IFNγ.

La **Figura 18A** muestra la regulación al alza de MHC Clase I inducida por mIFNγ en células CT-26.

20 La **Figura 18B** muestra la regulación al alza de MHC Clase I inducida por hIFNγ en células HT-1080.

La **Figura 19** muestra un diagrama esquemático de vectores retrovirales no replicativos pBA9b-IFNγ-yCD2 y pBA9b-IL2.

La **Figura 20A** muestra la bioactividad de ARNsh dirigidos a IDO-1 en células infectadas con RRV-ARNsh.

La **Figura 20B** muestra la bioactividad de ARNsh dirigidos a PDL-1 en células infectadas con RRV-ARNsh.

25 La **Figura 20C** muestra la bioactividad de ARNsh dirigidos a TGF-β2 en células infectadas con RRV-ARNsh.

La **Figura 21** muestra un diagrama esquemático de vectores retrovirales no replicativos pBA9b-IFNγ-ARNsh.

Los símbolos de referencia semejantes en los distintos dibujos indican elementos semejantes.

Descripción detallada

30 Tal y como se usa en la presente memoria y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una" y "el/la" incluyen los referentes plurales a no ser que el contexto dicte claramente otra cosa. Así, por ejemplo, la referencia a "una célula" incluye una pluralidad de dichas células y la referencia a "el agente" incluye la referencia a uno o más agentes conocidos por los expertos en la técnica, y así sucesivamente.

También, el uso de "o" significa "y/o" a no ser que se afirme otra cosa. De forma similar, "comprenden", "comprende", "que comprende", "incluyen", "incluye" y "que incluye" son intercambiables y no se pretende que sean limitantes.

35 Debe entenderse además que cuando las descripciones de distintas realizaciones usan el término "que comprende", los expertos en la técnica entenderán que, en algunos casos específicos, una realización puede describirse alternativamente usando la expresión "que consiste esencialmente en" o "que consiste en".

A no ser que se definan de otra forma, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que el entendido comúnmente por un experto en la técnica a la que pertenece esta descripción.

40 Aunque pueden usarse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente memoria en la práctica de los métodos y composiciones descritos, en la presente memoria se describen métodos, dispositivos y materiales ejemplares.

Las publicaciones discutidas anteriormente y a lo largo del texto se proporcionan solamente para su descripción antes de la fecha de presentación de la presente solicitud. No debe considerarse nada en la presente memoria como una admisión de que los inventores no tienen derecho a antedatar dicha descripción en virtud de la descripción anterior.

El término "trastorno de la proliferación celular" se refiere a una afección caracterizada por un número anormal de células. La afección puede incluir un crecimiento celular tanto hipertrófico (la multiplicación continua de células que da lugar a un crecimiento excesivo de una población celular en un tejido) como hipotrófico (una ausencia o deficiencia de células en un tejido) o un flujo o migración excesivo de células en un área de un cuerpo. Las poblaciones celulares no son necesariamente células transformadas, tumorogénicas o malignas, sino que también pueden incluir células normales. Los trastornos de la proliferación celular incluyen trastornos asociados con un crecimiento excesivo de los tejidos conectivos, tales como distintas afecciones fibróticas, incluyendo escleroderma, artritis y cirrosis hepática. Los trastornos de la proliferación celular incluyen trastornos neoplásicos tales como carcinomas de cabeza y cuello. Los carcinomas de cabeza y cuello incluirán, por ejemplo, carcinoma de la boca, esófago, garganta, laringe, glándula tiroidea, lengua, labios, glándulas salivares, nariz, senos paranasales, nasofaringe, bóveda nasal superior y tumores del seno, estesonuroblastoma, cáncer de células escamosas, melanoma maligno, carcinoma sinonasal indiferenciado (SNUC), neoplasia del cerebro (incluyendo glioblastomas) o de la sangre. También están incluidos el carcinoma de los nódulos linfáticos regionales incluyendo nódulos linfáticos cervicales, nódulos linfáticos prelaríngeos, nódulos linfáticos pulmonares yuxtatoesofágicos y nódulos linfáticos submandibulares (Harrison's Principles of Internal Medicine (eds., Isselbacher, *et al.*, McGraw-Hill, Inc., 13^a Edición, p1850-1853, 1994). Otros tipos de cáncer, incluyen, pero no están limitados a, cáncer de pulmón, cáncer de colon-recto, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer del tracto urinario, linfoma de cáncer uterino, cáncer oral, cáncer pancreático, leucemia, melanoma, cáncer de estómago, cáncer de la piel y cáncer de ovario.

El término "secuencias optimizadas en codones" generalmente se refiere a secuencias de nucleótidos que se han optimizado para una especie de huésped particular mediante el reemplazo de cualesquiera codones que tienen una frecuencia de uso de menos de aproximadamente el 20 %. Las secuencias de nucleótidos que se han optimizado para la expresión en una especie de huésped dada por la eliminación de secuencias de poliadenilación espurias, eliminación de señales de corte y empalme de exones/intrones, eliminación de repeticiones semejantes a transposones y/u optimización del contenido de GC además de la optimización de codones se refieren en la presente memoria como "secuencias con expresión aumentada".

Tal y como se usa en la presente memoria, un "núcleo de promotor" se refiere a un promotor mínimo que comprende aproximadamente 50-100 pb y que carece de elementos potenciadores. Dichos núcleos de promotores incluyen, pero no están limitados a, núcleos de promotores SCP1, AdML y CMV. Más particularmente, cuando un casete con un núcleo de promotor está presente, estará presente un segundo casete (p. ej., un segundo casete de mini-promotor, un casete de promotor polIII o casete IRES) En algunas realizaciones, un vector que comprende un casete con un núcleo de promotor excluye específicamente el uso de núcleos de promotores SCP1, AdML y CMV, pero en su lugar utilizan núcleos de promotores de diseño como se describe adicionalmente en la presente memoria y más adelante.

Los núcleos de promotores incluyen determinados promotores virales. Los promotores virales, tal y como se usa en la presente memoria, son promotores que tienen una secuencia central pero también habitualmente algunos elementos accesorios adicionales. Por ejemplo, el promotor temprano para SV40 contiene tres tipos de elementos: una caja TATA, un sitio de inicio y una repetición GC (Barrera-Saldana *et al.*, EMBO J, 4:3839-3849, 1985; Yaniv, Virology, 384:369-374, 2009). La caja TATA está localizada aproximadamente 20 pares de bases en 5' del sitio de inicio de la transcripción. Las regiones de repetición GC es una repetición de 21 pares de bases que contiene seis cajas GC y es el sitio que determina la dirección de la transcripción. Esta secuencia de núcleo de promotor tiene alrededor de 100 pb. La adición de repeticiones adicionales de 72 pares de bases, convirtiéndolo así en un "mini-promotor", es útil como un potenciador de la transcripción que incrementa la funcionalidad del promotor por un factor de aproximadamente 10. Cuando la proteína SP1 interacciona con las repeticiones de 21 pb se une bien a la primera o a las últimas tres cajas GC. La unión de las primeras tres inicia la expresión temprana, y la unión de las últimas tres inicia la expresión tardía. La función de las repeticiones de 72 pb es aumentar la cantidad de ARN estable e incrementar la tasa de síntesis. Esto se hace por la unión (dimerización) con la AP1 (proteína activadora 1) para proporcionar un transcrito primario que está poliadenilado en 3' y protegido en 5'. Otros promotores virales, tales como el virus del sarcoma de Rous (RSV), el promotor del gen X de HBV, y el núcleo del promotor de timidina quinasa de herpes también pueden usarse como la base para la selección de la función deseada.

Un núcleo de promotor engloba típicamente -40 a +40 respecto al sitio de inicio de la transcripción +1 (Juven-Gershon y Kadonaga, Dev. Biol. 339:225-229, 2010), que define la localización en la que la maquinaria de la ARN polimerasa II inicia la transcripción. Típicamente, la ARN polimerasa II interacciona con varios factores de transcripción que se unen a restos de ADN en el promotor. Estos factores se conocen comúnmente como factores de transcripción "generales" o "basales" e incluyen, pero no están limitados a, TFIIA (factor de transcripción para la ARN polimerasa IIA), TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIIF, y TFIIH. Estos factores actúan de una manera "general" con todos los núcleos de promotores; por lo tanto, se refieren frecuentemente como los factores de transcripción "basales". Véase, la

Publicación PCT No. WO2014/066700, y que describe adicionalmente núcleos de promotores útiles en los métodos y composiciones de la descripción.

Por célula "que se divide" se quiere decir una célula que experimenta mitosis activa, o meiosis. Dichas células que se dividen incluyen células madre, células de la piel (p. ej., fibroblastos y queratinocitos), gametos, y otras células que se dividen conocidas en la técnica. Tienen un interés articular, y están englobadas por el término célula que se divide, las células que tienen trastornos de la proliferación celular, tales como las células neoplásicas.

Tal y como se usa en la presente memoria, el término secuencia de ácido nucleico o transgén "heterólogo" se refiere a (i) una secuencia que no existe normalmente en un retrovirus de tipo salvaje, (ii) una secuencia que se origina de una especie extraña, o (iii) si es de la misma especie, puede estar modificada sustancialmente respecto a su forma original. Alternativamente, una secuencia de ácido nucleico inalterada que no se expresa normalmente en una célula o portada por un virus es una secuencia de ácido nucleico heteróloga. En una realización específica, el polinucleótido heterólogo es (i) un polipéptido de la descripción que tiene actividad citosina desaminasa.

El término "célula huésped", tal y como se usa en la presente memoria, incluye cualquier tipo de célula que es susceptible de transformación con una construcción de ácido nucleico. El término "transformación" significa la introducción de un gen, secuencia de ADN o ARN extraño (es decir, extrínseco o extracelular) en una célula huésped, de manera que la célula huésped expresará el gen o secuencia introducido para producir una sustancia deseada, típicamente una proteína o enzima codificada por el gen o secuencia introducido. El gen o secuencia introducido puede incluir secuencias reguladoras o de control, tales como secuencias de inicio, parada, promotor, señal, secreción, u otras usadas por la maquinaria genética de la célula. Una célula huésped que recibe y expresa el ADN o ARN introducido se ha "transformado" y es un "transformante" o un "clon". El ADN o ARN introducido en una célula huésped puede provenir de cualquier fuente, incluyendo células del mismo género o especie que la célula huésped, o células de un género o especie diferente.

Tal y como se usa en la presente memoria, un "mini-promotor" o "promotor pequeño" se refiere a un dominio regulador que promueve la transcripción de un gen o secuencia de ácido nucleico codificadora unida operativamente. El mini-promotor, como el nombre implica, incluye la cantidad mínima de elementos necesaria para la transcripción y/o traducción efectiva de una secuencia codificadora unida operativamente. Un mini-promotor puede comprender un "núcleo de promotor" en combinación con elementos reguladores adicionales o un "núcleo de promotor modificado". Típicamente, el mini-promotor o núcleo de promotor modificado tendrá una longitud de aproximadamente 100-600 pb mientras un núcleo de promotor tendrá típicamente menos de aproximadamente 100pb (p. ej., aproximadamente 70-80 pb). En otras realizaciones, cuando está presente un núcleo de promotor, el casete comprenderá típicamente un elemento potenciador u otro elemento bien en 5' o 3' de la secuencia del núcleo del promotor que facilita la expresión de una secuencia codificadora unida operativamente por encima de los niveles de expresión del núcleo de promotor solo. Los promotores pequeños expresados de forma ubicua también incluyen promotores virales tales como los promotores tempranos y tardíos de SV40 (aproximadamente 340 pb), el promotor RSV LTR (aproximadamente 270 pb) y el promotor del gen X de HBV (aproximadamente 180 pb). Véase, la Publicación PCT No. WO2014/066700, y que describe adicionalmente mini-promotores útiles en los métodos y composiciones de la descripción.

La expresión célula "que no se divide" se refiere a una célula que no experimenta mitosis. Las células que no se dividen pueden estar bloqueadas en cualquier punto del ciclo celular, (p. ej., G₀/G₁, G₁/S, G₂/M), siempre que la célula no se esté dividiendo activamente. Para la infección *ex vivo*, una célula que se divide puede tratarse para bloquear la división celular por técnicas estándar usadas por los expertos en la técnica, incluyendo irradiación, tratamiento con afidocolina, privación de suero, e inhibición por contacto. Sin embargo, debe entenderse que la infección *ex vivo* se realiza frecuentemente sin bloquear las células ya que muchas células están ya paradas (p. ej., células madre). Por ejemplo, un vector lentivirus recombinante es capaz de infectar una célula que no se divide. Los ejemplos de células que no se dividen preexistentes en el cuerpo incluyen células neuronales, musculares, hepáticas, de la piel, corazón, pulmón, y médula ósea, y sus derivados. Para las células que se dividen, pueden usarse vectores onco-retrovirales.

El término "región promotora" se usa en la presente memoria en su sentido ordinario para hacer referencia a una región de nucleótidos que comprende una secuencia reguladora de ADN, en donde la secuencia reguladora deriva de un gen que es capaz de unirse a la ARN polimerasa e iniciar la transcripción de una secuencia codificadora en 3' (dirección 3'). La secuencia reguladora puede ser homóloga o heteróloga respecto a la secuencia génica deseada. Por ejemplo, puede utilizarse un amplio rango de promotores, incluyendo un promotor viral o de mamíferos, como se describe en la presente memoria.

El término "secuencia de ácido nucleico reguladora" se refiere colectivamente a secuencias promotoras, señales de poliadenilación, secuencias de terminación de la transcripción, dominios reguladores en 5', orígenes de la replicación, potenciadores y semejantes, que colectivamente proporcionan la replicación, transcripción y traducción de una secuencia codificadora en una célula receptora. No es necesario que todas estas secuencias de control estén siempre presentes, siempre que la secuencia codificadora seleccionada sea capaz de ser replicada, transcrita y traducida en una célula huésped apropiada. Un experto en la técnica puede identificar fácilmente la secuencia de ácido nucleico

reguladora a partir de bases de datos públicas y materiales. Además, un experto en la técnica puede identificar una secuencia reguladora que sea aplicable para el uso pretendido, por ejemplo, *in vivo*, *ex vivo*, o *in vitro*.

Los tumores sólidos primarios se tratan generalmente por resección quirúrgica. Sin embargo, la mayoría de los pacientes que tienen tumores sólidos también poseen micrometástasis más allá del sitio del tumor primario. Si se tratan solo con cirugía, aproximadamente el 70 % de estos pacientes experimentará recurrencia del cáncer. Además de la cirugía, muchos cánceres se tratan ahora con una combinación de terapias que implican fármacos quimioterapéuticos citotóxicos p. ej., Vincristina, vinblastina, cisplatino, metotrexato, 5-FU, etc.) y/o terapia de radiación. Una dificultad de esta estrategia es, sin embargo, que los agentes radioterapéuticos y quimioterapéuticos son tóxicos para los tejidos normales, y crean frecuentemente efectos secundarios potencialmente mortales. Además, estas estrategias tienen frecuentemente tasas extremadamente altas de fallo/remisión (hasta el 90 % dependiendo del tipo de cáncer).

A pesar de muchos años de investigación y desarrollo de nuevas modalidades de tratamiento, el cáncer permanece como la segunda causa principal de muerte en los EE. UU., y una lacra importante en todo el mundo. La modulación de la respuesta inmune ha sido reconocida durante algún tiempo como una nueva diana terapéutica potencial para la terapia del cáncer (Franks, H.A., Q. Wang, y P.M. Patel, *New anticancer immunotherapies*. *Anticancer Res*, 2012. 32: 2439-53).

Varias inmunoterapias han utilizado componentes bacterianos o virales como adyuvantes, con el fin de estimular el sistema inmune para destruir las células tumorales. Los ejemplos de dichos componentes incluyen BCG, endotoxina, vacunas bacterianas mixtas, interferones (α , β y γ), inductores de interferón (p. ej., *Brucella abortus*, y distintos virus), y factores tímicos (p. ej., fracción de timosina 5, y timosina alfa-1) (véase, generalmente, "Principles of Cancer Biotherapy", Oldham (ed.), Raven Press, Nueva York, 1987). Dichos agentes han sido generalmente útiles como adyuvantes y como estimuladores no específicos en modelos tumorales animales, pero no se ha demostrado todavía que sean generalmente efectivos en los seres humanos.

Las linfoquinas también se han utilizado en el tratamiento del cáncer. Brevemente, las linfoquinas son secretadas por una variedad de células, y generalmente tienen un efecto en células específicas en la generación de una respuesta inmune. Los ejemplos de linfoquinas incluyen interleuquinas (IL)-1, 2, 3, y 4, así como factores estimuladores de colonias tales como G-CSF, GM-CSF, y M-CSF. Un grupo utilizó IL-2 para estimular las células de la sangre periférica con el fin de expandir y producir grandes cantidades de células que son citotóxicas para las células tumorales (Rosenberg *et al.*, *N. Engl. J. Med.* 313:1485-1492, 1985).

Sin embargo, incluso a la vista de las metodologías citadas anteriormente, las terapias de modulación inmune actuales se han encontrado con un éxito limitado en estudios clínicos (Zhou, G. y H. Levitsky, *Towards curative cancer immunotherapy: overcoming posttherapy tumor escape*. *Clin Dev Immunol*, 2012. 2012: p. 12418). Una de las razones para los resultados clínicos inesperadamente malos de estas terapias se debe probablemente a la estrategia monoterapéutica en la que se basan la mayoría de las inmunoterapias para la eficacia cuando el escape inmune implica múltiples mecanismos que crean un entorno inmunosupresor tumoral (Rolle *et al.*, *Mechanisms of immune evasion by gliomas*. *Adv Exp Med Biol*, 746:53- 76, 2012; Hong y Zeng, *Awaiting a new era of cancer immunotherapy*. *Cancer Res*, 72:3715-9, 2012; Ichim *et al.*, *Exosomes as a tumor immune escape mechanism: possible therapeutic implications*. *J Transl Med*, 6:37, 2008).

Muchos tumores expresan o secretan varias moléculas inmunosupresoras (Gajewski *et al.*, *Nature Immunol*, 14:1014-1022, 2013; Motz GT. y Coukos G., *Immunity*, 39:61-73, 2013) incluyendo PD-L1, PD-L2, IDO-1 y 2, CD31, Tim3, Prostaglandina E2 (PGE2), IL-6, IL-10, VEGF, HLA G, FasL, IL-10, adenosina y TGF- β 1, 2 y 3, con el fin de escapar de las respuestas inmunes antitumorales (Avril *et al.*, *Journal of Neuroimmunology* 225:22- 33, 2010). Estas moléculas suprimen la proliferación de las células T, inhiben la activación y la diferenciación de las células T en células efectoras citotóxicas, o desencadenan la apoptosis de las células T. El escape inmune es un proceso central para el éxito oncogénico y juega un papel en el desarrollo de muchos cánceres.

Se ha identificado que el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), en particular la isoforma TGF- β 2, es un factor clave en la progresión de los gliomas malignos. TGF- β 2, descrito originalmente como "factor supresor de células T derivado de glioblastoma", está asociado con el estado de inmunosupresión de pacientes con glioblastoma, y es, por lo tanto, responsable de la pérdida de la vigilancia inmune tumoral. TGF beta tiene efectos en la capacidad de invasión del tumor, angiogénesis, proliferación tumoral y supresión inmune. Los niveles elevados de TGF beta están asociados con malignidades GBM, pancreática, colorrectal, NSCLC, próstata, melanoma, HCC y hematológicas.

Un cuerpo creciente de evidencia implica la implicación de la enzima indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO-1 o IDO-2), que cataboliza el triptófano, en la mediación de la inmunosupresión. En modelos de cáncer preclínicos, se ha demostrado que la inhibición de IDO mejora la eficacia quimioterapéutica. El mecanismo de acción es a través de la inhibición de la supresión inmune causada, lo más probablemente, por la secreción del metabolito de triptófano quinurenina que

causa apoptosis, parada del ciclo celular y activación disminuida de las células T y las células NK. Se ha mostrado que los niveles elevados de IDO ocurren en cánceres colorrectales, carcinoma hepatocelular, glioma y otros tumores.

Se ha mostrado que el receptor de la muerte programada (PD1, también conocido como PDCD1) está implicado en la regulación del equilibrio entre la activación de las células T y la tolerancia de las células T en respuesta a antígenos crónicos. Durante la infección con VIH1, se ha encontrado que la expresión de PD1 está incrementada en las células T CD4+. Se piensa que la regulación al alza de PD1 está unida, de alguna manera, a la exhaustion de las células T (definida como una pérdida progresiva de funciones efectoras clave) cuando la disfunción de las células T se observa en presencia de exposición crónica a antígenos, como es el caso en la infección por VIH. La regulación al alza de PD1 también puede estar asociada con apoptosis incrementada en estos mismos conjuntos de células durante la infección viral crónica (véase, Petrovas *et al.*, J Immunol. 183(2):1120-32, 2009). PD1 también puede jugar un papel en el escape específico de tumor de la vigilancia inmune. Se ha demostrado que PD1 está altamente expresado en linfocitos T citotóxicos (CTL) específicos de tumor tanto en leucemia mielógena crónica (CML) como en leucemia mielógena aguda (AML). PD1 también está regulado al alza en linfocitos T infiltrantes en melanoma (TILS) (véase, Dotti, Blood 114 (8): 1457-58, 2009). Se ha encontrado que los tumores expresan el ligando de PD1 (PDL-1 y PDL-2) que, cuando se combina con la regulación al alza de PD1 en los CTL, puede ser un factor contribuyente en la pérdida de funcionalidad de las células T y la incapacidad de los CTL de mediar una respuesta antitumoral efectiva. Los investigadores han mostrado que en ratones infectados crónicamente con el virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV), la administración de anticuerpos anti-PD1 bloqueaba la interacción PD1-PDL y era capaz de restaurar alguna funcionalidad de las células T (proliferación y secreción de citoquinas), y daba lugar a una disminución de la carga viral (Barber *et al.*, Nature 439(9): 682-687, 2006). La desregulación de PD1 también puede jugar un papel en la enfermedad autoinmune. Los SNP de PD1 (en particular PD 1.3) también se han asociado con un riesgo incrementado de lupus eritematoso sistémico (LES). Se ha mostrado que los pacientes con LES tienen una mayor frecuencia del alelo PD 1.3 de PD1, y que estos pacientes muestran una expresión reducida de PD1 en sus células T CD4+ activadas (véase, Bertsias *et al.*, Arthritis Rheum. 60 (1): 207-18, 2009).

Además, el bloqueo de la interacción entre PD-1 y su ligando (PD-L1) potencia las respuestas inmunes *in vitro* y media la actividad antitumoral preclínica. PD-L1 es el principal ligando de PD-1 que está regulado al alza en los tumores sólidos, donde puede inhibir la producción de citoquinas y la actividad citolítica de células T PD-1+, CD4+ y CD8+ infiltrantes en tumores. Estas propiedades hacen que PD-L1 sea una diana potencialmente prometedora para la inmunoterapia del cáncer. (Brahmer *et al.*, N Engl J Med., 366:2455-2465, 2012). El anticuerpo anti-PD-1 produjo respuestas objetivas en aproximadamente uno de cuatro a uno de cinco pacientes con cáncer de pulmón de células pequeñas, melanoma, o cáncer de células renales.

IDO-1 y PDL-1 están sobreexpresados en gliomas lo que dificulta la respuesta antitumoral adaptativa sostenida (presentación de antígenos de DC, activación/proliferación de las células T, actividad citolítica de los CTL) (Fogel-Petrovic *et al.*, Int Immunopharmacol., 7:1924-3, 2007; Wainwright *et al.*, Clin Can Res, doi: 10.1158/1078- 0432.CCR-14-0514, 2012).

Los ARN de interferencia pequeños (ARNsi) regulan a la baja la expresión génica en las células humanas. Esta tecnología tiene el potencial de tratar un amplio rango de enfermedades incluyendo los cánceres, pero la administración de estas moléculas ha supuesto una barrera significativa para la implementación y al menos varias empresas farmacéuticas importantes (Novartis, Pfizer, Abbott y Merck) han abandonado o reducido el esfuerzo respecto a esta estrategia debido a este problema.

La supresión de la producción por el tumor de moléculas inmunomoduladoras sigue siendo difícil debido a la necesidad de suprimir continuamente dicha producción, cuando se utiliza con modalidades tales como moléculas pequeñas o citoquina/anticitoquinas. La producción local continua centrada en el tumor de agentes antisupresores o proinflamatorios es deseable porque esto evita toxicidades debidas a la administración sistémica de dichos fármacos potenciadores de la inmunidad, y también proporciona la producción continua del agente antiinmunosupresor.

La descripción describe distintas realizaciones que consiguen lo anterior usando un vector viral para administrar el agente o agentes antiinmunosupresores a los tumores directamente. En una realización, el vector es un vector replicativo y el agente antiinmunosupresor se selecciona del grupo que consiste en una proteína activadora de profármaco, una citoquina, un anticuerpo de cadena única, una molécula de unión, un ARN sh/si (p. ej., una molécula de ARNi), o un agente que causa la producción de cualquiera de los anteriores incluyendo aptámeros. En una realización adicional, el vector replicativo es un vector retroviral replicativo (RRV).

Pueden usarse diferentes vectores en los métodos y composiciones de la descripción. Los polinucleótidos que codifican, por ejemplo, IFN γ , CD, PD1 y otros componentes inmunoestimuladores proporcionados en la presente memoria pueden incorporarse en uno cualquiera de una variedad de vectores de expresión adecuados para expresar un polipéptido o molécula de ARNi. Los vectores adecuados incluyen secuencias de ADN cromosómico, no cromosómico y sintético, p. ej., derivados de SV40; plásmidos bacterianos; ADN de fagos; baculovirus; plásmidos de levaduras; vectores derivados de combinaciones de plásmidos y ADN de fagos, ADN viral tal como vaccinia,

adenovirus, virus de la viruela aviar, pseudorabia, adenovirus, virus adeno-asociados, retrovirus y muchos otros. Cualquier vector que transduce material genético en una célula.

El vector viral puede ser un vector adenoviral, un vector de sarampión, un vector herpes, un vector retroviral (incluyendo un vector lentiviral), un vector rhabdoviral tal como un vector viral de estomatitis vesicular, un vector reovirus, un vector de virus del valle de Séneca, un vector de virus de viruela (incluyendo vectores derivados de viruela animal o vaccinia), un vector parvovirus (incluyendo un vector AAV), un vector alfavirus u otro vector viral conocido para un experto en la técnica (véase también, p. ej., *Concepts in Genetic Medicine*, ed. Boro Dropulic y Barrie Carter, Wiley, 2008, Hoboken, NJ.; *The Development of Human Gene Therapy*, ed. Theodore Friedmann, Cold Springs Harbor Laboratory Press, Cold springs Harbor, Nueva York, 1999; *Gene and Cell Therapy*, ed. Nancy Smyth Templeton, Marcel Dekker Inc., Nueva York, Nueva York, 2000 y *Gene Therapy: Therapeutic Mechanism and Strategies*, ed. Nancy Smyth Templeton y Danilo D Lasic, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, Nueva York, 2000).

El vector retroviral replicativo (RRV) tiene ventajas sobre los vectores replicativos líticos ya que no matan a las células diana inmediatamente dando lugar a inflamación local y una respuesta inmune centrada en el virus (en lugar de en el tumor). El uso de RRV como un vehículo de administración *in vivo* permite la diseminación viral y transgénica a lo largo de tumores sin la lisis directa del tumor, amplificando así la señal del transgén en el tumor sin inmunidad antiviral activa. Otros han intentado expresar ARNs a partir de RRV (Schaser T. *et al.* Gene Ther 2011 doi: 10.1038/gt.2011.48), pero estos vectores tuvieron un uso limitado debido a limitaciones de titulación y seguridad y solo fueron capaces de incorporar un casete de expresión génica. La descripción proporciona RRV que expresan genes activadores de profármacos en titulaciones útiles para el uso farmacéutico o que incorporan múltiples casetes. Además, el núcleo del vector de la descripción está actualmente en ensayos clínicos con genes activadores de profármacos (Cloughsey *et al.*, Neuro-Oncology 16:v110-v118, 2014. doi: 10.1093/neuonc/nou258) lo que demuestra la seguridad y potencia de estos vectores en la clínica.

La descripción proporciona RRV que inhiben la expresión o producción de moléculas inmunosupresoras en tumores. Estas moléculas pueden ser moléculas pequeñas (p. ej., adenosina, quinurenina), proteínas inmunosupresoras secretadas, citoquinas o quimioquinas (p. ej., TGF beta 1, 2 o 3, IL-1, IL-6, IL-10), ligandos inmunosupresores (p. ej., PD-L1, PD-L2, B7-H3, B7-H4, HVEM, GAL9) u otras moléculas inmunosupresoras (Pardoll D., Nat Rev Cancer, 12:252-264, 2012). En la presente memoria se describe que la producción o expresión de la molécula inmunosupresora se inhibe por la expresión de un anticuerpo de cadena única o una molécula de ARN de interferencia (molécula de ARNi). En una realización, la inhibición de la expresión o producción se consigue mediante la expresión de dos genes o casetes en un RRV. En una realización adicional, uno de los polinucleótidos heterólogos presentes en el vector expresa una molécula de ARNi. En una realización adicional más, el ARNi se expresa con un promotor pol III que dirige un casete de microRNA (miARN). En la presente memoria se describe que un segundo casete codifica uno de: otra molécula de ARNi; una proteína tal como, pero no limitado a, un gen activador de profármacos; un anticuerpo de cadena única; una citoquina/quimioquina; u otro gen anticanceroso.

La descripción proporciona vectores retrovirales replicativos que contienen un polinucleótido heterólogo que codifica, por ejemplo, una citosina desaminasa o mutante de la misma, un miARN o ARNs, una citoquina, un dominio de unión a anticuerpo etc., que puede administrarse a una célula o sujeto.

La descripción proporciona vectores retrovirales replicativos modificados. Los vectores retrovirales replicativos modificados pueden derivar de miembros de la familia retroviridae. La familia Retroviridae consiste en tres grupos: los espumavirus (o virus espumosos) tales como el virus espumoso humano (HFV); los lentivirus, así como virus visna de ovejas; y los oncovirus (aunque no todos los virus de este grupo son oncogénicos). El término "lentivirus" se usa en su sentido convencional para describir un género de virus que contiene transcriptasa inversa. Los lentivirus incluyen los "virus de inmunodeficiencia" que incluyen el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) tipo 1 y tipo 2 (VIH-1 y VIH-2) y el virus de la inmunodeficiencia de simios (SIV). Históricamente, los oncovirus se han subdividido además en los grupos A, B, C y D sobre la base de la morfología de las partículas, como se observa en microscopía electrónica durante la maduración viral. Las partículas del tipo A representan las partículas inmaduras de los virus de tipo B y D observadas en el citoplasma de las células infectadas. Estas partículas no son infecciosas. Las partículas de tipo B geman como un virión maduro de la membrana plasmática mediante el cubrimiento de las partículas de tipo A intracitoplásmicas. En la membrana, poseen un núcleo toroidal de 75 nm, a partir del que se proyectan espículas largas de glicoproteína. Después de la gemación, las partículas de tipo B contienen un núcleo electrónico denso localizado excéntricamente. El prototipo del virus de tipo B es el virus de tumor mamario de ratón (MMTV). No se pueden observar partículas intracitoplásmicas en las células infectadas con los virus de tipo C. En su lugar, las partículas maduras geman directamente desde la superficie celular mediante una condensación con forma de media luna C que se encierra en sí misma y está cubierta por la membrana plasmática. Las espículas de glicoproteína de la cubierta pueden ser visibles, junto con un núcleo electrónico denso uniforme. La gemación puede ocurrir desde la superficie de la membrana plasmática o directamente en vacuolas intracelulares. Los virus de tipo C son los más comúnmente estudiados e incluyen muchos de los virus de leucemia aviar y murina (MLV). El virus de la leucemia bovina (BLV), y los virus de la leucemia de células T humana de tipos I y II (HTLV-I/II) se clasifican de forma similar

como partículas de tipo C debido a la morfología de su gemación desde la superficie celular. Sin embargo, también tienen una morfología hexagonal regular y estructuras genómicas más complejas que los virus de tipo C prototípicos tales como los virus de la leucemia murina (MLV). Las partículas de tipo D se parecen a las partículas de tipo B en que se muestran como estructuras semejantes a anillos en el citoplasma de las células infectadas, que geman desde la superficie celular, pero el virión incorpora espículas cortas de glicoproteína en la superficie. Los núcleos electrónicos densos también están localizados excéntricamente en las partículas. El virus del mono Mason Pfizer (MPMV) es el prototipo del virus de tipo D.

Los retrovirus se han clasificado de varias maneras, pero la nomenclatura se ha estandarizado en la última década (véase, ICTVdB - The Universal Virus Database, v 4 en la Red Mundial (www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB/) y el libro de texto "Retrovirus" Eds Coffin, Hughs y Varmus, Cold Spring Harbor Press 1997). En una realización, el vector retroviral competente para la replicación puede comprender un Ortoretrovirus o, más típicamente, un vector de retrovirus gamma.

Los retrovirus se definen por la manera en la que replican su material genético. Durante la replicación, el ARN se convierte en ADN. Después de la infección de la célula, se genera una molécula de ADN bicatenario a partir de las dos moléculas de ARN que se encuentran en la partícula viral por el proceso molecular conocido como transcripción inversa. La forma del ADN se integra covalentemente en el genoma de la célula huésped como un provirus, a partir del que se expresan los ARN virales con la ayuda de factores celulares y/o virales. Los ARN virales expresados se empaquetan en partículas y se liberan como virión infeccioso.

La partícula de retrovirus está compuesta por dos moléculas de ARN idénticas. Cada genoma de tipo salvaje tiene una molécula de ARN monocatenaria de sentido positivo, que está protegida en el extremo 5' y poliadenilada en la cola 3'. La partícula de virus diploide contiene las dos cadenas de ARN formando un complejo con proteínas gag, enzimas virales (productos del gen pol) y moléculas de ARNt del huésped en una estructura de 'núcleo' de proteínas gag. Alrededor de y protegiendo esta cápside se encuentra una bicapa lipídica, derivada de las membranas de la célula huésped y que contiene las proteínas de la cubierta viral (env). Las proteínas env se unen a un receptor celular para el virus y la partícula entra típicamente en la célula huésped a través de endocitosis mediada por receptor y/o fusión de membranas.

Después de que la cubierta externa se libera, el ARN viral se copia en ADN por transcripción inversa. Esta está catalizada por la enzima transcriptasa inversa codificada por la región pol y usa el ARNt de la célula huésped empaquetado en el virión como un cebador para la síntesis de ADN. De esta manera, el genoma de ARN se convierte en el genoma más complejo de ADN.

El ADN lineal bicatenario producido por la transcripción inversa puede tener, o no, que ser circularizado en el núcleo. El provirus tiene ahora dos repeticiones idénticas en cada extremo, conocidas como repeticiones terminales largas (LTR). El extremo de las dos secuencias LTR produce el sitio reconocido por un producto de pol -- la proteína integrasa -- que cataliza la integración, de manera que el provirus se une siempre a dos pares de bases (pb) del ADN del huésped desde los extremos de las LTR. Se observa una duplicación de secuencias celulares en los extremos de ambas LTR, reminiscente del patrón de integración de los elementos genéticos transponibles. Los retrovirus pueden integrar sus ADN en muchos sitios en el ADN del huésped, pero diferentes retrovirus tienen diferentes preferencias respecto al sitio de integración. Los ADN del VIH-1 y del virus de la inmunodeficiencia de simios se integran preferentemente en los genes expresados, el ADN del virus de la leucemia murina (MLV) se integra preferentemente cerca de los sitios de inicio de la transcripción (TSS), y los ADN del virus de la leucosis de sarcoma aviar (ASLV) y virus de la leucemia de células T humana (HTLV) se integran casi aleatoriamente, mostrando una ligera preferencia por genes (Derse D. *et al.* (2007) Human T-cell leukemia virus type 1 integration target sites in the human genome: comparison with those of other retrovirus. *J Virol* 81:6731-6741; Lewinski MK, *et al.* (2006) Retroviral DNA integration: viral and cellular determinants of target-site selection. *PLoS Pathog* 2:e601).

La transcripción, corte y empalme del ARN y traducción del ADN viral integrado están mediados por las proteínas de la célula huésped. Se generan transcritos con corte y empalme variado. En el caso de los retrovirus humanos VIH-1/2 y HTLV-I/II, también se usan las proteínas virales para regular la expresión génica. La interacción entre los factores celulares y virales es un factor en el control de la latencia del virus y la secuencia temporal en la que se expresan los genes virales.

Los retrovirus pueden transmitirse horizontalmente y verticalmente. La transmisión infecciosa eficiente de los retrovirus requiere la expresión en la célula diana de receptores que reconocen específicamente las proteínas de la cubierta viral, aunque los virus pueden usar rutas de entrada no específicas independientes de receptor con una baja eficiencia. Normalmente, una infección viral da lugar a una única o pocas copias del genoma viral por célula debido al enmascaramiento o regulación a la baja del receptor que a su vez da lugar a resistencia a la superinfección (Cáp. 3 p104 en "Retroviruses", JM Coffin, SH Hughes, y HE Varmus 1997 Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor NY; Fan *et al.* *J.Virol* 28:802, 1978). Mediante la manipulación de la situación en cultivo tisular, es posible obtener algún nivel de infección múltiple, pero esta es menor de 5 copias/genoma diploide. Además, el tipo de célula

diana debe ser capaz de soportar todos los estadios del ciclo de replicación después de que el virus se haya unido y haya penetrado. La transmisión vertical ocurre cuando el genoma viral se integra en la línea germinal del huésped. El provirus pasará entonces de generación en generación como se fuera un gen celular. Por lo tanto, los provirus endógenos se establecen, frecuentemente se mantienen latentes, pero pueden activarse cuando el huésped se expone a los agentes apropiados.

Un vector adecuado de la descripción tiene una estructura general de 5' a 3' que comprende una repetición terminal larga (LTR)-secuencia gag-secuencia pol-secuencia env-(al menos un casete de expresión)-LTR. El o los casetes de expresión están justo en 3' (p. ej., 1 a 50 pb, 2-40 pb, 3-20 pb, 5-15 pb o cualquier valor entre estos) desde el extremo del gen env, pero en 5' de la LTR en 3'. Las estructuras ejemplares de un vector de la descripción se muestran en las Figuras 1A-C.

En la presente memoria se describe que la secuencia de polinucleótido retroviral deriva del virus de la leucemia murina (MLV), el virus de la leucemia murina de Moloney (MoMLV), el virus de la leucemia felina (FeLV) o el virus de la leucemia de monos gibón (GALV). En la presente memoria se describe que el MLV es un MLV anfitriónico. En una realización, el retrovirus es un oncoretrovirus o retrovirus gamma.

La descripción proporciona así un retrovirus competente para la replicación (RCR) recombinante que comprende: una proteína retroviral GAG; una proteína retroviral POL; una cubierta retroviral; un polinucleótido retroviral que comprende secuencias de repetición terminal larga (LTR) en el extremo 3' de la secuencia de polinucleótido retroviral, una secuencia promotora en el extremo 5' del polinucleótido retroviral, siendo dicho promotor adecuado para la expresión en una célula de mamífero, un dominio de ácido nucleico gag, un dominio de ácido nucleico pol y un dominio de ácido nucleico env; al menos un casete que comprende una secuencia de ácido nucleico heterólogo, en donde el casete está posicionado en 5' respecto a la LTR en 3' y en 3' respecto al dominio de ácido nucleico env que codifica la cubierta retroviral; y secuencias que actúan en cis necesarias para la transcripción inversa, empaquetamiento e integración en una célula diana. En la presente memoria se describe que la secuencia de polinucleótido retroviral deriva del virus de la leucemia murina (MLV), virus de la leucemia murina de Moloney (MoMLV), virus de la leucemia felina (FeLV) o virus de la leucemia de monos gibón (GALV). En la presente memoria se describe que el MLV es un MLV anfitriónico. En otra realización más, el retrovirus es un oncoretrovirus o retrovirus gamma.

En una realización, el promotor comprende un promotor de CMV que tiene una secuencia como se muestra en la SEQ ID NO: 1, 7-15 o 16 desde el nucleótido 1 hasta aproximadamente el nucleótido 582 y puede incluir modificación en una o más bases del ácido nucleico y que es capaz de dirigir e iniciar la transcripción. En una realización adicional más, el promotor comprende una secuencia como se muestra en la SEQ ID NO: 1, 7-15 o 16 desde el nucleótido 1 hasta aproximadamente el nucleótido 582. En una realización adicional, el promotor comprende un polinucleótido del dominio CMV-R-U5. En una realización, el dominio CMV-R-U5 comprende el promotor inmediato temprano del citomegalovirus humano unido a una región R-U5 de MLV. En otra realización más, el polinucleótido del dominio CMV-R-U5 comprende una secuencia como se muestra en la SEQ ID NO: 1, 7-15 o 16 desde aproximadamente el nucleótido 1 hasta aproximadamente el nucleótido 1202 o secuencias que son al menos un 95 % idénticas a una secuencia como se muestra en la SEQ ID NO: 1, 7-15 o 16 desde el nucleótido 1 hasta aproximadamente el nucleótido 1202, en donde el polinucleótido promueve la transcripción de una molécula de ácido nucleico unida operativamente a la misma. En la presente memoria se describe que el promotor puede ser un promotor específico de tejido tal como los descritos más adelante. En una realización adicional, el gag y pol del polinucleótido derivan de un oncoretrovirus o retrovirus gamma. El dominio de ácido nucleico gag puede comprender una secuencia desde aproximadamente el número de nucleótido 1203 hasta aproximadamente el nucleótido 2819 de SEQ ID NO: 1 y 7-16. El dominio pol puede comprender una secuencia desde aproximadamente el número de nucleótido 2820 hasta aproximadamente el nucleótido 6358 de SEQ ID NO: 1 y 7-16. En una realización, el dominio env codifica una proteína env anfitriónica. El dominio env puede comprender una secuencia desde aproximadamente el número de nucleótido 6359 hasta aproximadamente el nucleótido 8323 de SEQ ID NO: 1 y 7-16. Al menos un casete está en 3' respecto a la secuencia del gen env.

En una realización, el al menos un casete comprende un promotor polIII unido operativamente a una secuencia de ARNi que se va a expresar (véase, p. ej., la Figura 1A). En una realización, el promotor polIII comprende un promotor H1 (p. ej., SEQ ID NO: 7 o 12 desde aproximadamente 8330 a 8553, y una secuencia de terminación H1 desde aproximadamente 8885 a 8889 y 8925 a 8930). En otra realización, el promotor polIII comprende un promotor U6 (p. ej., SEQ ID NO: 8 o 13 desde aproximadamente 8330-8595 y una secuencia de terminación U6 desde aproximadamente 8922-8926 y 8962 a 8967). En cualquiera de las realizaciones anteriores, el promotor polIII (p. ej., H1 o U6) está unido operativamente a una secuencia codificadora de ARNi.

En algunas realizaciones, el al menos un casete comprende un núcleo de promotor o mini-promotor tal como el promotor de RSV. Por ejemplo, el promotor de RSV puede comprender una secuencia desde aproximadamente 8330 hasta aproximadamente 8591 de SEQ ID NO: 9, 10, 14, 15, o 16. En cualquiera de las realizaciones anteriores, el promotor de RSV está unido operativamente a una secuencia codificadora de ARNi. En otra realización, el promotor de RSV está unido operativamente a un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene actividad citosina

desaminasa (p. ej., "yCD2" que tiene una secuencia desde aproximadamente 8592 hasta aproximadamente 9068 o 9071 de SEQ ID NO: 11 y 10, respectivamente). En una realización adicional más, el promotor de RSV puede estar unido operativamente a un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene citosina desaminasa seguido de una secuencia que codifica una molécula de ARNi.

- 5 En algunas realizaciones, el al menos un casete comprende dos casetes en donde un primer casete comprende un promotor H1 o U6 unido a una secuencia codificadora de ARNi y el segundo casete comprende un promotor de RSV unido operativamente a un polinucleótido que codifica un polipéptido (p. ej., una citosina desaminasa o dominio de anticuerpo).

- 10 En la presente memoria se describe que el casete comprende un promotor unido a una secuencia codificadora de ARNi y que comprende además un IRES unido operativamente a un gen activador de profármacos (p. ej., citosina desaminasa) (véase, p. ej., la Figura 1B). En la presente memoria se describe que el casete comprende un minipromotor o IRES unido operativamente a un anticuerpo (p. ej., una secuencia de anticuerpo de cadena única). En una realización adicional más, el casete que comprende la secuencia de anticuerpo puede comprender además un promotor polIII unido operativamente a una secuencia de ARNi (véase, p. ej., la Figura 1C).

- 15 Un sitio de entrada interno de ribosoma ("IRES") se refiere a un segmento de ácido nucleico que promueve la entrada o retención de un ribosoma durante la traducción de una secuencia codificadora, habitualmente en 3' respecto al IRES. En la presente memoria se describe que el IRES puede comprender un sitio de aceptor/donante de corte y empalme, sin embargo, los IRES preferidos carecen de un sitio de aceptor/donante de corte y empalme. Normalmente, la entrada de los ribosomas en el ARN mensajero tiene lugar a través de la caperuza localizada en el extremo 5' de todos los
20 ARNm eucariotas. Sin embargo, hay excepciones a esta regla universal. La ausencia de una caperuza en algunos ARNm virales sugiere la existencia de estructuras alternativas que permiten la entrada de los ribosomas en un sitio interno de estos ARN. Hasta la fecha, varias de estas estructuras, designadas IRES por su función, se han identificado en la región no codificadora en 5' de los ARNm virales sin caperuza, tales como, en particular, de picornavirus tales como el virus de la poliomielitis (Pelletier *et al.*, 1988, Mol. Cell. Biol., 8, 1103-1112) y el virus de EMCV (virus de la encefalomiocarditis (Jang *et al.*, J. Virol., 1988, 62, 2636-2643). La descripción proporciona el uso de un IRES en el
25 contexto de un vector retroviral competente para la replicación.

- El dominio de IRES del vector puede ser cualquier IRES, sin embargo, en la presente memoria se describe que el IRES deriva de un virus de encefalomiocarditis. En la presente memoria se describe que el IRES comprende una
30 secuencia desde aproximadamente el número de nucleótido 8327 hasta aproximadamente el nucleótido 8876 de SEQ ID NO: 1 o una secuencia que tiene al menos un 95 %, 98 %, o 99 % de identidad con la misma.

- En otra realización, los promotores de ARN polimerasa III pueden ser un promotor U6 o un promotor H1. En la presente memoria se describe que el promotor polIII comprende un promotor H1 (p. ej., SEQ ID NO: 7 o 12 desde aproximadamente 8330 a 8553, y una secuencia de terminación H1 desde aproximadamente 8885 a 8889 y 8925 a 8930). En la presente memoria se describe que el promotor polIII comprende un promotor U6 promotor (p. ej., SEQ ID
35 NO: 8 o 13 desde aproximadamente 8330-8595 y una secuencia de terminación U6 desde aproximadamente 8922-8926 y 8962 a 8967).

La siguiente tabla muestra dominios ejemplares para varios vectores descritos en la presente memoria.

Tabla 1:

SEQ ID NO. 7	
Dominio	Secuencia
Gag	1203-2819
Po1	2820-6358
4070A env	6359-8323
Sitio de restricción MluI	8324-8329
Promotor H1 humano	8330-8553
IDO1miR30ARNsh2	8559-8973
Secuencia de terminación polIII	8885-8889, 8925-8930
Sitio de restricción Not I	8950-8957
SEQ ID NO. 8	
Dominio	Secuencia
Gag	1203-2819
Pol	2820-6358
4070A env	6359-8323
Sitio de restricción MluI	8324-8929
Promotor U6 humano	8330-8595
IDO1miR30ARNsh2	8645-8974

Secuencia de terminación polIII	8922-8926, 8962-8967
Sitio de restricción Not I	8987-8994
SEQ ID NO. 9	
<u>Dominio</u>	<u>Secuencia</u>
Gag	1203-2819
Po1	2820-6358
4070A env	6359-8323
Sitio de restricción MluI	8324-8329
Promotor de RSV	8330-8591
IDO1miR30ARNsh2	8598-8976
Sitio de restricción Not I	8989-8996
SEQ ID NO. 10	
<u>Dominio</u>	<u>Secuencia</u>
Gag	1203-2819
Pol	2820-6358
4070A env	6359-8323
Sitio de restricción MluI	8324-8329
Promotor de RSV	8330-8591
yCD2	8592-9071
IDO1miR30ARNsh2	9078-9456
Sitio de restricción Not I	9469-9476
SEQ ID NO. 11	
<u>Dominio</u>	<u>Secuencia</u>
Gag	1203-2819
Pol	2820-6358
4070A env	6359-8323
Sitio de restricción MluI	8324-8329
Promotor de RSV	8330-8591
yCD2	8592-9068
Promotor U6 humano	9072-9337
IDO1miR30ARNsh2	9343-9721
Secuencia de terminación pol III	9669-9673, 9709-9714
Sitio de restricción Not I	9734-9741
SEQ ID NO. 12	
<u>Dominio</u>	<u>Secuencia</u>
Gag	1203-2819
Pol	2820-6358
4070A env	6359-8323
Sitio de restricción MluI	8324-8329
Promotor H1 humano	8330-8553
PDL1miR30ARNsh4	8559-8937
Secuencia de terminación pol III	8885-8889, 8925-8930
Sitio de restricción Not I	8950-8957
SEQ ID NO. 13	
<u>Dominio</u>	<u>Secuencia</u>
Gag	1203-2819
Pol	2820-6358
4070A env	6359-8323
Sitio de restricción MluI	8324-8329
Promotor U6 humano	8330-8595
PDL1miR30ARNsh4	8645-8974
Secuencia de terminación pol III	8922-8926, 8962-8967
Sitio de restricción Not I	8987-8994
SEQ ID NO. 14	
<u>Dominio</u>	<u>Secuencia</u>
Gag	1203-2819
Pol	2820-6358
4070A env	6359-8323
Sitio de restricción MluI	8324-8329
Promotor de RSV	8330-8591
PDL1miR30ARNsh4	8598-8976
Sitio de restricción Not I	8989-8996
SEQ ID NO. 15	

<u>Dominio</u>	<u>Secuencia</u>
Gag	1203-2819
Pol	2820-6358
4070A env	6359-8323
Sitio de restricción MluI	8324-8329
Promotor de RSV	8330-8591
yCD2	8592-9071
PDL1miR30ARNsh4	9078-9456
Sitio de restricción Not I	9469-9476
SEQ ID NO. 16	
<u>Dominio</u>	<u>Secuencia</u>
Gag	1203-2819
Pol	2820-6358
4070A env	6359-8323
Sitio de restricción MluI	8324-8329
Promotor de RSV	8330-8591
yCD2	8592-9068
Promotor U6 humano	9072-9337
PDL1miR30ARNsh4	9343-9721
Secuencia de terminación pol III	9669-9673, 9709-9714
Sitio de restricción Not I	9734-9741

Como entenderá un experto en la técnica, la secuencia en 3' respecto al casete comprende secuencias no traducidas y LTR en 3' para cada uno de los vectores descritos en la presente memoria.

5 Tal y como se usa en la presente memoria, el término "interferencia de ARN" (ARNi) se refiere al proceso de silenciamiento génico posterior a la transcripción específico de secuencia mediado por ácidos nucleicos cortos de interferencia (ARNsi o microARN (miARN)). ARNi se refiere generalmente al proceso por el que el ARNsi, miARN y semejantes se expresan a partir de un transcrito de ARN polimerasa e inhiben la expresión de un gen diana. Una "secuencia de ácido nucleico inhibidora" es un oligonucleótido o polinucleótido que cuando se expresa causa el silenciamiento génico posterior a la transcripción. Una secuencia de ácido nucleico inhibidora comprende así 10 moléculas que cuando se procesan incluyen ARNsi, miARN y semejantes. El término "agente capaz de mediar la interferencia de ARN" se refiere a ARNsi, así como a vectores de ADN y ARN que codifican ARNsi cuando se transcriben en una célula. El término ARNsi o miARN se pretende que englobe cualquier molécula de ácido nucleico que sea capaz de mediar la interferencia por ARN específica de secuencia, por ejemplo, ARN de interferencia corto (ARNsi), ARN bicatenario (ARNds), micro-ARN (miARN), ARN de horquilla corto (ARNsh), oligonucleótido de interferencia corto, ácido nucleico de interferencia corto, oligonucleótido de interferencia corto modificado, ARNsi modificado químicamente, ARN de silenciamiento génico posterior a la transcripción (ARNptgs), y otros ARN no 15 codificadores.

20 El rango adecuado para diseñar longitudes de tallo de un dúplex en horquilla, incluye longitudes de tallo de 20-30 nucleótidos, 30-50 nucleótidos, 50-100 nucleótidos, 100-150 nucleótidos, 150-200 nucleótidos, 200-300 nucleótidos, 300-400 nucleótidos, 400-500 nucleótidos, 500-600 nucleótidos, y 600-700 nucleótidos. El rango adecuado para diseñar longitudes de bucle de un dúplex en horquilla, incluye longitudes de bucle de 4-25 nucleótidos, 25-50 nucleótidos, o mayor si la longitud del tallo del dúplex en horquilla es sustancial. En un determinado contexto, las estructuras en horquilla con regiones en dúplex que son mayores de 21 nucleótidos pueden promover el silenciamiento efectivo dirigido por ARNsi, independientemente de la secuencia y longitud del bucle.

25 Los MicroARNA (miARN) son ARN pequeños no codificadores. Están localizados en los intrones de un gen codificador o no codificador, exones de genes no codificadores o en regiones intergénicas. Los genes de miARN se transcriben por la ARN polimerasa II que genera polinucleótidos precursores denominados miARN precursor primario (pri-miARN). El pri-miARN en el núcleo se procesa por la ribonucleasa Drosha para producir el precursor del miARN (pre-miARN) que forma una estructura en horquilla corta. Posteriormente, el pre-miARN se transporta al citoplasma mediante la 30 Exportina 5 y se procesa adicionalmente por otra ribonucleasa denominada Dicer para generar un miARN maduro activo.

35 Un miARN maduro tiene una longitud de aproximadamente 21 nucleótidos. Ejerce su función uniéndose a la región no traducida en 3' del ARNm de los genes diana y suprimiendo la expresión de proteínas bien por represión de la traducción de proteínas o la degradación del ARNm. Los miARN están implicados en procesos biológicos incluyendo el desarrollo, proliferación celular, diferenciación y progresión del cáncer. Los estudios del perfilado del miARN indican que algunas expresiones de miARN son específicas d tejido o están enriquecidas en determinados tejidos. Por ejemplo, se ha demostrado que las expresiones de miR-142-3p, miR-181 y miR-223 están enriquecidas en los tejidos

hematopoyéticos en los seres humanos y ratones (Baskerville et al., 2005 *RNA* 11, 241-247; Chen et al., 2004 *Science* 303, 83- 86).

Se ha observado que algunos miARN están regulados al alza (miARN oncogénicos) o regulados a la baja (represor) en varios tumores (Spizzo et al., 2009 *Cell* 137, 586e1). Por ejemplo, miR-21 está sobreexpresado en glioblastoma, cáncer de mama, pulmón, próstata, colon, estómago, esófago, y cuello uterino, leiomiomas uterino, DLBCL, cáncer de cabeza y cuello. Por el contrario, se ha reportado que los miembros de let-7 están regulados a la baja en glioblastoma, cáncer de pulmón, mama, gástrico, de ovario, próstata y colon. El restablecimiento de la homeostasis de la expresión de los miARN en el cáncer es un mecanismo imperativo para inhibir o revertir la progresión del cáncer.

Como consecuencia de las funciones vitales moduladas por los miARN en los cánceres, el foco en el desarrollo de estrategias terapéuticas potenciales se ha dirigido hacia la inhibición mediada por antisentido (antigómeros) de miARN oncogénicos. Sin embargo, el reemplazo de miARN podría representar una estrategia igualmente eficaz. En esta estrategia, los miARN más útiles terapéuticamente son los expresados a bajos niveles en los tumores, pero a un nivel alto, y por lo tanto tolerado, en los tejidos normales.

Los miARN que están regulados a la baja en los cánceres podrían ser útiles como agentes anticancerosos. Los ejemplos incluyen mir-128-1, let-7, miR-26, miR-124, y miR-137 (Esquela-Kerscher et al., 2008 *Cell Cycle* 7, 759-764; Kumar et al., 2008 *Proc Natl Acad Sci USA* 105, 3903-3908; Kota et al., 2009 *Cell* 137, 1005-1017; Silber et al., 2008 *BMC Medicine* 6:14 1-17). Se ha reportado que la expresión de miR-128 está enriquecida en el sistema nervioso central y se ha observado que está regulada a la baja en los glioblastomas (Sempere et al., 2004 *Genome Biology* 5:R13.5-11; Godlewski et al., 2008 *Cancer Res* 68: (22) 9125-9130). miR-128 está codificado por dos genes distintos, miR-128-1 y miR-128-2. Ambos se procesan en una secuencia madura idéntica. Se ha reportado que Bmi-1 y E2F3a son dianas directas de miR-128 (Godlewski et al., 2008 *Cancer Res* 68: (22) 9125-9130; Zhang et al., 2009 *J. Mol Med* 87:43-51). Además, se ha observado que la expresión de Bmi-1 está regulada al alza en una variedad de cánceres humanos, incluyendo gliomas, linfomas de células del manto, y cáncer de pulmón de células no pequeñas linfoma no de Hodgkin de células B, y cáncer de mama, colorrectal y de próstata. Además, se ha demostrado que se requiere Bmi-1 para la autorrenovación de las células madre de diversos tejidos, incluyendo células madre neuronales, así como la población de células "semejantes a madre" en los gliomas.

Las secuencias de ARNi ejemplares se muestran en la Tabla 1 (anteriormente) y se definen por sus secuencias identificadas en la tabla. Dichos ARNi incluyen, pero no están limitados a: las secuencias de IDO1miR30ARNsh2 y PDL1miR30ARNsh4 mostradas en la presente memoria.

Los vectores retrovirales replicativos de la descripción pueden usarse para tratar enfermedades mediante la expresión de ARNsi o miARN modificado por ingeniería (Dennis, *Nature*, 418: 122 2002) que inactiva o disminuye la expresión de genes clave que gobiernan la proliferación o supervivencia de células enfermas incluyendo las células tumorales. Dichas dianas incluyen genes como Rad 51 una enzima central en la reparación del ADN, y sin la cual el crecimiento celular se restringe drásticamente. Otras dianas incluyen muchas de las moléculas de la ruta de señalización que controla el crecimiento celular (Marquez y McCaffrey *Hum Gene Ther.* 19:27 2008). El ARNsi o miARN puede combinarse con la expresión de un gen citotóxico del mismo vector retroviral o uno diferente de la descripción. Un ejemplo de un gen citotóxico adecuado comprende una citosina desaminasa o citosina desaminasa modificada de la descripción. Los ejemplos de ARNsi o miARN que pueden expresarse a partir del mismo vector o un vector diferente con citosina desaminasa son ARNsi o miARN dirigidos a la timidilato sintasa, dihidropirimidina deshidrogenasa u otras enzimas de ácidos nucleicos anabólicos o sintéticas, que pueden aumentar o complementar la acción del 5-FU producido localmente en un tumor o tejido a partir de la activación de 5-FC por la citosina desaminasa.

En el uso, el o los vectores retrovirales se replicarán a través del tumor u otro tejido diana y antes de que ocurra la inhibición del crecimiento, el virus se integra en primer lugar en el genoma del huésped y continúa produciendo virus después de que se inhiba el crecimiento de esa célula. Los métodos para seleccionar secuencias de miARN o ARNsi funcionales son conocidos en la técnica. La característica clave, en general, para diseñar secuencias de ARNsi o miARN efectivas, es habitualmente evitar efectos "fuera de la diana". Sin embargo, para el uso de vectores replicativos que son altamente específicos de las células tumorales tales como los de la descripción, estos efectos secundarios no son muy importantes, ya que se espera que las células mueran eventualmente. Un vector retroviral de esta descripción puede prepararse usando células de otras especies para las que la proteína correspondiente no es una diana significativamente. Dichas células incluyen líneas celulares de perro o línea celular de pollo. Alternativamente, el virus se prepara por transfección transitoria en células derivadas de 293 humanas u otra línea celular que permita una transfección transitoria eficiente. Para este uso, no es necesario que el virus utilice un IRES, y la secuencia de ARNsi o miARN puede insertarse simplemente en un sitio conveniente en el genoma viral. Este sitio incluye la región en 3' de la cubierta y en 5' de la LTR en 3' del retrovirus replicativo.

Como se ha descrito anteriormente, las unidades de transcripción polIII pueden insertarse en el genoma viral con los ARNsi o miARN apropiados, típicamente en 3' del gen de la cubierta en 3'. Pueden insertarse varias secuencias de ARNsi o miARN diferentes para asegurar una regulación a la baja eficiente del gen diana o la regulación a la baja de

más de un gen. Las secuencias y dianas adecuadas pueden obtenerse de fuentes conocidas para los expertos en la técnica. Por ejemplo:

- la base de datos de ARNsi MIT/ICBP [http:// web.mit.edu/sirna/](http://web.mit.edu/sirna/) - "The MIT [Massachusetts Institute of Technology] /ICBP [Integrative Cancer Biology Program] La base de datos de ARNsi es un gran esfuerzo universitario para catalogar estos reactivos validados experimentalmente y hacer que la información esté disponible para otros investigadores, tanto dentro como fuera de la comunidad del MIT. (Massachusetts Institute of Technology).
- ARNi Central - [http:// katahdin.cshl.org:9331/ARNi_web/scripts/main2. pi](http://katahdin.cshl.org:9331/ARNi_web/scripts/main2.pi) Recursos de ARNi, incluyendo herramientas de diseño de ARNsi y ARNsh. (Hannon Lab, Cold Spring Harbor Laboratory)
- La red de ARNi - [http:// www.rnaiweb.com/](http://www.rnaiweb.com/) General resource.
- siDIRECT - [http:// genomics.jp/sidirect/](http://genomics.jp/sidirect/) Programa de diseño de ARNsi específicos de diana en línea para AN de interferencia de mamíferos. (Universidad de Tokio, Japón).
- Base de datos de ARNsi - Una base de datos exhaustiva de ARNsi que contiene dianas de ARNsi frente a todas las secuencias conocidas de ARNm en una variedad de organismos. (Parte del sitio de internet de la biología de sistemas Protein Lounge)
- Base de datos de ARNsi y recursos para los estudios de la interferencia de ARN [http:// www.rnainterference.org/](http://www.rnainterference.org/)
- Selector de ARNsi - [http:// bioinfo.wistar.upenn.edu/siRNA/siRNA.htm](http://bioinfo.wistar.upenn.edu/siRNA/siRNA.htm). Se usó un conjunto de reglas para evaluar la funcionalidad de ARNsi sobre la base de parámetros termodinámicos (Khvorova *et al.*, 2003, Schwarz *et al.*, 2003) y determinantes relacionados con la secuencia desarrollados por Dharmacon (Reynolds *et al.*, 2004). La especificidad se determina usando BLAST frente a las bases de datos UniGene. (Wistar Institute)
- Buscador de diana de ARNsi [http:// www \(. \) ambion.com/techlib/misc/siRNA_finder.html](http://www.ambion.com/techlib/misc/siRNA_finder.html) (Ambion).

En la presente memoria se describe un vector retroviral no replicativo (RNV, también conocido como retrovirus defectivo para la replicación). Los vectores retrovirales no replicativos (RNV) se preparan por ingeniería para que carezcan de genes y elementos clave para la transmisión. Por ejemplo, un RNV carece de uno o más de los genes *pol* o *env* o las secuencias que actúan en *cis* (Ψ) necesarias para la transcripción y empaquetamiento en una célula huésped.

El RNV de la descripción incluye al menos un promotor/potenciador transcripcional o elemento o elementos de definición del locus, u otros elementos que controlan la expresión génica por otros medios, tales como corte y empalme alternativo, exportación de ARN nuclear, modificación posterior a la traducción del mensajero, o modificación posterior a la transcripción de la proteína. Dichas construcciones de vectores incluyen una señal de empaquetamiento, repeticiones terminales largas (LTR) o parte de las mismas, y sitios de unión de cebador de cadena positiva y negativa apropiados para el retrovirus usado (si estos no están ya presentes en el vector retroviral). Opcionalmente, el vector retroviral recombinante también puede incluir una señal que dirige la poliadenilación, un marcador seleccionable tal como un marcador seleccionable no de antibióticos (p. ej., citosina desaminasa, timidina quinasa y semejantes), así como uno o más sitios de restricción y una secuencia de terminación de la traducción. Como ejemplo, dichos vectores incluyen típicamente una LTR en 5', un sitio de unión de ARNt, una señal de empaquetamiento, un origen de síntesis de la segunda cadena de ADN, y una LTR en 3' o una parte de la misma. También pueden usarse distintas modificaciones o adiciones a estas especificaciones de la estructura de RNV que pueden incrementar la seguridad o rendimiento (véase, p. ej., Corrigan-Curay *et al.*, Mol Ther op.cit; Stein *et al.* Hum Gene Ther-Clin Develop 24:86-98 2013, DOI: 10.1089/humc.2013.019)

Como se ha indicado anteriormente, la descripción proporciona retrovirus recombinantes que se construyen para portar al menos un casete o expresar una o más moléculas de ácido nucleico de interés. Los RNV de la descripción pueden construirse fácilmente a partir de una amplia variedad de retrovirus, incluyendo, por ejemplo, retrovirus de tipo B, C, y D, así como espumavirus y lentivirus. Típicamente, los retrovirus para la preparación o construcción de vehículos de administración RNV de la descripción incluyen retrovirus seleccionados del grupo que consiste en virus de la leucosis aviar, virus de la leucemia bovina, virus de la leucemia murina, virus inductores de focos en las células del visón, virus del sarcoma murino, virus de la reticuloendoteliosis y virus del sarcoma de Rous. En una realización específica, puede usarse un virus de la leucemia murina tal como MLV 4070A y 1504A (Hartley y Rowe, 1976, J. Virol. 19:19-25), de Abelson (ATCC No. VR- 999), de Friend ATCC No. VR-245), de Graffi, de Gross (ATCC No. VR-590), de Kirsten, virus del sarcoma de Harvey y de Rauscher (ATCC No. VR-998), y virus de la leucemia murina de Moloney (ATCC No. VR-190). Dichos retrovirus pueden obtenerse fácilmente de depósitos o colecciones tales como la American Type Culture Collection ("ATCC"; Manassas, Va.), o aislarse a partir de fuentes conocidas usando técnicas comúnmente disponibles.

Cualquiera de los retrovirus anteriores puede utilizarse fácilmente con el fin de ensamblar o construir un vehículo de administración génica RNV dada la descripción proporcionada en la presente memoria, y las técnicas recombinantes estándar (p. ej., Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989; Kunkle, 1985, PNAS 82:488). Además, partes de los vehículos retrovirales de administración génica

5 pueden derivar de diferentes retrovirus. Por ejemplo, en la presente memoria se describe que las LTR de los vectores retrovirales pueden derivar de un virus de sarcoma murino, un sitio de unión de ARNt de un virus de sarcoma de Rous, una señal de empaquetamiento de un virus de leucemia murina, y un origen de síntesis de segunda cadena de un virus de leucosis aviar.

En la presente memoria se describe que un RNV puede prepararse introduciendo una construcción de vector como se ha discutido anteriormente, en una célula (denominada una "célula de empaquetamiento") que contiene los elementos necesarios para la producción de retrovirus recombinantes infecciosos que no están presentes en la construcción de vector. Puede utilizarse una amplia variedad de construcciones de vector retroviral en la descripción con el fin de preparar un RNV. Por ejemplo, se proporcionan construcciones de vector retroviral que comprenden una LTR en 5', un sitio de unión de ARNt, una señal de empaquetamiento, uno o más casetes (p. ej., secuencias

10 heterólogas), un origen de síntesis de la segunda cadena de ADN y una LTR en 3', en donde la construcción de vector carece de todas o una parte de las secuencias codificadoras gag/pol o env. Brevemente, las repeticiones terminales largas ("LTR") se subdividen en tres elementos, designados U5, R y U3. Estos elementos contienen una variedad de señales que son responsables de la actividad biológica de un retrovirus, incluyendo, por ejemplo, elementos promotores y potenciadores que están localizados en U3. Las LTR pueden identificarse fácilmente en el provirus debido a la duplicación precisa en cualquier extremo del genoma. Tal y como se utiliza en la presente memoria, debería entenderse que una LTR en 5' incluye un elemento promotor en 5', y una secuencia de LTR suficiente como para permitir la transcripción inversa y la integración de la forma de ADN del vector. Debería entenderse que la LTR en 3' incluye una señal de poliadenilación, y una secuencia de LTR suficiente como para permitir la transcripción inversa y la integración de la forma de ADN del vector.

15

El sitio de unión de ARNt y el origen de la síntesis de la segunda cadena de ADN también son importantes para que un retrovirus sea biológicamente activo, y pueden identificarse fácilmente por un experto en la técnica. Por ejemplo, el ARNt retroviral se une al sitio de unión de ARNt por emparejamiento de bases de Watson-Crick, y es portado con el genoma del retrovirus en una partícula viral. El ARNt se utiliza entonces como un cebador para la síntesis del ADN por la transcriptasa inversa. El sitio de unión de ARNt puede identificarse fácilmente sobre la base de su localización justo en 3' de la LTR en 5'. De forma similar, el origen de la síntesis de la segunda cadena de ADN es, como su nombre indica, importante para la síntesis de la segunda cadena de ADN de un retrovirus. Esta región, que también se refiere como el tracto poli-purina, está localizada justo en 5' de la LTR en 3'.

20

Además de una LTR en 5' y 3', el sitio de unión de ARNt, y el origen de la síntesis de la segunda cadena de ADN, determinadas construcciones de RNV que se proporcionan en la presente memoria también comprenden una señal de empaquetamiento, así como una o más moléculas de ácido nucleico (p. ej., secuencias heterólogas), cada una de las cuales se discute con más detalle más adelante.

25

En la presente memoria se describe que se proporcionan construcciones de vector retroviral que carecen de secuencias codificadoras gag/pol y env. Tal y como se utiliza en la presente memoria, la expresión "carece de secuencias codificadoras gag/pol o env" debería entenderse que significa que el vector retroviral no contiene al menos

30 20, al menos 15, al menos 10, o al menos 8 nucleótidos consecutivos que se encuentran en los genes gag/pol o env, y en particular, en los casetes de expresión de gag/pol o env que se usan para construir líneas celulares de empaquetamiento para la construcción de vector retroviral. Alternativamente, se proporcionan construcciones de vector retroviral que carecen de secuencias pol o env pero que portan las secuencias gag que corresponden a la secuencia de empaquetamiento extendida, pero con mutaciones que impiden la traducción en esas secuencias gag.

La secuencia de ácido nucleico heteróloga de la descripción está presente típicamente en un casete bajo el control bien de las señales promotoras-potenciadoras de LTR viral o un promotor interno, y las señales retenidas en la LTR retroviral pueden todavía proporcionar una integración eficiente del vector en el genoma de la célula huésped. Por consiguiente, los vectores retrovirales recombinantes de la descripción, las secuencias, genes y/o fragmentos génicos deseados pueden insertarse en varios sitios y bajo diferentes secuencias reguladoras. Por ejemplo, un sitio para la inserción puede ser el sitio próximo al potenciador/promotor viral (es decir, locus génico dirigido por LTR en 5'). Alternativamente, las secuencias deseadas pueden insertarse en un sitio distal (p. ej., en 3' de la secuencia IRES en 3' respecto al gen env, la secuencia RSV en 3' respecto al gen env, y/o la secuencia promotora H1 o U6 en 3' respecto al gen env) o cuando dos o más secuencias heterólogas están presentes, una secuencia heteróloga puede estar bajo el control de una primera región reguladora y una segunda secuencia heteróloga bajo el control de una segunda región reguladora. Pueden usarse otros sitios distales que incluyen secuencias promotoras virales, donde la expresión de la secuencia o secuencias deseadas es a través de corte y empalme del cistrón proximal de promotor, un promotor heterólogo interno como SV40 o CMV, o un sitio de entrada de ribosoma interno (IRES).

35

40

45

50

55

Además, esta lista de promotores no debería considerarse exhaustiva o limitante, los expertos en la técnica conocerán otros promotores que pueden usarse conjuntamente con los promotores y métodos descritos en la presente memoria.

Tabla 2 Promotores específicos de tejido

Tejido	Promotor
Páncreas	Insulina Elastina Amilasa pdr-1 pdx-1 glucoquinasa
Hígado	Albúmina PEPCK potenciador de HBV α fetoproteína apolipoproteína C α -1 anitripsina vitelogenina, NF-AB Transtiretina
Músculo esquelético	Cadena H de miosina Creatina quinasa muscular Distrofina Calpaína p94 alfa-actina esquelética troponina 1 rápida
Piel	Queratina K6 Queratina K1
Pulmón	CFTR Citoqueratina 18 humana (K18) Proteínas tensioactivas pulmonares A, B y C CC-10 P1
Músculo liso	sm-22 α SM-alfa-actina
Endotelio	Endotelina-1 E-selectina factor de von Willebrand TIE, KDR/flk-1 Tirosinasa de melanocitos
Tejido adiposo	Lipoproteína lipasa (Zechner <i>et al.</i> , 1988) Adipsina (Spiegelman <i>et al.</i> , 1989) acetil-CoA carboxilasa (Pape y Kim, 1989) glicerofosfato deshidrogenasa (Dani <i>et al.</i> , 1989) P2 de adipocitos (Hunt <i>et al.</i> , 1986)
Mama	Proteína ácida del suero (WAP) (Andres <i>et al.</i> PNAS 84:1299-1303 1987
Sangre	β -globina

- 5 Los "elementos reguladores específicos de tejido" son elementos reguladores (p. ej., promotores) que son capaces de dirigir la transcripción de un gen en un tejido mientras permanecen en gran medida "silenciosos" en otros tipos de tejidos. Se entenderá, sin embargo, que los promotores específicos de tejido pueden tener una cantidad detectable de actividad de "fondo" o "basal" en aquellos tejidos en los que son silenciosos. El grado en el que un promotor se activa selectivamente en un tejido diana puede expresarse como una relación de selectividad (actividad en un tejido diana/actividad en un tejido control). A este respecto, un promotor específico de tejido útil en la práctica de la descripción tiene típicamente una relación de selectividad mayor de aproximadamente 5. Preferiblemente, la relación de selectividad es mayor de aproximadamente 15.

- 15 Se entenderá además que determinados promotores, aunque no tienen la actividad restringida a un único tipo de tejido, pueden no obstante mostrar selectividad, ya que pueden ser activos en un grupo de tejidos, y menos activos o silenciosos en otro grupo. Dichos promotores también se denominan "específicos de tejido", y se contemplan para su uso con la descripción. Por consiguiente, los elementos reguladores específicos de tejido usados en la descripción, tienen aplicabilidad para la regulación de las proteínas heterólogas tales como los polipéptidos que tienen actividad citosina desaminasa de la descripción, así como una aplicabilidad como una secuencia de polinucleótido de direccionamiento en los vectores retrovirales.

- 20 Como se ha indicado anteriormente, la descripción está dirigida generalmente hacia métodos para inhibir el crecimiento de un tumor seleccionado utilizando construcciones de vectores que dirigen la expresión de un agente antitumoral. En particular, la descripción proporciona métodos para inhibir el crecimiento de un tumor seleccionado en un animal de sangre caliente, que comprende la etapa de administrar directamente al tumor una construcción de vector de la descripción (p. ej., un RRV o RNV), que dirige la expresión de al menos un agente antitumoral, de manera que se inhibe el crecimiento del tumor.

- 30 En el contexto de la descripción, "inhibir el crecimiento de un tumor seleccionado" se refiere bien a (1) la inhibición directa de la división de las células tumorales, o (2) la lisis de las células tumorales mediada por células inmunes, o ambas, lo que da lugar a una supresión en la expansión neta de las células tumorales. La inhibición del crecimiento tumoral por cualquiera de estos dos mecanismos puede determinarla fácilmente un experto en la técnica sobre la base de varios métodos muy conocidos. Por ejemplo, la inhibición tumoral puede determinarse midiendo el tamaño tumoral real durante un periodo de tiempo. Alternativamente, la inhibición tumoral puede determinarse estimando el tamaño de un tumor (durante un periodo de tiempo) utilizando métodos muy conocidos para los expertos en la técnica. Más específicamente, puede utilizarse una variedad de métodos de imagenología radiológica (p. ej., tomografía computarizada por emisión de fotón único y positrones; véase, generalmente, "Nuclear Medicine in Clinical Oncology", Winkler, C. (ed.) Springer-Verlag, Nueva York, 1986), para estimar el tamaño tumoral. Dichos métodos también pueden utilizar una variedad de agentes de imagenología, incluyendo, por ejemplo, agentes de imagenología convencionales (p. ej., citrato de Galio-67), así como reactivos especializados para la imagenología de metabolitos, imagenología de receptores, o imagenología de inmunológica (p. ej., marcadores tumorales específicos de anticuerpos monoclonales radiomarcados). Además, también pueden utilizarse métodos no radiactivos tales como ultrasonidos (véase, "Ultrasonic Differential Diagnosis of Tumors", Kossoff y Fukuda, (eds.), Igaku-Shoin, Nueva York, 1984), para estimar el tamaño de un tumor.

Además de los métodos *in vivo* para determinar la inhibición tumoral discutidos anteriormente, puede utilizarse una variedad de métodos *in vitro* con el fin de predecir la inhibición tumoral *in vivo*. Los ejemplos representativos incluyen actividad citolítica antitumoral mediada por linfocitos determinada, por ejemplo, por un ensayo de liberación de ⁵¹Cr, proliferación de linfocitos dependiente de tumor (Ioannides *et al.*, J. Immunol. 146 (5): 1700-1707, 1991), generación *in vitro* de anticuerpos específicos de tumor (Herlyn *et al.*, J. Immunol. Meth. 73:157-167, 1984), inhibición mediada por células (p. ej., CTL, célula T auxiliar) o humoral (p. ej., anticuerpo) del crecimiento celular *in vitro* (Gazit *et al.*, Cancer Immunol. Immunother 35:135-144, 1992), y, para cualquiera de estos ensayos, la determinación de la frecuencia de precursores celulares (Vose, Int. J. Cancer 30:135-142 (1982), véase también F. Saade *et al.* Exp Rev Vaccines 11:1459-1470 2012 para una revisión de dichos métodos

Alternativamente, para otras formas de cáncer, la inhibición del crecimiento tumoral puede determinarse sobre la base de un cambio en la presencia de un marcador tumoral. Los ejemplos incluyen antígeno específico de la próstata ("PSA") para la detección de cáncer de próstata (véase la Pat. de EE. UU. No. Re. 33.405), y antígeno carcinoembrionario ("CEA") para la detección de cáncer colorrectal y determinados cánceres de mama. Para otros tipos más de cánceres tales como leucemia, la inhibición del crecimiento tumoral puede determinarse sobre la base de los números disminuidos de células leucémicas en un recuento representativo de células sanguíneas.

Puede seleccionarse una variedad de tumores para el tratamiento según los métodos descritos en la presente memoria. Pueden tratarse tumores sólidos, leucemias y linfomas. Los ejemplos representativos de tumores adecuados incluyen melanomas, carcinomas colorrectales, carcinomas de pulmón (incluyendo de células grandes, células pequeñas, escamosos y adenocarcinomas), carcinomas de células renales, glioblastomas y adenocarcinomas de mama.

Como se ha indicado anteriormente, puede utilizarse una variedad de agentes antitumorales según la descripción. En el contexto de la descripción, "agentes antitumorales" se entiende que se refiere a compuestos o moléculas que inhiben el crecimiento de un tumor seleccionado como se ha discutido anteriormente. Los ejemplos representativos de agentes antitumorales incluyen activadores inmunes e inhibidores de la proliferación tumoral. Brevemente, los activadores inmunes funcionan mejorando el reconocimiento inmune de antígenos específicos de tumor de manera que el sistema inmune se "ceba". El cebado puede consistir en la proliferación, diferenciación o evolución de los linfocitos a interacciones de mayor afinidad. El sistema inmune así cebado inhibirá o matará más efectivamente a las células tumorales. La activación inmune puede subcategorizarse en moduladores inmunes (moléculas que afectan la interacción entre el linfocito y la célula tumoral) y linfoquinas, que actúan para proliferar, activar, o diferenciar las células efectoras inmunes. Los ejemplos representativos de moduladores inmunes incluyen CD3, ICAM-1, ICAM-2, LFA-1, LFA-3, β -2-microglobulina, chaperonas, interferón- α y γ , B7/BB1 y complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). Los ejemplos representativos de linfoquinas incluyen interferón gamma, factor de necrosis tumoral, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-15, IL-23 GM-CSF, CSF-1, y G-CSF. Las secuencias codificadoras para todos estos factores son muy conocidas en la técnica.

Las secuencias que codifican los agentes antitumorales descritos anteriormente pueden obtenerse a partir de una variedad de fuentes de bases de datos públicas tales como Genbank o PubMed y pueden sintetizarse *de novo* por proveedores comerciales. Alternativamente, la secuencia puede amplificarse por PCR y clonarse a partir de bibliotecas de ADNc por métodos muy conocidos para los expertos en la técnica. Los plásmidos que contienen secuencias que codifican agentes antitumorales pueden obtenerse de las mismas maneras o a partir de depósitos tales como la American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA). Las secuencias de fuentes representativas que codifican los agentes antitumorales indicados anteriormente incluyen BBG 12 (que contiene el gen GM-CSF que codifica la proteína madura de 127 aminoácidos), BBG 6 (que contiene secuencias que codifican interferón gamma), ATCC No. 39656 (que contiene secuencias que codifican TNF), ATCC No. 20663 (que contiene secuencias que codifican interferón alfa), ATCC Nos. 31902, 31902 y 39517 (que contiene secuencias que codifican interferón beta), ATCC No. 67024 (que contiene una secuencia que codifica Interleuquina-1 β), ATCC Nos. 39405, 39452, 39516, 39626 y 39673 (que contiene secuencias que codifican interleuquina-2), ATCC Nos. 59399, 59398, y 67326 (que contienen secuencias que codifican interleuquina-3), ATCC No. 57592 (que contiene secuencias que codifican interleuquina-4), ATCC Nos. 59394 y 59395 (que contienen secuencias que codifican interleuquina-5), y ATCC No. 67153 (que contiene secuencias que codifican interleuquina-6).

Además de los agentes antitumorales descritos anteriormente, la descripción también proporciona agentes antitumorales que comprenden una proteína de fusión de, por ejemplo, dos o más citoquinas, moduladores inmunes, toxinas o factores de diferenciación. Los agentes antitumorales preferidos a este respecto incluyen interferón alfa-interleuquina-2, GM-CSF-IL-4, GM-CSF-IL-2, GM-CSF-IL-3 (véanse las Pat. de EE. UU. Nos. 5.082.927 y 5.108.910), GM-CSF-interferón gamma, e interferón gamma-IL-4. En una realización particularmente preferida, el agente antitumoral es una proteína de fusión de interferón gamma-interleuquina-2. La construcción de este o estos agentes antitumorales puede conseguirse fácilmente dada la descripción proporcionada en la presente memoria. La construcción de un agente antitumoral particularmente preferido, interferón gamma-interleuquina-2, se describe con más detalle más adelante en el Ejemplo 1F.

Los inhibidores de la proliferación tumoral actúan inhibiendo directamente el crecimiento celular, o matando directamente a la célula tumoral. Los ejemplos representativos de inhibidores de la proliferación tumoral incluyen toxinas tales como ricina (Lamb *et al.*, Eur. J. Biochem. 148:265-270, 1985), abrina (Wood *et al.*, Eur. J. Biochem. 198:723-732, 1991; Evensen, *et al.*, J. of Biol. Chem. 266:6848-6852, 1991; Collins *et al.*, J. of Biol. Chem. 265:8665-8669, 1990; Chen *et al.*, Fed. of Eur. Biochem Soc. 309:115-118, 1992), toxina de la difteria (Tweten *et al.*, J. Biol. Chem. 260:10392-10394, 1985), toxina del cólera (Mekalanos *et al.*, Nature 306:551-557, 1983; Sanchez y Holmgren, PNAS 86:481-485, 1989), gelonina (Stirpe *et al.*, J. Biol. Chem. 255:6947-6953, 1980), fitolaca (Irvin, Pharmac. Ther. 21:371-387, 1983), proteína antiviral (Barbieri *et al.*, Biochem. J. 203:55-59, 1982; Irvin *et al.*, Arch. Biochem. & Biophys. 200:418-425, 1980; Irvin, Arch. Biochem. & Biophys. 169:522-528, 1975), tritina, toxina de Shigella (Calderwood *et al.*, PNAS 84:4364-4368, 1987; Jackson *et al.*, Microb. Path. 2:147-153, 1987), y exotoxina A de Pseudomonas (Carroll y Collier, J. Biol. Chem. 262:8707-8711, 1987), timidina quinasa del virus del herpes simple (HSVTK) (Field *et al.*, J. gen. Virol. 49:115-124, 1980), citosinas desaminasas, y guanina fosforibosil transferasa de *E. coli*. Los ejemplos adicionales de inhibidores de la proliferación tumoral incluyen secuencias antisentido, ARNs y miARN que inhiben el crecimiento de las células tumorales previniendo la síntesis celular de proteínas críticas necesarias para el crecimiento celular o inhibiendo antagonistas de agentes potenciadores inmunes. Los ejemplos de secuencias antisentido incluyen timidina quinasa antisentido, dihidrofolato reductasa antisentido (Maher y Dolnick, Arch. Biochem. & Biophys. 253:214-220, 1987; Bzik *et al.*, PNAS 84:8360-8364, 1987), HER2 antisentido (Coussens *et al.*, Science 230:1132-1139, 1985), ABL antisentido (Fainstein, *et al.*, Oncogene 4:1477-1481, 1989), Myc antisentido (Stanton *et al.*, Nature 310:423-425, 1984) y ras antisentido, así como secuencias antisentido que bloquean cualquiera de las enzimas en la ruta biosintética de nucleótidos. Finalmente, los inhibidores de la proliferación tumoral también incluyen supresores tumorales tales como p53, retinoblastoma (Rb), y MCC y APC para carcinoma colorrectal.

Las líneas celulares de empaquetamiento adecuadas para uso con las construcciones de vector retroviral descritas anteriormente pueden prepararse fácilmente (véase, p. ej., la Publicación de Patente PCT No. WO 2010/148203, Publicación de Patente PCT No. WO 95/30763; y Publicación de Patente PCT No. WO 92/05266), y utilizarse para crear líneas celulares productoras (también denominadas líneas celulares productoras de vector o "VCLS") para la producción de partículas de vector recombinantes. En algunas realizaciones, las líneas celulares de empaquetamiento se preparan a partir de seres humanos (p. ej., células HT1080) permitiendo de esta manera la producción de retrovirus recombinantes que son capaces de sobrevivir a la inactivación en el suero humano. En la presente memoria se describe que las líneas celulares de empaquetamiento carecen de una ruta de función de interferón gamma para promover la producción viral óptima.

Rutinariamente, se usan modelos de ratón para ensayar los agentes biológicos. El vector de la descripción puede analizarse usando modelos de ratón. Por ejemplo, los sistemas de tumor de ratón pueden utilizarse para mostrar que las respuestas inmunes mediadas por células pueden potenciarse por la administración directa de una construcción de vector que expresa al menos un agente antitumoral. Por ejemplo, pueden inyectarse subcutáneamente a ratones Balb/C o C57B1/6 hembra de seis a ocho semanas de edad 1×10^5 a 2×10^5 células tumorales (CT26 o B16F10, respectivamente) que se dejan crecer en los ratones durante una a dos semanas. Los tumores resultantes pueden tener un tamaño variable (habitualmente 1-4 mm³ de volumen) siempre que el injerto no se vea comprometido por infección o ulceración. Se inyectan entonces intratumoralmente cinco a doscientos microlitros de una construcción de vector de la descripción, que expresa un agente antitumoral tal como, por ejemplo, IFN γ , (titulación mínima 10⁶ TU/ml). Se proporcionan múltiples inyecciones del vector en el tumor cada dos a tres días. Dependiendo de los parámetros del experimento particular, la naturaleza de las preparaciones de vector también puede ser variable. El vector puede ser de sobrenadante filtrado o no filtrado de líneas celulares productoras de vector (VCL), o puede procesarse además por filtración, concentración o diálisis y formulación. También pueden utilizarse otras técnicas estándar de purificación, tales como cromatografía de filtración en gel y de intercambio iónico para purificar el vector. Por ejemplo, puede usarse diálisis para eliminar el IFN γ que ha sido producido por la VCL en sí misma (y que, si se administra, puede afectar el crecimiento tumoral). También puede usarse diálisis para eliminar posibles inhibidores de la transducción. Otra opción es realizar inyecciones intratumorales del IFN γ de VCL en sí mismo, con el fin de introducir más extensamente el vector. Brevemente, las células pueden inyectarse después de haber sido centrifugadas de fluido de cultivo y resuspenderse en un medio farmacéuticamente aceptable (p. ej., PBS más 1 mg/ml de HSA). Pueden usarse tan pocas como 10⁵ células en dicha realización. La eficacia de la construcción de vector puede determinarse midiendo la reducción en el crecimiento del tumor primario, la reducción en la carga tumoral (como se determina por un volumen tumoral disminuido), o por la inducción de una actividad incrementada de las células T frente a las células tumorales diana (como se mide en un sistema de ensayo *in vitro* usando linfocitos aislados de los bazos de estos animales que portan tumores). En un modelo de tumor metastásico murino, la eficacia también puede determinarse inyectando en primer lugar células tumorales que son metastásicas, y, cuando el tumor tiene un volumen de 1-4 mm³, inyectando el vector varias veces en ese tumor. El injerto de tumor primario puede retirarse entonces quirúrgicamente después de 2-3 semanas, y contarse la reducción en las metástasis en el órgano diana establecido (pulmón, riñón, hígado, etc.). Para medir el cambio en las metástasis en el órgano diana, el órgano puede retirarse, pesarse, y compararse con un órgano sin tumor. Además, puede medirse la cantidad de metástasis en el órgano diana contando el número de nódulos metastásicos visibles usando un microscopio de disección con poco aumento.

Para los seres humanos, la localización para la administración directa de una construcción de vector depende de la localización del tumor o tumores. El gen de IFN γ humano o de otras secuencias que codifican agentes antitumorales puede introducirse directamente en los tumores sólidos por la administración del vector (los vectores pueden purificarse como se ha descrito previamente). También pueden administrarse a leucemias, linfomas o tumores de ascitis. Para lesiones cutáneas tales como melanomas, el vector puede inyectarse directamente en o alrededor de la lesión. Deberían administrarse al menos 10^5 TU de partículas de vector, típicamente más de 10^6 TU en una formulación farmacéuticamente aceptable (p. ej., 10 mg/ml de manitol, 1 mg/ml de HAS, Tris 25 mM pH 7,2 y NaCl 105 mM). Si se usa un curso de 5-FC complementario, los sujetos se dosifican durante 1 semana a 150mg/kg/día. Para las lesiones tumorales internas, el tumor afectado puede localizarse por rayos X, escaneo CT, imagenología de anticuerpos u otros métodos conocidos para los expertos en la técnica de la localización de tumores. La inyección del vector puede ser a través de la piel en lesiones internas, o por adaptaciones de broncoscopia (para pulmones), colonoscopia (para tumores colorrectales o esofágicos) o catéter de vaso intraarterial o intrasanguíneo (para muchos tipos de tumores sólidos vascularizados). La inyección puede ser en o alrededor de la lesión tumoral. La eficiencia de la inducción de una respuesta biológica puede medirse por CTL u otro ensayo de células T o por reacciones de hipersensibilidad de tipo retardado (DTH) en el tumor. La eficacia y respuestas clínicas pueden determinarse midiendo la carga tumoral usando rayos X, escaneo CT o imagenología de anticuerpos u otros métodos conocidos para los expertos en la técnica de la localización de tumores.

Como entenderán los expertos en la técnica, puede ser ventajoso modificar una secuencia codificadora para aumentar su expresión en un huésped particular. El código genético es redundante con 64 posibles codones, pero la mayor parte de los organismos usan preferentemente un subconjunto de estos codones. Los codones que se utilizan lo más frecuentemente en una especie se denominan codones óptimos, y los que no se utilizan muy frecuentemente se clasifican como codones raros o de bajo uso (véase, p. ej., Zhang *et al.* (1991) Gene 105:61-72). Los codones pueden sustituirse para reflejar el uso de codones preferidos del huésped, un proceso denominado a veces "optimización de codones" o "control para el sesgo de codones de la especie".

Pueden prepararse secuencias codificadoras optimizadas que contienen codones preferidos por un huésped procarionota o eucarionota particular (véase también, Murray *et al.* (1989) Nucl. Acids Res. 17:477-508; E. Angov Biotechnol J. 6: 650-659 2011, doi: 10.1002/biot.201000332), por ejemplo, para incrementar la tasa de traducción o para producir transcritos de ARN recombinantes que tienen propiedades deseables, tales como mayor semivida, en comparación con los transcritos producidos a partir de una secuencia no optimizada. Los codones de parada de la traducción también pueden modificarse para reflejar la preferencia del huésped. Por ejemplo, los codones de parada preferidos para *S. cerevisiae* y mamíferos son UAA y UGA, respectivamente. El codón de parada preferido para las plantas monocotiledóneas es UGA, mientras que los insectos y *E. coli* prefieren usar UAA como el codón de parada (Dalphin *et al.* (1996) Nucl. Acids Res. 24: 216-218).

El sesgo en el uso de codones se refiere a las diferencias entre organismos en la frecuencia de aparición de codones en las secuencias de ADN codificadoras de proteínas (genes). Un codón es una serie de tres nucleótidos (tripletes) que codifica un residuo específico de aminoácido en una cadena de polipéptido. Como hay cuatro nucleótidos en el ADN, adenina (A), guanina (G), citosina (C) y timina (T), hay 64 tripletes posibles que codifican 20 aminoácidos, y tres codones de terminación de la traducción (sin sentido). Debido a esta redundancia, todos menos dos aminoácidos están codificados por más de un triplete. Los diferentes organismos muestran preferencias particulares para uno de los varios codones que codifican el mismo aminoácido. Cómo surgen estas preferencias es un área de gran debate de la evolución molecular.

Se sabe generalmente que las preferencias de codones reflejan un equilibrio entre sesgos mutacionales y selección natural para la optimización de la traducción. Los codones óptimos en microorganismos con un crecimiento rápido, como *Escherichia coli* o *Saccharomyces cerevisiae* (levadura de panadero), reflejan la composición de su conjunto de ARNt genómico respectivo. Se piensa que los codones óptimos ayudan a conseguir tasas de traducción más rápidas y una alta exactitud. Como resultado de estos factores, se espera que la selección de la traducción sea más fuerte en genes altamente expresados, como es de hecho el caso para los organismos mencionados anteriormente. En otros organismos que no muestran tasas de crecimiento altas o que presentan genomas pequeños, la optimización en el uso de codones está normalmente ausente, y las preferencias de codones se determinan por los sesgos mutacionales característicos observados en ese genoma particular. Los ejemplos de esto son *Homo sapiens* (ser humano) y *Helicobacter pylori*. Los organismos que muestran un nivel intermedio de optimización en el uso de codones incluyen *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta), *Caenorhabditis elegans* (gusano nemátodo) o *Arabidopsis thaliana* (berro trepador).

Tabla 3: uso de codones y preferencia de codones en el ser humano. Para cada codón, la tabla muestra la frecuencia del uso de cada codón (por mil) en las regiones codificadoras humanas (primera columna) y la frecuencia relativa de cada codón entre codones sinónimos (segunda columna).

La Tabla del uso de codones humanos															
Gly	GGG	17.08	0.23	Arg	AGG	12.09	0.22	Trp	TGG	14.74	1.00	Arg	CGG	10.40	0.19
Gly	GGA	19.31	0.26	Arg	AGA	11.73	0.21	End	TGA	2.64	0.61	Arg	CGA	5.63	0.10
Gly	GGT	13.66	0.18	Ser	AGT	10.18	0.14	Cys	TGT	9.99	0.42	Arg	CGT	5.16	0.09
Gly	GGC	24.94	0.33	Ser	AGC	18.54	0.25	Cys	TGC	13.86	0.58	Arg	CGC	10.82	0.19
Glu	GAG	38.82	0.59	Lys	AAG	33.79	0.60	End	TAG	0.73	0.17	Gln	CAG	32.95	0.73
Glu	GAA	27.51	0.41	Lys	AAA	22.32	0.40	End	TAA	0.95	0.22	Gln	CAA	11.94	0.27
Asp	GAT	21.45	0.44	Asn	AAT	16.43	0.44	Tyr	TAT	11.80	0.42	His	CAT	9.56	0.41
Asp	GAC	27.06	0.56	Asn	AAC	21.30	0.56	Tyr	TAC	16.48	0.58	His	CAC	14.00	0.59
Val	GTG	28.60	0.48	Met	ATG	21.86	1.00	Leu	TTG	11.43	0.12	Leu	CTG	39.93	0.43
Val	GTA	6.09	0.10	Ile	ATA	6.05	0.14	Leu	TTA	5.55	0.06	Leu	CTA	6.42	0.07
Val	GTT	10.30	0.17	Ile	ATT	15.03	0.35	Phe	TTT	15.36	0.43	Leu	CTT	11.24	0.12
Val	GTC	15.01	0.25	Ile	ATC	22.47	0.52	Phe	TTC	20.72	0.57	Leu	CTC	19.14	0.20
Ala	GCG	7.27	0.10	Thr	ACG	6.80	0.12	Ser	TCG	4.38	0.06	Pro	CCG	7.02	0.11
Ala	GCA	15.50	0.22	Thr	ACA	15.04	0.27	Ser	TCA	10.96	0.15	Pro	CCA	17.11	0.27
Ala	GCT	20.23	0.28	Thr	ACT	13.24	0.23	Ser	TCT	13.51	0.18	Pro	CCT	18.03	0.29
Ala	GCC	28.43	0.40	Thr	ACC	21.52	0.38	Ser	TCC	17.37	0.23	Pro	CCC	20.51	0.33

Como se ha discutido previamente, los textos generales, y sitios de internet comerciales, no lucrativos y académicos que describen técnicas de biología molecular útiles en la presente memoria, incluyendo el uso de vectores, promotores y muchos otros asuntos relevantes, incluyen Current Protocols ([www.currentprotocols.com; www.springerprotocols.com; [<http://cshprotocols.chslp.org/>; Nature Protocols ([<http://www.nature.com/nprot/index.html>]; serie de Methods in Enzymology ([<http://www.elsevier.com/books/book-series/methods-in-enzymology>]).

En otra realización, la descripción proporciona un vector retroviral gamma competente para la replicación recombinante para uso en el tratamiento de un sujeto que tiene un trastorno de la proliferación celular. El sujeto puede ser cualquier mamífero, y es preferiblemente un ser humano. El sujeto se pone en contacto con un vector recombinante de la descripción. El contacto puede ser *in vivo* o *ex vivo*. Los métodos para administrar el vector de la descripción se conocen en la técnica e incluyen, por ejemplo, administración sistémica, administración tópica, administración intraperitoneal, administración intramuscular, intracraneal, cerebroespinal, así como administración directamente en el sitio de un tumor o trastorno de la proliferación celular. Otras rutas de administración conocidas en la técnica.

Se preparó vector infeccioso para uso *in vitro* y a pequeña escala por transfección transitoria de células diana como se describe. Típicamente, esto proporcionó titulaciones de 2×10^6 a 2×10^7 unidades de transducción (TU)/ml. El vector puede usarse como una preparación cruda o purificarse adicionalmente como se describe en WO2010148203. El vector infeccioso también puede prepararse usando una línea celular productora permanente y crecerse en cultivo sin suero y/o en suspensión para generar recogidas crudas de varios cientos de litros y material purificado en una formulación clínicamente aceptable como se describe (WO2010/148203). El material purificado tiene típicamente titulaciones de aproximadamente 10^9 TU/ml.

Los vectores de esta descripción pueden usarse según las propiedades del tumor diana. El tratamiento incluye habitualmente una etapa ablativa conjuntamente con una o dos moléculas de ARNsi con direccionamiento diferenciado. La etapa ablativa puede ser a través del uso de la administración de 5-FC después de la administración de un vector que codifica ARNsi anti-PD-L1 y citosina desaminasa. Alternativamente, la ablación puede ser mediante quimioterapia antes o después de la administración de un vector que codifica tanto ARNsi anti-PD-L1 como ARNsi anti-IDO-1. La quimioterapia puede ser con cualquier fármaco que se sabe que permite una recuperación inmune rápida o recuperación preferencial de células inmunes activadas sobre células inmunes inmunosupresoras tales como

Temolozolomida o Ciclofosfamida (Treg) o 5-FC/5-FU (5-FU es tóxico preferentemente para las células supresoras derivadas de mieloides).

Los vectores descritos aquí permiten la administración a largo plazo de parejas de agentes, que se sabe que son ventajosas, a diferencia de la administración de un único agente. Los vectores pueden administrarse intratumoralmente, en cavidades de resección después de la resección o Intravenosamente. La inyección intratumoral o en la cavidad de resección puede causar la regresión de la lesión local, pero también puede dar lugar a efectos sistémicos, con el control de lesiones remotas a través de respuestas inmunes. Las dosis intratumorales o en la cavidad de resección pueden ser entre 10^6 TU a 10^{11} TU, con una única inyección o alternativamente con administración seriada espaciada entre 3, 6, 12, 24 o 36 meses. La administración IV usa dosis que son hasta 1.000 veces mayores, pero lo más probablemente aproximadamente 100 o 10 veces mayores. El vector IV se administra preferiblemente en múltiples días secuenciales, por ejemplo, cada 3 días o cada 5 días o cada 7 días como en animales (Huang *et al.*, Hum Gen Ther 26:82-93, 2015). Alternativamente, la administración puede ser en múltiples días que no son secuenciales.

Así, la descripción incluye varias composiciones farmacéuticas útiles para tratar un trastorno de la proliferación celular. Las composiciones farmacéuticas según la descripción se preparan poniendo un vector que contiene una secuencia de polinucleótido heteróloga útil para tratar o modular un trastorno de la proliferación celular según la descripción en una forma adecuada para la administración a un sujeto usando vehículos, excipientes y aditivos o auxiliares. Los vehículos o auxiliares usados frecuentemente incluyen carbonato de magnesio, dióxido de titanio, lactosa, manitol y otros azúcares, talco, proteína de la leche, gelatina, almidón, vitaminas, celulosa y sus derivados, aceites animales y vegetales, polietilén glicoles y disolventes, tales como agua estéril, alcoholes, glicerol y alcoholes polihídricos. Los vehículos intravenosos incluyen reponedores de fluidos y nutrientes. Los conservantes incluyen agentes antimicrobianos, antioxidantes, quelantes y gases inertes. Otros vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen disoluciones acuosas, excipientes no tóxicos, incluyendo sales, conservantes, tampones y semejantes, como se describe, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences, 15^a ed. Easton: Mack Publishing Co., 1405-1412, 1461-1487 (1975) y The National Formulary XIV., 14^a ed. Washington: American Pharmaceutical Association (1975). El pH y la concentración exacta de los distintos componentes de la composición farmacéutica se ajustan según las técnicas rutinarias en la técnica. Véase, Goodman y Gilman's The Pharmacological Basis for Therapeutics (7^a ed.).

Se pretende que los siguientes Ejemplos ilustren, pero no limiten, la descripción. Aunque dichos Ejemplos son típicos de los que podrían usarse, pueden utilizarse alternativamente otros procedimientos conocidos por los expertos en la técnica.

Ejemplos

Los linfocitos infiltrantes en tumores (TIL) humanos pueden producir respuestas inmunes específicas de tumor cuando se estimulan con dianas celulares cognadas. Específicamente, las dianas tales como tumores o células presentadoras de antígeno que expresan un péptido antigénico específico de tumor presentado en el contexto de una molécula HLA emparejada pueden unirse al receptor de las células T (TCR) en el TIL, lo que inicia una cascada de señalización que dirige finalmente al TIL a proliferar, expresar marcadores de activación en la superficie celular y producir citoquinas efectoras tales como TNF-alfa e interferón gamma (IFN γ , Smith-Garvin *et al.*, Annu Rev Immunol 27: 591-619, 2009). Los TIL que interaccionan con tumores emparejados pueden ser herramientas útiles para entender los mecanismos inmunológicos básicos o para evaluar los parámetros inmunológicos de una inmunoterapia experimental.

Ejemplo 1: la expresión de IDO1 es inducida por IFN γ en glioma. La expresión de IDO1 que se sabe que está regulada al alza en gliomas y se induce por IFN γ . Un panel de líneas celulares de glioma fue evaluado para determinar su expresión de IDO1 después de la inducción con IFN γ . La Figura 2 muestra que IDO1 (anti-IDO1 humano a 1:1.500, Cell Signaling) está regulado al alza por IFN γ y el nivel de inducción varía entre las líneas celulares de glioma. La detección de GAPDH (anti-GAPDH humano a 1:500, Cell Signaling) se incluyó como un control de carga.

Ejemplo 2: la expresión de PD-L1 en la superficie celular se induce por IFN γ en líneas celulares de glioma y otras líneas celulares tumorales. Se sabe que la expresión de PDL1 está regulada al alza en líneas celulares de glioma y otras líneas celulares tumorales. Su expresión puede inducirse además por IFN γ . Un panel de líneas celulares de cáncer incluyendo líneas celulares de glioma se evalúa para determinar su expresión de PDL1 (anticuerpo anti-PD-L1 humano, eBioscience) antes y después de la inducción con IFN γ . La Figura 3 muestra que la expresión basal de PDL1 varía entre líneas celulares y que la mayor parte de las líneas celulares, pero no todas, ensayadas aquí responde a IFN γ para inducir adicionalmente la expresión de PDL1.

Ejemplo 3: las expresiones de TGF β 1 y 2 están reguladas al alza en un panel de líneas celulares de glioma y otras líneas celulares tumorales. Se sabe que la expresión de TGF β 1 y TGF β 2 está regulada al alza en líneas celulares de glioma y otras líneas celulares tumorales. Un panel de líneas celulares de cáncer incluyendo líneas celulares de glioma fue evaluado para determinar su expresión de TGF β 1, 2 y 3 expresión antes y después del tratamiento con IFN γ usando cebadores Taqman específicos de la isoforma de TGF β humana (Life Technology). La Figura 4 muestra que

los niveles de expresión de TGFβ1, 2 y 3 varían entre las líneas celulares. Algunas expresan más TGFβ1 y otras expresan más TGFβ2. En todos los casos, la expresión de TGFβ3 es baja. A diferencia de IDO1 y PDL1, la expresión de TGFβ1, 2 y 3 no se induce por IFNγ.

Ejemplo 4: Clonación y caracterización de pAC3-U6ARNsh y pAC3-U6miR30ARNsh frente a IDO1, PDL1 y TGFβ2. Los vectores retrovirales competentes para la replicación, pAC3-U6-miR30ARNsh, derivaron del núcleo de pAC3-yCD2 (SEQ ID NO:1). El núcleo de pAC3 se aisló por digestión con endonucleasa del ADN del plásmido pAC3-yCD2 con Mlu I y Not I. El casete U6-ARNsh contiene un promotor U6 humano y una secuencia de ARNsh específica de diana dirigida a IDO1, PDL1 y TGFβ2. El casete U6-miR30ARNsh contiene un promotor U6 y una secuencia de ARNsh específica de diana incluida en el núcleo de microARN30 (miR30) dirigida a IDO1, PDL1 y TGFβ2 (Figura 5). Cada fragmento de ADN de U6miR30ARNsh se sintetizó con sitio de enzima de restricción Mlu I y Not I presente en cada extremo del fragmento de ADN para la inserción posterior en el sitio correspondiente en el núcleo de pAC3.

Se produjo una preparación del vector por transfección transitoria del ADN plasmídico que codifica el vector en células 293T usando el método del fosfato de calcio. Cuarenta y ocho horas después de la transfección, el sobrenadante que contenía el vector se recogió y se filtró a través de un filtro de jeringa de 0,45 μm y se usó inmediatamente o se almacenó en partes alícuotas a -80 °C para uso posterior. Los valores de titulación de estos vectores se determinaron en células PC3 por el método de qPCR usando el conjunto de cebadores (5-MLV-U3-B: 5'-AGCCCAACAACCCCTCACTC-3' (SEQ ID NO: 2), 3-MLV-Psi: 5'-TCTCCCGATCCCGGACGA-3' (SEQ ID NO:3). Sonda: FAM-5'-CCCCAAATGAAAGACCCCGCTGACG-3'-BHQ1 (SEQ ID NO: 4)). Veinte microlitros de las preparaciones de vector recogidas se usaron para infectar células de cáncer de próstata humano, PC3. Cuarenta y ocho horas después de la infección, el ADN genómico de las células PC3 infectadas se extrajo para el ensayo de la titulación. La titulación de las preparaciones de vector se determinó por qPCR con una inclusión de estándares con números de copias conocidos.

Se usó una MOI de 0,1 para infectar células LN18 que se sabe que expresan un nivel marcado de IDO1, PDL1 y TGFβ2. La actividad de inactivación de miR30ARNsh para cada gen diana específico se midió directamente a nivel de proteína. Aproximadamente en el día 14 después de la infección, las células infectadas con los vectores pAC3-U6-30ARNsh y pAC3-U6miR30ARNsh se recogieron para diferentes ensayos, dependiendo del gen diana de interés, para medir la actividad de inactivación del ARNsh.

Las células LN18 infectadas con los vectores pAC3-U6-IDO1ARNsh o pAC3-U6-IDO1miR30ARNsh se recogieron para el análisis cualitativo del nivel de expresión de IDO1 después de la inducción con IFNγ. La Figura 6 muestra que pAC3-U6-IDO1ARNsh2, pAC3-U6-IDO1miR30ARNsh1 y pAC3-U6-IDO1miR30ARNsh2 tienen más del 50 % de actividad de inactivación frente a IDO1 en comparación con la de las células no infectadas. Asimismo, las células LN18 y LN229 infectadas con el vector pAC3-U6-PDL1miR30ARNsh4 también tienen más del 50 % de actividad de inactivación (Figura 7). Para la medición de la actividad de inactivación de TGFβ2, las células LN18 no infectadas o completamente infectadas con los vectores pAC3-U6-TGFβ2ARNsh1, pAC3-U6-TGFβ2ARNsh2 o pAC3-U6-TGFβ2ARNsh3 se sembraron con el mismo número de células en matraz T25. El sobrenadante de células con densidad confluyente se recogió para medir el nivel de TGFβ2 bioactivo por ELISA (R & D Systems). La Figura 8 muestra que pAC3-U6-TGFβ2ARNsh1, pAC3-U6-TGFβ2ARNsh2 y pAC3-U6-TGFβ2ARNsh4 tienen más del 50 % de actividad de inactivación. Además, el tratamiento con IFNγ y ARNsh tiene un efecto sinérgico en la regulación a la baja de TGFβ2.

La estabilidad del vector de algunos vectores pAC3-U6-miR30ARNsh frente a IDO1, PDL1 o TGFβ2 descritos anteriormente se evaluó por PCR de punto final en células LN18 infectadas. Las células infectadas con vectores a una MOI de 0,1 se subcultivan en cultivo durante hasta 21 días. El ADN genómico se extrajo de las células infectadas seguido de PCR de punto final usando un conjunto de cebadores que abarcaba la región env en 3' y UTR en 3' (UCLA-5-127: 5'-CTGATCTTACTCTTTGGACCTTG-3' (SEQ ID NO: 5); UCLA-3-37: 5'-CCCCTTTTCTGGAGACTAAATAA-3' (SEQ ID NO: 6)). La Figura 9 muestra que pAC3-U6-IDO1miR30ARNsh1, pAC3-U6-IDO1miR30ARNsh2, pAC3-U6-PDL1miR30ARNsh4, pAC3-U6-TGFβ2miR30ARNsh1, pAC3-U6-TGFβ2miR30ARNsh2, y pAC3-U6-TGFβ2miR30ARNsh4 son estables en las células LN18.

Ejemplo 5: Clonación y caracterización de pAC3-H1-mi30ARNsh frente a IDO1, PDL1. Los vectores retrovirales competentes para la replicación, pAC3-H1-IDO1miR30ARNsh y pAC3-H1-PDL1miR30ARNsh, derivan del núcleo de pAC3-yCD2 (SEQ ID NO:1). El núcleo de pAC3 se aisló por digestión con endonucleasa del ADN del plásmido pAC3-yCD2 con Mlu I y Not I. El casete H1-miR30ARNsh contiene un promotor H1 humano y una secuencia de ARNsh específica de diana dirigida a IDO1 y PDL1 (Figura 5). Cada fragmento de ADN de H1miR30ARNsh se sintetizó con sitio de enzima de restricción Mlu I y Not I presente en cada extremo del fragmento de ADN para la inserción posterior en el sitio correspondiente en el núcleo de pAC3.

Se produjo una preparación del vector por transfección transitoria del ADN plasmídico que codifica el vector en células 293T usando el método del fosfato de calcio. Cuarenta y ocho horas después de la transfección, el sobrenadante que contenía el vector se recogió y se filtró a través de un filtro de jeringa de 0,45 μm y se usó inmediatamente o se

almacenó en partes alícuotas a -80 °C para uso posterior. Los valores de titulación de estos vectores se determinaron en células PC3 por el método de qPCR usando el conjunto de cebadores (5-MLV-U3-B: 5'-AGCCACAACCCCTCACTC-3' (SEQ ID NO: 2), 3-MLV-Psi: 5'-TCTCCCGATCCCGGACGA-3' (SEQ ID NO:3). Sonda: FAM-5'-CCCCAAATGAAAGACCCCGCTGACG-3'-BHQ1 (SEQ ID NO: 4)). Veinte microlitros de las preparaciones de vector recogidas se usaron para infectar células de cáncer de próstata humano, PC3. Cuarenta y ocho horas después de la infección, el ADN genómico de las células PC3 infectadas se extrajo para el ensayo de la titulación. La titulación de las preparaciones de vector se determinó por qPCR con una inclusión de estándares con números de copias conocidos.

Se usó una MOI de 0,1 para infectar células LN18 que se sabe que expresan un nivel marcado de IDO1 y PDL1. La actividad de inactivación de miR30ARNsh para cada gen diana específico se midió directamente a nivel de proteína. Aproximadamente en el día 14 después de la infección, las células infectadas con los vectores pAC3-H1-miR30ARNsh se recogieron para diferentes ensayos, dependiendo del gen diana de interés, para medir la actividad de inactivación del ARNsh.

Las células LN18 infectadas con los vectores pAC3-H1IDO1ARNsh se recogieron para el análisis cualitativo del nivel de expresión de IDO1 después de la inducción con IFN γ . La Figura 10 muestra que pAC3-H1-IDO1miR30ARNsh2 tiene más del 50 % de actividad de inactivación frente a IDO1 en comparación con la de las células no infectadas. Asimismo, Las células LN18 infectadas con el vector pAC3-H1-PDL1miR30ARNsh4 también mostraron más del 50 % de actividad de inactivación (Figura 11).

La estabilidad del vector de algunos vectores pAC3-H1-miR30ARNsh frente a IDO1 o PDL1 descritos anteriormente se evaluó por PCR de punto final en células LN18 infectadas. Las células infectadas con los vectores a una MOI de 0,1 se subcultivaron en cultivo durante hasta 21 días. El ADN genómico se extrajo de las células infectadas seguido de PCR de punto final usando un conjunto de cebadores que abarcaba la región env en 3' y UTR en 3' (UCLA-5-127: 5'-CTGATCTTACTCTTTGGACCTTG-3' (SEQ ID NO: 5); UCLA-3-37: 5'-CCCCTTTTCTGGAGACTAAATAA-3' (SEQ ID NO: 6)). La Figura 12 muestra que pAC3-H1-IDO1miR30ARNsh2 y pAC3-H1-PDL1miR30ARNsh4 son estables en las células LN18.

Ejemplo 6: Clonación y caracterización de pAC3-RSV-miR30ARNsh frente a IDO1, PDL1. Los vectores retrovirales competentes para la replicación, pAC3-RSV-IDO1miR30ARNsh y pAC3-RSV-PDL1miR30ARNsh, derivan del núcleo de pAC3-yCD2 (SEQ ID NO:1). El núcleo de pAC3 se aisló por digestión con endonucleasa del ADN del plásmido pAC3-yCD2 con Mlu I y Not I. El casete RSVmiR30ARNsh contiene un promotor de RSV y una secuencia de ARNsh específica de diana dirigida a IDO1 y PDL1 (Figura 5). Cada fragmento de ADN de RSVmiR30ARNsh se sintetizó con sitio de enzima de restricción Mlu I y Not I presente en cada extremo del fragmento de ADN para la inserción posterior en el sitio correspondiente en el núcleo de pAC3.

Se produjo una preparación del vector por transfección transitoria del ADN plasmídico que codifica el vector en células 293T usando el método del fosfato de calcio. Cuarenta y ocho horas después de la transfección, el sobrenadante que contiene el vector se recoge y se filtra a través de un filtro de jeringa de 0,45 μ m y se usa inmediatamente o se almacena en partes alícuotas a -80 °C para uso posterior. Los valores de titulación de estos vectores se determinaron en células PC3 por el método de qPCR usando el conjunto de cebadores (5-MLV-U3-B: 5'-AGCCACAACCCCTCACTC-3' (SEQ ID NO: 2), 3-MLV-Psi: 5'-TCTCCCGATCCCGGACGA-3' (SEQ ID NO:3). Sonda: FAM-5'-CCCCAAATGAAAGACCCCGCTGACG-3'-BHQ1 (SEQ ID NO: 4)). Veinte microlitros de las preparaciones de vector recogidas se usaron para infectar células de cáncer de próstata humano, PC3. Cuarenta y ocho horas después de la infección, el ADN genómico de las células PC3 infectadas se extrajo para el ensayo de la titulación. La titulación de las preparaciones de vector se determinó por qPCR con una inclusión de estándares con números de copias conocidos.

Se usó una MOI de 0,1 para infectar células LN18 que se sabe que expresan un nivel marcado de IDO1 y PDL1. La actividad de inactivación de miR30ARNsh para cada gen diana específico se mide directamente a nivel de proteína. Aproximadamente en el día 14 después de la infección, las células infectadas con los vectores pAC3-RSV-miR30ARNsh se recogieron para diferentes ensayos, dependiendo del gen diana de interés, para medir la actividad de inactivación del ARNsh.

Las células LN18 infectadas con los vectores pAC3-RSV-IDO1ARNsh se recogieron para el análisis cualitativo del nivel de expresión de IDO1 después de la inducción con IFN γ . La Figura 10 muestra que pAC3-RSV-IDO1miR30ARNsh2 tiene más del 50 % de actividad de inactivación frente a IDO1 en comparación con la de las células no infectadas. Asimismo, las células LN18 infectadas con el vector pAC3-RSV-PDL1miR30ARNsh4 también mostraron más del 50 % de actividad de inactivación (Figura 13).

La estabilidad del vector de algunos vectores pAC3-RSV-PDL1miR30ARNsh frente a IDO1 o PDL1 descritos anteriormente se evaluaron por PCR de punto final en células LN18 infectadas. Las células infectadas con vectores a una MOI de 0,1 se subcultivan en cultivo durante hasta 21 días. El ADN genómico se extrajo de las células infectadas

seguido de PCR de punto final usando un conjunto de cebadores que abarcaba la región env en 3' y UTR en 3' (UCLA-5-127: 5'-CTGATCTTACTCTTTGGACCTTG-3' (SEQ ID NO: 5); UCLA-3-37: 5'-CCCCTTTTCTGGAGACTAAATAA-3' (SEQ ID NO: 6)). La Figura 12 muestra que pAC3-RSV-IDO1miR30ARNsh2 y pAC3-RSV-PDL1miR30ARNsh4 son estables en las células LN18.

Ejemplo 7: Clonación y caracterización de pAC3-RSV-yCD2-IDO1miR30ARNsh2 y pAC3-RSV-yCD2-PDL1miR30shRA4. Los vectores retrovirales competentes para la replicación, pAC3-RSV-yCD2-IDO1miR30ARNsh2 y pAC3-RSV-yCD2-PDL1miR30ARNsh4, derivan del núcleo de pAC3-yCD2 (SEQ ID NO:1). El núcleo de pAC3 se aisló por digestión con endonucleasa del ADN del plásmido pAC3-yCD2 con Mlu I y Not I. El casete RSV-yCD2-miR30ARNsh contiene un promotor de RSV y una secuencia de ARNsh específica de diana dirigida a IDO1 y PDL1 (Figura 5). Cada fragmento de ADN de RSV-yCD2-miR30ARNsh se sintetizó con sitio de enzima de restricción Mlu I y Not I presente en cada extremo del fragmento de ADN para la inserción posterior en el sitio correspondiente en el núcleo de pAC3.

Se produjo una preparación del vector por transfección transitoria del ADN plasmídico que codifica el vector en células 293T usando el método del fosfato de calcio. Cuarenta y ocho horas después de la transfección, el sobrenadante que contenía el vector se recogió y se filtró a través de un filtro de jeringa de 0,45 µm y se usó inmediatamente o se almacenó en partes alícuotas a -80 °C para uso posterior. Los valores de titulación de estos vectores se determinan en células PC3 por el método de qPCR usando el conjunto de cebadores (5-MLV-U3-B: 5'-AGCCCAACAACCCCTCACTC-3' (SEQ ID NO: 2), 3-MLV-Psi: 5'-TCTCCCGATCCCGGACGA-3' (SEQ ID NO:3). Sonda: FAM-5'-CCCCAAATGAAAGACCCCGCTGACG-3'-BHQ1 (SEQ ID NO:4)). Veinte microlitros de las preparaciones de vector recogidas se usaron para infectar células de cáncer de próstata humano, PC3. Cuarenta y ocho horas después de la infección, el ADN genómico de las células PC3 infectadas se extrajo para el ensayo de la titulación. La titulación de las preparaciones de vector se determinó por qPCR con una inclusión de estándares con números de copias conocidos.

Se usó una MOI de 0,1 para infectar las células LN18 que se sabe que expresan un nivel marcado de IDO1 y PDL1. La actividad de inactivación de miR30ARNsh para cada gen diana específico se midió directamente a nivel de proteína. Aproximadamente en el día 14 después de la infección, las células infectadas con los vectores pAC3-H1miR30ARNsh se recogieron para diferentes ensayos, dependiendo del gen diana de interés, para medir la actividad de inactivación del ARNsh.

Las células LN18 infectadas con los vectores pAC3-RSV-yCD2-IDO1miR30ARNsh se recogieron para el análisis cualitativo del nivel de expresión de IDO1 después de la inducción con IFNγ. La Figura 10 muestra que pAC3-RSV-yCD2-IDO1miR30ARNsh2 tiene más del 50 % de actividad de inactivación frente a IDO1 en comparación con la de las células no infectadas. Asimismo, las células LN18 infectadas con el vector pAC3-RSV-yCD2-PDL1miR30ARNsh4 también mostraron aproximadamente el 50 % actividad de inactivación (Figura 14).

La estabilidad del vector de algunos vectores pAC3-RSV-yCD2miR30ARNsh frente a IDO1 o PDL1 descritos anteriormente se evaluó por PCR de punto final en células LN18 infectadas. Las células infectadas con vectores a una MOI de 0,1 se subcultivan en cultivo durante hasta 21 días. El ADN genómico se extrajo de las células infectadas seguido de PCR de punto final usando un conjunto de cebadores que abarcaba la región env en 3' y UTR en 3' (UCLA-5-127: 5'-CTGATCTTACTCTTTGGACCTTG-3' (SEQ ID NO: 5); UCLA-3-37: 5'-CCCCTTTTCTGGAGACTAAATAA-3' (SEQ ID NO: 6)). La Figura 12 muestra que pAC3-RSV-yCD2-IDO1miR30ARNsh2 y pAC3-RSV-yCD2-PDL1miR30ARNsh4 son estables en las células LN18.

Ejemplo 8: Clonación y caracterización de pAC3-RSV-yCD2-U6-IDO1miR30ARNsh2 y pAC3-RSV-yCD2-U6-PDL1miR30shR A4. Los vectores retrovirales competentes para la replicación, pAC3-RSV-yCD2-U6-IDO1miR30ARNsh2 y pAC3-RSV-yCD2-U6-PDL1miR30ARNsh4, derivan del núcleo de pAC3-yCD2. El núcleo de pAC3 se aisló por digestión con endonucleasa del ADN del plásmido pAC3-yCD2 con Mlu I y Not I. El casete RSV-yCD2-U6-miR30ARNsh contiene un promotor de RSV y una secuencia de ARNsh específica de diana dirigida a IDO1 y PDL1 (Figura 5). Cada fragmento de ADN de RSV-yCD2-U6-miR30ARNsh se sintetizó con sitio de enzima de restricción Mlu I y Not I presente en cada extremo del fragmento de ADN para la inserción posterior en el sitio correspondiente en el núcleo de pAC3.

Se produjo una preparación del vector por transfección transitoria del ADN plasmídico que codifica el vector en células 293T usando el método del fosfato de calcio. Cuarenta y ocho horas después de la transfección, el sobrenadante que contenía el vector se recogió y se filtró a través de un filtro de jeringa de 0,45 µm y se usó inmediatamente o se almacenó en partes alícuotas a -80 °C para uso posterior. Los valores de titulación de estos vectores se determinaron en células PC3 por el método de qPCR usando el conjunto de cebadores (5-MLV-U3-B: 5'-AGCCCAACAACCCCTCACTC-3' (SEQ ID NO: 2), 3-MLV-Psi: 5'-TCTCCCGATCCCGGACGA-3' (SEQ ID NO:3). Sonda: FAM-5'-CCCCAAATGAAAGACCCCGCTGACG-3'-BHQ1 (SEQ ID NO: 4)). Veinte microlitros de las preparaciones de vector recogidas se usaron para infectar células de cáncer de próstata humano, PC3. Cuarenta y ocho horas después de la infección, el ADN genómico de las células PC3 infectadas se extrajo para el ensayo de la

titulación. La titulación de las preparaciones de vector se determinó por qPCR con una inclusión de estándares con números de copias conocidos.

Se usó una MOI de 0,1 para infectar las células LN18 que se sabe que expresan un nivel marcado de IDO1 y PDL1. La actividad de inactivación de miR30ARNsh para cada gen diana específico se mide directamente a nivel de proteína. Aproximadamente en el día 14 después de la infección, las células infectadas con los vectores pAC3-RSV-yCD2-U6-miR30ARNsh se recogieron para diferentes ensayos, dependiendo del gen diana de interés, para medir la actividad de inactivación del ARNsh.

Las células LN18 infectadas con los vectores pAC3-RSV-yCD2-U6-IDO1miR30ARNsh se recogieron para el análisis cualitativo del nivel de expresión de IDO1 después de la inducción con IFN γ . La Figura 10 muestra que pAC3-RSV-IDO1-U6-miR30ARNsh2 tiene más del 50 % de actividad de inactivación frente a IDO1 en comparación con la de las células no infectadas. Asimismo, las células LN18 infectadas con el vector pAC3-RSV-yCD2-U6-PDL1miR30ARNsh4 también mostraron aproximadamente un 40 % actividad de inactivación (Figura 15).

La estabilidad del vector de algunos vectores pAC3-RSV-yCD2-U6-miR30ARNsh frente a IDO1 o PDL1 descritos anteriormente se evaluó por PCR de punto final en las células LN18 infectadas. Las células infectadas con vectores a una MOI de 0,1 se subcultivan en cultivo durante hasta 21 días. El ADN genómico se extrajo de las células infectadas seguido de PCR de punto final usando un conjunto de cebadores que abarcaba la región env en 3' y UTR en 3' (UCLA-5-127: 5'-CTGATCTTACTCTTTGGACCTTG-3' (SEQ ID NO: 5); UCLA-3-37: 5'-CCCCTTTTCTGGAGACTAAATAA-3' (SEQ ID NO: 6)). La Figura 12 muestra que pAC3-RSV-yCD2-U6-IDO1miR30ARNsh2 y pAC3-RSV-yCD2-U6-PDL1miR30ARNsh4 son estables en las células LN18.

Ejemplo 9: el cocultivo de una línea de TIL (1520 TIL) con una línea celular diana (FEMX) activa las células T y da lugar a la producción de IFN- γ . Los efectos inmunológicos de la modulación de la expresión de PD-L1 en dianas tumorales se investigaron usando un TIL basado en melanoma (1520 TIL) reactivo frente a la línea celular de melanoma FEMX que expresa el antígeno de diferenciación gp100 (Voss *et al.*, Immunol Res 45: 13-24, 2008). En primer lugar, el sistema de tumor TIL produjo IFN- γ de una forma específica de tumor como se mide en un ensayo de liberación de citoquinas intracelular (ICS) estándar de 12 horas. Los datos se muestran en la Figura 16. El 1 % de los TIL CD3+CD8+ produjeron IFN- γ cuando se cultivaron solos (Figura 16A-cuadrante superior derecho) pero más del 24 % de los TIL CD3+CD8+ produjeron IFN cuando se cocultivaron con tumores (Figura 16B-cuadrante superior derecho).

Ejemplo 10: el bloqueo de PD-L1 incrementa la frecuencia de células T CD8+ específicas de tumores que producen IFN- γ . El experimento en el Ejemplo 9 también incluyó un brazo donde se añadieron 10 μ g de un anticuerpo anti-PD-L1 bloqueante (Biolegend clon 29E.2A3) a los tumores FEMX justo antes de añadir el TIL al cocultivo a una concentración final de 10 μ g/mL. Los resultados de este brazo del estudio mostraron que la actividad de bloqueo de PD-L1 aumentó la fracción de células T que produce IFN-gamma del 24,4 % hasta el 37,3 % (Figura 16C-cuadrante superior derecho). Pueden usarse otros puntos finales inmunológicos tales como un ensayo de proliferación CFSE o análisis fenotípico basado en citometría de flujo policromática para confirmar los efectos de esta perturbación del eje PD-L1:PD-1 en el sistema TIL, y el resultado puede demostrarse en otras parejas de células T:tumor.

Ejemplo 11: inactivación de la expresión génica de PD-L1 después de la infección con un RRV-PDL1mi30ARNsh. Se infectaron células FEMX a una multiplicidad de infección (MOI) de 0,1 con el vector RRV que expresa el PD-L1ARNsh mostrado en la Figura 20. Se dejó que la infección continuara hasta que las células tumorales estuvieron infectadas al máximo y se midió la expresión en la superficie celular de PD-L1 por citometría de flujo. Los tumores FEMX transducidos con el vector RRV que expresa el PD-L1ARNsh demostraron una inactivación significativa en la expresión de PD-L1 en comparación con las líneas tumorales parentales y con ARNsh no específicos.

Ejemplo 12: la regulación a la baja de PD-L1 mediada por RRV en dianas tumorales incrementa el reconocimiento y activación de las células T. Se tratan células FEMX como se describe en el Ejemplo 3 y el experimento mostrado en los Ejemplos 1 y 2 se repitió, con la línea FEMX diana en las formas moduladas por RRV-anti-PD-L1 y no moduladas. Esta modulación de la expresión de PD-L1, aumentó la función de las células T específicas de tumor a niveles comparables con el anticuerpo de bloqueo como se mide en nuestro sistema TIL usando la lectura del Ejemplo 10. Pueden usarse otros puntos finales inmunológicos tales como un ensayo de proliferación CFSE o análisis fenotípico basado en citometría de flujo policromática para confirmar los efectos de esta perturbación del eje PD-L1:PD-1 en el sistema TIL, y el resultado puede demostrarse en otras parejas de células T:tumor.

Ejemplo 13: la depleción de triptófano y la producción posterior de quinurenina están relacionadas con la cantidad de IDO en las células tumorales. La depleción del aminoácido esencial triptófano del medio completo mientras se incrementa la concentración de quinurenina (un metabolito tóxico del catabolismo del triptófano) ocurre cuando se cultivan tumores que expresan altas cantidades de IDO. Los niveles de expresión de IDO en los tumores pueden modularse por la transducción estable con un vector lentiviral que expresa la secuencia de ADNc de IDO (Origene). Las LN-18 parentales, control (secuencia desorganizada) y que sobreexpresan IDO (un glioblastoma humano) se

cultivan con 500 U de IFN- γ durante 72 horas y se ensayan para determinar la expresión de IDO por transferencia western, así como los niveles de triptófano y quinurenina por ELISA (Rocky Mountain Diagnostic). La expresión de la enzima IDO detectada por Western se correlaciona fuertemente con el incremento de quinurenina y la disminución de triptófano como se detecta por ELISA.

- 5 Ejemplo 14: las células T cocultivadas con tumores IDO+ son anergizadas por la ausencia de triptófano y altas cantidades de quinurenina. Se aíslan los sobrenadantes de cultivos de 72 horas de LN-18 parentales, control (secuencia desorganizada) y que sobreexpresan IDO y se usan como el medio de cultivo para ensayos de estimulación de células mononucleares de sangre periférica (PBMC). Las PBMC marcadas con CFSE (Thermo) aisladas de donantes sanos se estimulan policlonalmente con lechos de anti-CD3/CD28 (Milteny) toda la noche y se usan tres
- 10 puntos finales para medir el impacto de la concentración de quinurenina y triptófano en la función de las células T: secreción de IFN- γ y TNF- α como se mide por ELISA, proliferación de las células T como se determina por la dilución de CFSE y niveles de expresión en la superficie celular de los marcadores de activación CD69, CD25 y CD71 en el citómetro de flujo (Critchley *et al.*, PLoS Med., 4(5), 2007). Los resultados de los tres puntos finales se alinean entre sí cuando las PBMC cultivadas en los sobrenadantes de LN-18 que sobreexpresan IDO presentan una proliferación,
- 15 liberación de citoquinas y expresión de los marcadores de activación relativamente limitadas en comparación con las PBMC cultivadas en el sobrenadante de LN-18 parentales o control.

- Ejemplo 15: inactivación de la expresión génica de IDO después de la infección con un RRV-IDO1mi30ARNsh. Se infectaron células LN-18 con una MOI de 0,1 usando el vector RRV que expresa el IDOARNsh mostrado en la Figura 20. Se dejó que la infección continuara hasta que las células tumorales estuvieron infectadas al máximo y se midió la
- 20 expresión de IDO por transferencia western (Cell Signaling). Los tumores de LN-18 transducidos con el vector RRV que expresa el IDOARNsh demostraron una inactivación significativa en la expresión de IDO-1 en comparación con las líneas tumorales parentales y con ARNsh no específico cuando se trataron con IFN- γ (Figura 6 y 10).

- Ejemplo 16: la inactivación de la expresión génica de IDO en glioma humano con RRV reduce la anergia de células T mediada por IDO. De manera similar al conjunto de experimentos en el Ejemplo 14, se aislaron los sobrenadantes de
- 25 cultivos de 72 horas de líneas celulares LN-18 parentales, control (secuencia desorganizada) y que sobreexpresan IDO y con IDO inactivado y se usan como se hizo anteriormente para medir el impacto de la concentración de quinurenina y triptófano en la función de las células T. De manera similar al Ejemplo 14, las PBMC cultivadas en los sobrenadantes de LN-18 con IDO inactivado presentan una proliferación, liberación de citoquinas y expresión de los marcadores de activación aumentadas en comparación con las PBMC cultivadas en el sobrenadante de LN-18
- 30 parentales o control y especialmente las células LN-18 que sobreexpresan IDO.

- Ejemplo 17: construcción de vectores pBA9b-IFN γ . pBA9b deriva del vector pBA-5b y tiene la misma secuencia de núcleo de vector retroviral (Sheridan *et al.*, 2000). Codifica el vector retroviral no replicativo basado en MLV que contiene una región de empaquetamiento extendida. El marco de lectura abierto de IFN γ de ratón (no. de acceso BC119063) y humano (no. de acceso BC070256) que contiene el sitio de la enzima de restricción Xho I y Not I en
- 35 cada extremo para dirigir la clonación se sintetiza con optimización de codones (IDT Inc). Los fragmentos sintetizados se clonaron en el núcleo de pBA9b en los sitios correspondientes de enzimas de restricción ("MC"). En el ORF de IFN γ de ratón, se introduce posteriormente una etiqueta de His en el extremo C del ORF por PCR. El ADN plasmídico resultante se designó pBA9b-hIFN γ y pBA9b-mIFN γ . En ambas construcciones, la expresión de IFN γ está mediada por el promotor LTR viral (Véase la Figura 16).

- Ejemplo 18: las células productoras de virus producen una alta titulación viral y IFN γ funcional dependiendo de si la línea productora es de una especie heteróloga o no. Los vectores se produjeron en primer lugar por transfección transitoria en células productoras 293GP. Las células 293GP derivan de las células HEK293 que producen de manera estable gag-pol basado en MLV. Los vectores producidos por transfección transitoria se pseudotiparon con la proteína de la cubierta VSV-G y posteriormente transdujeron células productoras HA-L2 que expresan de manera estable gag-pol basado en MLV y proteína de cubierta anfotrópica 4070A. HA-L2 es una línea celular de empaquetamiento humana
- 45 construida de la misma manera que VPCL HA-LB (Sheridan *et al.*, 2000) los vectores pBA9b-hIFN γ y pBA9b-mIFN γ generados a partir de células transducidas de manera estable se titularon en células PC-3 de próstata humana usando el método de qPCR (5-MLV-U3-B: 5'-AGCCCAACCCCTCACTC-3' (SEQ ID NO: 2), 3-MLV-Psi: 5'-TCTCCCGATCCCGGACGA-3' (SEQ ID NO: 3), sonda: FAM-5'-CCCCAAATGAAAGACCCCGCTGACG-3'-BHQ1 (SEQ ID NO: 4)). El resultado mostró que los valores de titulación de pBA9b-hIFN γ y pBA9b-mIFN γ producidos por las células HA-L2 varían sustancialmente (Tabla A). La titulación de pBA9b-hIFN γ es al menos 2-log menor que pBA9b-mIFN γ . Sin embargo, cuando los vectores se producen en una línea celular de perro (DA-T1), la titulación viral de pBA-hIFN γ se incrementó y fue comparable a la de pBA9b-mIFN γ (Tabla B). DA-T1 es una línea celular de empaquetamiento de perro construida de la misma manera que VPCL DA (Sheridan *et al.* 2000). El sobrenadante viral
- 50 también se usó para medir la expresión de IFN γ por ELISA (R & D Systems). La Tabla A y B muestran que se produce una cantidad sustancial de mIFN γ por las células HAL2 y DA-T1. Las células DA-T1 transducidas con el vector pBA9b-hIFN γ también produjeron un alto nivel de IFN γ . Por el contrario, la baja titulación de pBA9b-hIFN γ producida por las
- 55

células HA-L2 se correlacionó con el bajo nivel de producción de hIFN γ . Los datos sugieren que la señalización de IFN γ humano interfiere con la producción viral y la producción de hIFN γ en células productoras humanas.

Tabla A: titulación viral y expresión de IFN γ de células transducidas HA-L2.

	Titulación (TU/mL)	IFN γ (ng/mL)
HAL2-pBA9b	3,51E+06	-
HAL2-pBA9b-hIFN γ	<2e4	0,3
HAL2-pBA9b-hIFN γ	3,19E+06	41

5 Tabla B: titulación viral y expresión de IFN γ de células transducidas DA-T1

	Titulación (TU/mL)	IFN γ (ng/mL)
DAT1-pBA9b	2,12E+06	-
DAT1-pBA9b-hIFN γ	3,03E+06	20
DAT1-pBA9b-hIFN γ	1,94E+06	96

Para verificar la bioactividad de hIFN γ recombinante y mIFN γ producido a partir de la célula productora de virus, se realizó la regulación al alza de la expresión de MHC Clase I en la superficie celular por citometría de flujo. Se incubaron los sobrenadantes de concentración conocida de IFN γ con la línea celular de carcinoma de colon de ratón concordante de especie, CT-26 o la línea celular de fibrosarcoma humana, HT1080. El grado de regulación al alza medido por la intensidad media de fluorescencia (MFI) se comparó con un estándar que es proteína recombinante purificada expresada a partir de *E. coli*. La Figura 18A muestra que el mIFN γ recombinante producido por las células productoras de virus tiene una bioactividad comparable con la del mIFN γ recombinante producido por *E. coli*. De forma similar, el hIFN γ recombinante producido por las células productoras de virus también demuestra bioactividad. El hIFN γ recombinante producido por las células productoras de virus es 3-5 veces mayor que el producido a partir de *E. coli* (Figura 2B). La diferencia se debe probablemente a las diferencias en la composición de aminoácidos, así como en el patrón de glicosilación.

Ejemplo 19: generación de una línea celular productora de virus con inactivación de IFN γ R1 humano. Las tecnologías desarrolladas recientemente para la edición genómica incluyen el uso de métodos de nucleasas de dedo de cinc (ZNF), nucleasas efectoras semejantes a activador de la transcripción (TALEN) y proteínas asociadas con repeticiones palindrómicas agrupadas interespeciadas regularmente (CRISPR-Cas) para generar cambios permanentes dirigidos en genes de interés (Gaj *et al.*, 2014, Bogdanove & Voytas, 2011; Jinek, *et al.*, 2012; Shalem, *et al.*, 2014; Wang, *et al.*, 2014). En las células eucariotas, las roturas de cadena doble introducidas por ZNF, TALEN y CRISPR-Cas son reparadas por recombinación homóloga, lo que proporciona a los investigadores opciones para una inactivación génica más definida. Usando dichos métodos, puede introducirse la edición genómica incluyendo mutaciones de delección, insercionales y de única base en una región definida específica de sitio para conseguir la inactivación génica. Entre los 3 métodos, se eligió el método CRISPR-Cas para generar un alelo genético nulo por delección.

Se diseñan dos únicas secuencias de ARN guías (GeneCopoeia) para inactivar aproximadamente 500 nts en la región del exón 3 de la subunidad de IFN γ R1 humano (no. de acceso NG_007394) localizada en el cromosoma 6. La inactivación se complementa por un ADN donante que porta un marcador de selección para la selección positiva. Un conjunto de células modificadas con IFN γ R1 que contiene una inactivación de alelo único, doble o múltiples alelos se criba adicionalmente por dilución clonal. Aproximadamente 50 clones se criban para inactivación completa por el método de PCR. Tres clones designados HAL2g1, HAL2g2 y HAL2g3 con inactivación completa de IFN γ R1 se eligen y ensayan para determinar su resistencia a IFN γ usando el bioensayo descrito anteriormente. Los datos indican ausencia de regulación al alza de MHC Clase I en la superficie celular en comparación con su nivel de expresión basal.

Ejemplo 20: las células productoras de virus con inactivación de IFN γ R1 producen una alta titulación viral y hIFN γ funcional. El vector pBA9b-hIFN γ pseudotipado con VSV-G se produce en primer lugar por transfección transitoria en las células productoras 293GP y posteriormente se transduce en las líneas celulares productoras HA-L2g1, HA-L2g2 y HA-L2g3. Los sobrenadantes recogidos de las células transducidas de manera estable se titulan entonces en células PC-3 de próstata humana usando el método de qPCR para determinar la titulación viral. Los datos muestran que los 3 clones produjeron un nivel similar de titulaciones y el valor de titulación es comparable con o mejor que el producido por las células DA-T1. El nivel de la expresión de hIFN γ medido por ELISA también indica una cantidad similar a o mayor que la producida por las células DA-T1.

Ejemplo 21: selección positiva *in vitro* de células HA-L2g transducidas con pBA9b-hIFN γ -yCD2. Pueden usarse varios genes como marcadores seleccionables positivos. Estos incluyen: dihidrofolato reductasa (DHFR, Simonsen *et al.*, Nuc Acid Res., 16: 2235-2246, 1988) con metotrexato conjuntamente con un inhibidor del transporte de nucleótidos tal como dipiridamol (Warlick *et al.* Biochemical Pharmacology, 59: 141-151, 2000) o nitrobenzylmercaptapurina ribósido

fosfato (Allay *et al.*, Stem Cells, 16 (supl 1):223-233, 1998); Citosina desaminasa usando N-(fosfonacetil)-L-aspartato (PALA) para bloquear la síntesis *de novo* de uracilo y bases anabólicamente aguas abajo y citosina para suministrar estas a través de las rutas de recuperación de pirimidina (Wahl *et al.*, J Biol Chem., 254:8679 y Unger *et al.*, Can. Gene Ther. 14:30-38); y varios otros marcadores seleccionables, obvios para los expertos en la técnica. En general, mayores niveles del agente de selección seleccionan una mejor expresión. El vector pBA9b-hIFNg-yCD2 que codifica el marcador seleccionable yCD2 da lugar a la selección de la mejor expresión de yCD2 en presencia de PALA citosina e inosina. Presumiblemente, también puede dar lugar a la coselección de clones que producen una alta titulación viral y un mayor nivel de expresión de hIFNg.

Se determina la concentración de PALA requerida para matar a las células HA-L2g transducidas con el vector pBA9b-hIFNg-yCD2. Las células se siembran a 1e3 células en placas de 96 pocillos el día anterior. A las 24 horas posteriores a la siembra de las células, se añade PALA a 1, 10, 50 y 100 μ M al cultivo durante 4 días consecutivos seguido del ensayo MTS para determinar la viabilidad celular. Los resultados muestran que las células son sensibles a PALA a 10 μ M y alcanzan la meseta a 50 μ M. También se determina un rango de concentraciones de citosina (0.2, 1, 5 10 mM) en cultivo realizando el mismo experimento descrito anteriormente. Los datos indican que las células pueden tolerar la citosina en todas las concentraciones ensayadas.

Para la selección positiva *in vitro*, se siembra un conjunto de células HA-L2g transducidas con pBA9b-hIFNg a 1e5 células en un matraz T25 en presencia de PALA 50 μ M y citosina 10 mM e inosina 4 mM. Una semana después de la selección, se realiza dilución clonal para aislar el clon de célula única para una selección adicional. Se seleccionan entonces veinticinco clones y se expanden para medir su expresión de yCD2 por inmunotransferencia y expresión de IFNg por ELISA, así como la titulación viral. Los datos muestran que varios clones expresan un alto nivel de yCD2, hIFNg y producen una mayor titulación en comparación con las células combinadas.

Ejemplo 22: construcción de los vectores pBA9b-IFNg-yCD2 y los vectores pBA9b-IL2. Los vectores pBA9b-IFNg-yCD2 se generan por subclonación del fragmento de ADN de IRES-yCD2 en el núcleo de pBA9b-hIFNg y pBA9b-mIFNg. El fragmento de ADN de IRES-yCD2 se amplifica por PCR usando el vector pAC3-yCD2 como el molde y los siguientes cebadores: Sall-IRES-F: 5'-GTACGTCGACTACTGGCCGAAGCCGCTTGGA-3' (SEQ ID NO: 17) y ClaI-yCD2-R: 5'-GTACATCGATTACTCGCCGATATCCTCGAAC-3' (SEQ ID NO:18). El fragmento de ADN amplificado por PCR se purificó en gel y se digirió con Sal I y Cla I. El fragmento digerido se subclonó entonces en el núcleo de pBA9b-hIFNg y pBA9b-mIFNg en los sitios correspondientes (Figura 19).

De forma similar, se amplifican IL-2 humana (no. de acceso BC066257) e IL-2 de ratón (no. de acceso NM_008366) en el núcleo de pAC3 usando los siguientes cebadores de PCR: el fragmento de ADN de IRES-yCD2 se amplifica por PCR usando el vector pAC3-yCD2 como el molde y los siguientes cebadores: Sall-IRES-F: 5'-GTACGTCGACTACTGGCCGAAGCCGCTTGGA-3' (SEQ ID NO: 17), ClaI-hIL-2-R: 5'-GTACATCGATTCAAGTCAGTGTTGAGATGATG-3' (SEQ ID NO: 19) y ClaI-mIL-2-R: 5'-GTACATCGATTATTGAGGGCTTGTTGAGATG-3' (SEQ ID NO:20). El fragmento de ADN amplificado por PCR se purificó en gel y se digirió con Sal I y Cla I. El fragmento digerido se subclonó entonces en el núcleo de pBA9b-hIFNg y pBA9b-mIFNg en los sitios correspondientes (Figura 19).

Ejemplo 23: las células productoras de virus producen una titulación relativamente alta, expresión de CD e IL-2 funcional. Los vectores VSV-G pseudotipados se producen en primer lugar por transfección transitoria en células productoras 293GP y posteriormente se transducen células HA-L2. Los vectores pBA9b-hIFNg-yCD2 y pBA9b-mIFNg-yCD2 generados a partir de células HA-L2 transducidas de manera estable se titulan en células PC-3 de próstata humana usando qPCR. El sobrenadante viral también se usa para medir la cantidad de expresión de IL-2 por ELISA (R & D Systems). El resultado mostró valores de titulación similares a los de pBA9b-hIFNg y pBA9b-mIFNg producidos por células HA-L2g y HA-L2, respectivamente.

Para medir la bioactividad de hIL-2 y mL-2 recombinantes producidas a partir de las células HA-L2, se realiza un ensayo de proliferación celular usando una línea de células T citotóxicas murinas derivadas de la cepa de ratón C57/B1/6, CTLL-2, que expresa de manera constitutiva receptores de IL-2. El crecimiento de las células CTLL-2 depende en gran medida de la presencia de IL-2. La bioactividad de IL-2 se determina por el nivel de incorporación de ^{3} H-timidina en el ADN de las células proliferantes. Debido a una homología >60 % entre la IL-2 de ratón y humana, la línea celular responde tanto a hIL-2 como a mL-2 de una manera dependiente de la dosis en el rango de concentración de aproximadamente 50 pg/mL a 50 ng/mL. Los datos muestran que tanto hIL-2 como mL-2 recombinante producidas por las células HA-L2 tienen una bioactividad comparable con la de hIL-2 y mL-2 recombinantes producidas por *E. coli*. Además, el nivel de la expresión de CD de células HA-L2 transducidas con pBA9b-IFNg-yCD2 también se detecta por inmunotransferencia usando un anticuerpo frente a CD.

Ejemplo 24: construcción de vectores pBA9b-IFNg-mi30ARNsh y pBA9b-IFNg-ARNsh. Muchos cánceres expresan o secretan varias moléculas inmunosupresoras, incluyendo HLA G, IDO, FasL, PDL-1 y TGF- β 1, 2 y 3, con el fin de escapar de las respuestas inmunes antitumorales (Jackson *et al.*, 2011, Avril *et al.*, 2010). Estas moléculas suprimen la proliferación de las células T, inhiben la activación de las células T y su diferenciación en células efectoras

citotóxicas, o desencadenan la apoptosis de las células T. La Figura 20A-C muestra una prueba preliminar del principio para RRV como un vehículo de administración para estos tipos de moléculas *in vitro*. Aquí, se presenta el diseño de configuraciones multimodales que contienen IFNg y ARNsh dirigidos a PDL-1, IDO y TGF- β en un vector retroviral no replicativo como una inmunoterapia de combinación.

- 5 Los vectores pBA9b-IFNg-ARNsh se generan por subclonación del fragmento de ADN en el núcleo de pBA9b-hIFNg y pBA9b-mIFNg en el sitio de la enzima de restricción Not I. Los fragmentos de ADN de U6-ARNsh se amplifican por PCR usando los vectores pAC3-ARNsh como los moldes y los siguientes cebadores universales con sitio de la enzima de restricción Not I al final (Table C).

Tabla C: cebadores universales para la amplificación de los casetes U6-ARNsh y U6-mi30ARNsh.

Nombre del cebador	Secuencia del cebador	Sitio de cebado
hU6-Not I-F	5'-GATCGCGGCCGACGCGTAAGGTCGGGCAGGAA-3' (SEQ ID NO:21)	U6
shRNA-Not I-R	5'-ATCTGCGGCCGCCTAGAAAAA-3' (SEQ ID NO:22)	en 3' del ARNsh
miR30-Not I-R	GCGGCCGCCGCATTAGTCTTCCAATTG (SEQ ID NO:23)	en 3' de miR30ARNsh

- 10 Los casetes U6-ARNsh y U6-miR30ARNsh dirigidos a IDO1, PDL-1 y TGF- β murinos se clonan en el núcleo de pBA9b-mIFNg. Asimismo, los casetes U6-ARNsh y U6-miR30ARNsh dirigidos a IDO1, PDL-1 y TGF- β humanos se clonan en el núcleo de pBA9b-hIFNg. Se generan vectores con orientación tanto directa como inversa respecto a la LTR en 5' (Figura 21).

- 15 Ejemplo 25: las células productoras de virus producen una alta titulación viral e IFNg funcional. Los vectores VSV-G pseudotipados se producen en primer lugar por transfección transitoria en células productoras 293GP y posteriormente se transducen células HA-L2 o HA-L2g. Los vectores pBA9b-mIFNg-ARNsh generados a partir de células HA-L2 o HA-L2g transducidas de manera estable se titulan en células PC-3 de próstata humana usando qPCR. El sobrenadante viral también se usa para medir la cantidad de la expresión de IFNg por ELISA (R & D Systems). El resultado muestra valores de titulación similares a los de pBA9b-hIFNg y pBA9b-mIFNg producidos por las células HA-L2g y HA-L2, respectivamente.

- 20 La bioactividad de IFNg humano se realiza como se describe. La bioactividad de ARNsh dirigido a IDO1, PDL-1 y TGF- β 2 humanos, se realiza por transducción de la línea celular de glioma humano LN-18, que expresa un alto nivel de IDO1, PDL-1 y TGF β 2, a una MOI de 10-20. Una semana después de la transducción, la actividad de inactivación de ARNsh en las células transducidas se confirma evaluando la expresión de proteína de IDO1, PDL-1 y TGF- β 2 por inmunotransferencia, citometría de flujo o ELISA.

- 25 La bioactividad de IFNg de ratón se realiza como se describe. La bioactividad de ARNsh dirigido a IDO1, PDL-1 y TGF- β 2 de ratón, se realiza por transducción de líneas celulares tumorales murinas que expresan un alto nivel de IDO1, PDL-1 y TGF- β 2, a una MOI de 10-20. Una semana después de la transducción, la actividad de inactivación de ARNsh en las células transducidas se confirma evaluando la expresión de proteína de IDO1, PDL-1 y TGF- β 2 por inmunotransferencia, citometría de flujo o ELISA.

- 30 Las Tablas D-H como se muestran en la solicitud provisional (Solicitud de Patente de EE. UU. No. 61/970.823) proporcionan secuencias de ARNi que pueden usarse para promover la estimulación inmune. Las Tablas E-H de la solicitud provisional se incorporan en la presente memoria por referencia y demuestran otras secuencias que pueden insertarse en 3' de un promotor polIII o RSV en un vector de la descripción. Un experto en la técnica puede identificar fácilmente y usar las secuencias descritas en las Tablas E-H.

Tabla D: secuencias de ARNsi dirigidas a IDO1, PDL1 y TGF β 2 de ratón.

diana	No. de acceso	Sec. antisentido (SEQ ID NO)	Porcentaje predicho de ARNm que permanece en las células después de la escisión dirigida por ARNsi
IDO-1	<u>NM_008324</u>	TATTCTATAGTCTTACTTG (24)	8
		TCAACTTCTTCTCGAAGCT (25)	24
		TGAAATGACAACTCACGG (26)	11

PDL-1	NM_021893/	TAGTTCATGCTCAGAAGTG (27)	12
		AATGCTAGACAATGAACTG (28)	18
		TATGCAGCAGTAAACGCCT (29)	18
		AGTCCGCACCACCGTAGCT (30)	43
TGF-beta2	NM_009367	TTGTGGTGAAGCCACTCCT (31)	16
		TCTCCTGCAGTAAGTCCCT (32)	36
		AACAAACAGAACACAAGCT (33)	22

Ejemplo 26: estudios de eficacia antimelanoma con vectores que expresan IFN gamma de ratón en un modelo de melanoma subcutáneo en ratones.

- 5 El objetivo de este estudio es evaluar el efecto de un vector retroviral no replicativo (RNV) que porta el gen de IFN gamma de ratón y un gen de citosina desaminasa (CD) de levadura modificado (Perez *et al.*, Mol.Ther., 2012) administrado mediante inyección intratumoral (IT) en ratones DBA/2 que presentan melanoma subcutáneo (Cloudman S91).

Se adquirieron ratones DBA/2 hembra (edad ~8 semanas) en Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME). Los ratones se aclimataron durante 7 días después de su llegada antes de iniciar los estudios.

- 10 Las células Cloudman S91 (ATCC, Manassas VA) son un melanoma que surge espontáneamente derivadas de ratones DBA/2. Las células se cultivan en medio de Eagle modificado por Dulbecco con suero fetal bovino al 10 %, piruvato de sodio, y Glutamax (Hyclone, Logan UT, e Invitrogen, San Diego CA). Las células se resuspenden en PBS (Hyclone, Logan UT) para el implante. Las células S91 (1E6 en 100 µL) se inyectan en el flanco derecho de los ratones DBA/2.

- 15 Las preparaciones de vectores se hacen por transfección transitoria del plásmido del vector con un plásmido que expresa la cubierta anfotrópica en una línea 293gag pol (Burns *et al.*, PNAS 90:8833-8037, 1993); alternatively, una línea celular productora (bien clonal o una combinación) basada en una línea celular de empaquetamiento MLV anfotrópica basada en HT1080 humano o la línea celular de empaquetamiento anfotrópica basada en D-17 de perro con titulaciones de aproximadamente 10E6TU/ml o mayores. Para los estudios iniciales, el vector no se purifica ni se concentra adicionalmente. Para los experimentos subsiguientes para determinar las curvas de respuesta a la dosis completa, se prepara un material purificado con alta titulación con una titulación esperada de alrededor de 1-5x 10E8/ml. El vector se administra IT en un volumen de 5-100 µL e IV en 100 µL en partes durante 1 a 7 días, y la dosis total/ratón entre aproximadamente 4x10E4 - 2,5x10E8 TU/ratón.

- 25 Las preparaciones de vector retroviral purificado con alta titulación se prepararon a partir de células crecidas en cámaras de cultivo celular Corning® CellSTACK® o equivalente. Las células se crecieron a 37 °C en DMEM con alto contenido en glucosa (Irvine Scientific, Irvine, CA) suplementado con suero fetal bovino al 10 % (FBS), y se dejó que se expandieran durante varios días. Los sobrenadantes se recogieron, se aclararon por filtración, se trataron con nucleasas y se purificaron y concentraron adicionalmente por columnas de intercambio iónico y cromatografía en columna de exclusión por tamaño. El vector concentrado se estabilizó y formuló en un tampón de formulación adecuado (p. ej., Tris 20 mM, NaCl 100 mM, 10 mg/mL de sacarosa, y 10 mg/mL de manitol, pH 7,4). Los tampones de formulación también pueden incluir un componente de proteína tal como suero fetal bovino o albúmina de suero humano.

- 30 Las titulaciones de las preparaciones de vector usadas en los estudios *in vivo* fueron 2-5 x 10E8 TU/ml. El vector se almacenó congelado a -80°C y se descongeló rápidamente justo antes de la inyección.

- 35 Se implantan subcutáneamente a cinco grupos de DBA/2 hembras (55 ratones, 9-10 semanas de edad) células de melanoma S91 (Día 0) y después se dosificaron (día 4-10) dependiendo de la tasa de crecimiento del tumor S91; aproximadamente 50-100mm³) con vehículo (Grupos 1), con vector control [vector pBA-9b o pBA-9b-CD], (Grupo 2), intratumoral (IT) (inyección del vector CD-IFN gamma (Grupos 3), o inyección intravenosa del vector CD-IFN gamma (grupo 4). Los grupos 3 y 4 se dividieron adicionalmente en los grupos 3a y 4a que no se trataron con 5- fluorocitosina (5-FC), y los grupos 3b y 4b que sí se trataron.
- 40

El vector se inyecta a dosis crecientes desde $10E4$ a $5 \times 10E8$, tanto cambiando la concentración del vector como incrementando el número de días de la administración. Esto se realiza para los dos grupos IT e IV. Esta estrategia permite la comparación de la eficacia relativa de diferentes estrategias terapéuticas a lo largo de un amplio rango de dosis de vector. En los grupos de 5-FC, la 5-FC se administra IP 2 x/día a 500mg/kg durante 5 días desde el inicio a los 3-10 días después de la administración del vector.

El análisis del crecimiento tumoral se realiza hasta 2.000 mm^3 o hasta 60 días sobre la base de lo que se produzca antes. Se representará el tamaño tumoral con el tiempo de 10 ratones de cada grupo. La significancia estadística se determinará usando análisis de varianza (ANOVA). Los valores $p < 0,05$ se consideran estadísticamente significativos en todos los análisis, que se realizan con el software estadístico Prism 5 (Software GraphPad) o equivalente. También se toman observaciones in vivo para evaluar cualquier evento adverso de la expresión de IFN gamma durante el tratamiento.

La administración de IFN gamma por RNV intratumoralmente muestra un retraso estadísticamente significativo del crecimiento en comparación con los controles que también depende de la dosis. La administración de IFN gamma por RNV intravenosamente muestra un retraso estadísticamente significativo del crecimiento en comparación con los controles tratados con vector control que expresa CD solo o vacío, y mitiga la carga de melanoma del modelo de melanoma de ratón DBA/2-Cloudman S91. La administración del vector IFN gamma-CD seguido de la administración de 5-FC muestra una eficacia incrementada en comparación con aquellos grupos tratados con el mismo vector y sin tratamiento con 5-FC.

Ejemplo 27: estudios de eficacia antitumoral con vectores que expresan IFN gamma de ratón en modelos de melanoma y colorrectal en ratón, con tumor subcutáneo y diseminado.

Se adquirieron ratones BALB/c y C57BL/6 hembras de seis a 8 semanas de edad en Harlan Sprague-Dawley (Indianapolis, IN), se estabularon en jaulas con microaislante autoclavado que contenían un lecho estéril, y se les proporcionó alimento irradiado y agua acidificada *ad libitum*.

CT26, una línea de carcinoma colorrectal murino de origen BALB/c (Corbett *et al.*, 1915) y B16F10, una línea celular de melanoma murino espontáneo de origen C57BL/6 se cultivan en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) más suero fetal bovino al 10 % suplementado con glutamina 2 mM, piruvato de sodio 1 mM, aminoácidos no esenciales 100 microM, y tampón HEPES 18 mM. Las células se crecen *in vitro* en condiciones de cultivo tisular estándar, y se mantienen en fase log antes de la inoculación.

Las células tumorales se mantienen en fase log de crecimiento y se recogen con tripsina-EDTA, se lavan, y se resuspenden en disolución salina basal de Hanks inmediatamente antes de la inoculación en los animales. Para la formación de tumores subcutáneos, las células B16F10 se inyectan a 1×10^8 células/ratón en 0,1 ml en la región abdominal ventral de ratones C57BL/6. Las células CT26 se inyectan a 2×10^5 células/ratón en 0,1 ml en la región abdominal ventral de ratones BALB/c. Cuando los tumores crecen hasta volúmenes de 25-40 mm^3 , los animales se redistribuyen para obtener volúmenes tumorales de partida con un promedio similar en cada grupo de tratamiento de 7-10 ratones. Un único curso de terapia consistió en 50 microL de tampón de formulación, vector control, o vector terapéutico inyectados intratumoralmente una vez al día durante 1-7 días. Los tumores se miden cada 3-4 días y el volumen se calcula según la siguiente ecuación: volumen = longitud x anchura x altura x $n/6$. La significancia estadística entre los grupos de tratamiento se determina usando análisis de varianza (ANOVA).

Para modelar la enfermedad diseminada, los animales se inoculan subcutáneamente concurrentemente con 2×10^5 células tumorales no modificadas (como se ha descrito anteriormente) e intravenosamente con 1×10^4 o 1×10^5 células por ratón, para sembrar los pulmones. El tamaño de los tumores subcutáneos se monitoriza dos veces a la semana hasta que los volúmenes tumorales en los grupos no tratados o tratados con tampón alcanzan tamaños $>1.500 \text{ mm}^3$. Los ratones se sacrifican entonces y los pulmones se pesan para determinar la carga tumoral y/o se examinan visualmente para registrar el número de focos de células tumorales. Los valores para los volúmenes tumorales y focos tumorales pulmonares se reportan como promedio + SEM a no ser que se indique otra cosa. Las diferencias entre los grupos de tratamiento se investigan usando ANOVA. La correlación entre el volumen tumoral y el peso de los pulmones se examina usando el ensayo rho de Spearman.

El vector se inyecta a dosis crecientes de $10E4$ a $5 \times 10E8$, tanto cambiando la concentración del vector como incrementando el número de días de la administración. Esto se realiza para las rutas de administración IT e IV. Esta estrategia permite la comparación de la eficacia relativa de las diferentes estrategias de vector a lo largo de un amplio rango de dosis de vector. Los grupos tratados con 5-FC se tratan con un esquema similar al del ejemplo 26.

La administración de IFN gamma por RNV intratumoralmente muestra un retraso del crecimiento estadísticamente significativo en comparación con los controles que también depende de la dosis. La administración de IFN gamma por RNV intravenosamente muestra un retraso del crecimiento estadísticamente significativo en comparación con los controles tratados con vector control que expresa CD solo o vacío, y mitiga la carga de melanoma del modelo de

melanoma de ratón B16 y CT26. La administración de vector IFN gamma-CD seguido de la administración de 5-FC muestra una eficacia incrementada en comparación con aquellos grupos tratados con el mismo vector sin tratamiento con 5-FC, en el tumor SC y también en el modelo de tumor diseminado. El tratamiento con IFN gamma-miRPDL1 mostró una eficacia incrementada en comparación con el vector IFN-gamma solo en los modelos tumorales SC y los modelos tumorales diseminados.

Estos métodos (en los ejemplos 26 y 27) pueden usarse para determinar la potencia relativa de cualquier conjunto de vector viral, con o sin el gen de IFNgamma, y los resultados se pueden extrapolar al uso humano con las secuencias homólogas de especie para IFNgamma, construcciones de ARNsi y semejantes.

Ejemplo 28: dosificación de pacientes con RRV que codifica un ARNsi o un anticuerpo de cadena única que regula a la baja una función inhibidora inmune en una célula o tejido.

Se incluyen pacientes con glioma maligno en estadio 3 o 4 recién diagnosticados y el vector se administra por administración en la cavidad de resección usando el vector en el rango de 10^6 a 10^{11} TU, dependiendo del paciente y del valor administrado en el momento de la resección. El estándar de cuidado para GBM en los EE. UU. requiere resección seguida de aproximadamente 6 semanas después con Temozolomida y radiación (Stupp *et al.*, NEJM, 352:987-996, 2005), de manera que 5-FC se administra conjuntamente con el tratamiento de TMZ y o radiación, 4-6 semanas después. Los estudios en ratones han mostrado que los vectores RRV-CD con 5-FC son al menos aditivos con Temozolomida y radiación. Los resultados en pacientes se miden por tasas de respuesta a partir de escaneos MRI, supervivencia sin progresión, supervivencia global u otro marcador aceptado, y muestran una ventaja significativa sobre el estándar de cuidado.

LISTA DE SECUENCIAS

	<110> Tocagen Inc.	
5	<120> VECTOR RETROVIRAL QUE TIENE ACTIVIDAD INMUNOESTIMULADORA	
	<130> 00014-021WO1	
	<140> Aún no asignado	
10	<141> 25-03-2015	
	<150> US 61/970,823	
	<151> 26-03-2014	
15	<160> 33	
	<170> PatentIn versión 3.5	
	<210> 1	
20	<211> 11892	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
25	<223> Vector pAC3-yCD2	
	<400> 1	
	tagttattaa tagtaatcaa ttacgggggc attagttcat agcccatata tggagttccg	60
	cgttacataa cttacggtaa atggcccgcc tggctgaccg cccaacgacc ccgcccatt	120
	gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagt aacgccaata gggactttcc attgacgtca	180
	atgggtggag tatttacggt aaactgcca cttggcagta catcaagtgt atcatatgcc	240
	aagtacgccc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt atgccagta	300
	catgacctta tgggactttc ctacttgga gtacatctac gtattagtca tcgctattac	360
	catggtgatg cggttttggc agtacatcaa tgggcgtgga tagcggtttg actcacgggg	420
	atttccaagt ctccacccca ttgacgtcaa tgggagtttg ttttggcacc aaaatcaacg	480
	ggactttcca aaatgtcgta acaactccgc ccattgacg caaatgggcg gtaggcgtgt	540
	acggtgggag gtctatataa gcagagctgg tttagtgaac cggcgccagt cctccgattg	600
	actgagtcgc ccgggtaccc gtgtatcaa taaaccctct tgcagttgca tccgacttgt	660
	ggtctcgctg ttccttggga ggtctcctc tgagtgattg actaccgctc agcgggggtc	720
	tttcatattg gggctcgcc gggatcgga gaccctgcc cagggaccac cgaccacca	780
	ccgggaggta agctggccag caacttatct gtgtctgtcc gattgtctag tgtctatgac	840
	tgattttatg cgctgcgctc ggtactagtt agctaactag ctctgtatct ggcggaacccg	900
	tgggtggaact gacgagttcg gaacaccccg ccgcaaccct gggagacgtc ccagggactt	960
	cgggggcccgt ttttgtggcc cgacctgagt ccaaaaatcc cgatcgtttt ggactctttg	1020
	gtgcaccccc cttagaggag ggatatgtgg ttctggtagg agacgagaac ctaaacagtt	1080

ES 2 779 149 T3

tcccgcctcc	gtctgaatth	ttgctttcgg	tttgggaccg	aagccgcgcc	gcgcgtcttg	1140
tctgctgcag	catcgthctg	tgttgctctct	gtctgactgt	gtttctgtat	ttgtctgaga	1200
atatggggcca	gactgttacc	actcccttaa	gtttgacctt	aggtcactgg	aaagatgtcg	1260
agcggatcgc	tcacaaccag	tcggtagatg	tcaagaagag	acgttggggt	accttctgct	1320
ctgcagaatg	gccaacctth	aacgtcggat	ggccgcgaga	cggcacctth	aaccgagacc	1380
tcatcaccca	ggttaagatc	aaggctctth	cacctggccc	gcatggacac	ccagaccagg	1440
tcccctacat	cgtgacctgg	gaagccttgg	cttttgaccc	ccctccctgg	gtcaagccct	1500
ttgtacaccc	taagcctccg	cctcctcttc	ctccatccgc	cccgctctctc	ccccttgaac	1560
ctcctcgthc	gaccccgcc	cgtacctccc	tttatccagc	cctcactcct	tctctaggcg	1620
ccaaacctaa	acctcaagth	ctttctgaca	gtggggggcc	gctcatcgac	ctacttacag	1680
aagacccccc	gccttatagg	gacccaagac	cacccctthc	cgacagggac	ggaaatggth	1740
gagaagcgac	ccctgcggga	gaggcacccg	acccctcccc	aatggcatct	cgcctacgtg	1800
ggagacggga	gccccctgtg	gccgactcca	ctacctcgca	ggcattcccc	ctccgcgcag	1860
gaggaaacgg	acagcttcaa	tactggccgt	tctcctcttc	tgacctttac	aactggaaaa	1920
ataataaccc	ttctttttct	gaagatccag	gtaaactgac	agctctgato	gagthctgttc	1980
tcatcaccca	tcagcccacc	tgggacgact	gtcagcagct	gttggggact	ctgctgaccg	2040
gagaagaaaa	acaacgggtg	ctcttagagg	ctagaaaggc	ggtgcggggc	gatgatgggc	2100
gccccactca	actgccaat	gaagtcgatg	ccgctttthc	cctcgagcgc	ccagactggg	2160
attacaccac	ccaggcaggt	aggaaccacc	tagtccacta	tcgccagthg	ctcctagcgg	2220
gtctccaaaa	cgcgggcaga	agccccacca	atttgcccaa	ggtaaaagga	ataacacaag	2280
ggcccaatga	gtctccctcg	gccttcctag	agagacttaa	ggaagcctat	cgcagggtaca	2340
ctccttatga	ccctgaggac	ccagggcaag	aaactaatgt	gtctatgtct	ttcatttggc	2400
agtctgcccc	agacattggg	agaaagttag	agagggttaga	agatttaaaa	aacaagacgc	2460
ttggagatth	ggttagagag	gcagaaaaga	tctttaataa	acgagaaaac	ccggaagaaa	2520
gagaggaacg	tatcaggaga	gaaacagagg	aaaaagaaga	acgccgtagg	acagaggatg	2580
agcagaaaga	gaaagaaaga	gatcgtagga	gacatagaga	gatgagcaag	ctattggcca	2640
ctgtcgthtag	tggacagaaa	caggatagac	agggaggaga	acgaaggagg	tcccaactcg	2700
atcgcgacca	gtgtgcctac	tgcaaagaaa	aggggcaactg	ggctaaagat	tgtcccaaga	2760
aaccacgagg	acctcgggga	ccaagacccc	agacctccct	cctgacccta	gatgactagg	2820
gaggtcaggg	tcaggagccc	ccccctgaac	ccaggataac	cctcaaagthc	ggggggcaac	2880
ccgtcacctt	cctggtagat	actggggccc	aacactccgt	gctgacccaa	aatcctggac	2940
ccctaagtga	taagtctgcc	tgggtccaag	gggctactgg	aggaaagcgg	tatcgctgga	3000

ccacggatcg caaagtacat ctagctaccg gtaaggtcac ccactctttc ctccatgtac	3060
cagactgtcc ctatcctctg ttaggaagag atttgctgac taaactaaaa gcccaaatcc	3120
actttgaggg atcaggagcc caggttatgg gaccaatggg gcagcccctg caagtgttga	3180
ccctaaatat agaagatgag catcggctac atgagacctc aaaagagcca gatgtttctc	3240
taggggccac atggctgtct gattttcttc aggcctgggc ggaaaccggg ggcattgggac	3300
tggcagttcg ccaagctcct ctgatcatac ctctgaaagc aacctctacc cccgtgtcca	3360
taaaacaata ccccatgtca caagaagcca gactggggat caagccccac atacagagac	3420
tgttggaaca gggaatactg gtaccctgcc agtccccctg gaacacgccc ctgctaccog	3480
ttaagaaacc agggactaat gattataggc ctgtccagga tctgagagaa gtcaacaagc	3540
gggtggaaga catccacccc accgtgccca acccttaca cctcttgagc gggctccccac	3600
cgtcccacca gtggtacact gtgcttgatt taaaggatgc ctttttctgc ctgagactcc	3660
accccaccag tcagcctctc ttgccttttg agtggagaga tccagagatg ggaatctcag	3720
gacaattgac ctggaccaga ctcccacagg gtttcaaaaa cagtcccacc ctgtttgatg	3780
aggcactgca cagagaccta gcagacttcc ggatccagca cccagacttg atcctgctac	3840
agtacgtgga tgacttactg ctggccgcca cttctgagct agactgcaa caaggtactc	3900
gggccctgtt acaaacccta gggaacctcg ggtatcgggc ctcgccaag aaagcccaaa	3960
tttgccagaa acaggtcaag tatctggggt atcttctaaa agagggtcag agatggctga	4020
ctgaggccag aaaagagact gtgatggggc agcctactcc gaagaccctc cgacaactaa	4080
gggagttcct agggacggca ggcttctgtc gcctctggat ccctgggttt gcagaaatgg	4140
cagccccctt gtaccctctc accaaaacgg ggactctgtt taattggggc ccagaccaac	4200
aaaaggccta tcaagaaatc aagcaagctc ttctaactgc cccagccctg gggttgccag	4260
atgtgactaa gccctttgaa ctctttgtcg acgagaagca gggctacgcc aaaggtgtcc	4320
taacgcaaaa actgggacct tggcgtcggc cgggtggccta cctgtccaaa aagctagacc	4380
cagtagcagc tgggtggccc cttgcctac ggatggtagc agccattgcc gtactgacaa	4440
aggatgcagg caagctaacc atgggacagc cactagtcat tctggcccc catgcagtag	4500
aggcactagt caaacaaccc cccgaccgct ggctttccaa cgcccgatg actcactatc	4560
aggccttgct tttggacagc gaccgggtcc agttcggacc ggtggtagcc ctgaaccgg	4620
ctacgtgct cccactgcct gaggaagggc tgcaacacaa ctgccttgat atcctggcgg	4680
aagcccacgg aacccgaccc gacctaacgg accagccgct cccagacgcc gaccacacct	4740
ggtacacgga tggaagcagt ctcttacaag agggacagcg taaggcggga gctgcggtga	4800
ccaccgagac cgaggtaatc tgggctaaag ccctgccagc cgggacatcc gctcagcggg	4860

ES 2 779 149 T3

ctgaactgat agcactcacc caggccctaa agatggcaga aggtaagaag ctaaattgtt	4920
atactgatag ccgttatgct tttgctactg cccatatcca tggagaaata tacagaaggc	4980
gtgggttgct cacatcagaa ggcaaagaga tcaaaaataa agacgagatc ttggccctac	5040
taaaagccct ctttctgccc aaaagactta gcataatcca ttgtccagga catcaaaagg	5100
gacacagcgc cgaggctaga ggcaaccgga tggctgacca agcggcccga aaggcagcca	5160
tcacagagac tccagacacc tctaccctcc tcatagaaaa ttcattcacc tacacctcag	5220
aacattttca ttacacagt actgatataa aggacctaac caagttgggg gccatttatg	5280
ataaaacaaa gaagtattgg gtctaccaag gaaaacctgt gatgcctgac cagtttactt	5340
ttgaattatt agactttctt catcagctga ctcacctcag cttctcaaaa atgaaggctc	5400
tcctagagag aagccacagt ccctactaca tgctgaaccg ggatcgaaca ctcaaaaata	5460
tcactgagac ctgcaaagct tgtgcacaag tcaacgccag caagtctgcc gttaaacagg	5520
gaactagggg ccgcgggcat cggcccgga ctcattggga gatcgatttc accgagataa	5580
agcccggtt gtatggctat aaatatcttc tagtttttat agataccttt tctggctgga	5640
tagaagcctt cccaaccaag aaagaaaccg ccaaggctgt aaccaagaag ctactagagg	5700
agatcttccc caggttcggc atgcctcagg tattgggaac tgacaatggg cctgccttcg	5760
tctccaaggt gagttagaca gtggccgatc tgttggggat tgattgaaa ttacattgtg	5820
catacagacc ccaaagctca ggccaggtag aaagaatgaa tagaaccatc aaggagactt	5880
taactaaatt aacgcttgca actggctcta gagactgggt gctcctactc cccttagccc	5940
tgtaccgagc ccgcaacacg ccggggcccc atggcctcac cccatatgag atcttatatg	6000
gggcaccccc gcccttgta aacttccctg accctgacat gacaagagtt actaacagcc	6060
cctctctcca agctcactta caggctctct acttagtcca gcacgaagtc tggagacctc	6120
tggcggcagc ctaccaagaa caactggacc gaccggtggt acctcaccct taccgagtcg	6180
gcgacacagt gtgggtccgc cgacaccaga ctaagaacct agaacctcgc tggaaaggac	6240
cttacacagt cctgctgacc acccccaccg ccctcaaagt agacggcatc gcagcttga	6300
tacacgccgc ccacgtgaag gctgccgacc ccgggggtgg accatcctct agactgacat	6360
ggcgcgttca acgctctcaa aacccctca agataagatt aaccctgga agcccttaat	6420
agtcattgga gtctgttag gtaggggat ggcagagagc ccccatcagg tctttaatgt	6480
aacctggaga gtcaccaacc tgatgactgg gcgtaccgcc aatgccacct ccctcctggg	6540
aactgtacaa gatgccttcc caaaattata ttttgatcta tgtgatctgg tcggagagga	6600
gtgggacctt tcagaccagg aaccgtatgt cgggtatggc tgcaagtacc ccgcaggag	6660
acagcggacc cggacttttg acttttacgt gtgccctggg cataccgtaa agtcgggggtg	6720
tgggggacca ggagagggct actgtggtaa atgggggtgt gaaaccaccg gacaggctta	6780

ES 2 779 149 T3

ctggaagccc acatcatcgt gggacctaata ctcccttaag cgcggttaaca ccccttgga	6840
cacgggatgc tctaaagttg cctgtggccc ctgctacgac ctctccaaag tatccaattc	6900
cttccaaggg gctactcgag ggggcagatg caaccctcta gtcctagaat tcaactgatgc	6960
aggaaaaaag gctaactggg acgggcccac atcgtgggga ctgagactgt accggacagg	7020
aacagatcct attaccatgt tctccctgac cgggcaggtc cttaatgtgg gaccccgagt	7080
ccccataggg cccaaccag tattaccga ccaaagactc ccttcctcac caatagagat	7140
tgtaccggct ccacagccac ctagccccct caataccagt taccctcctt ccactaccag	7200
tacacctca acctccccta caagtccaag tgtccacag ccaccccccag gaactggaga	7260
tagactacta gctctagtca aaggagccta tcaggcgctt aacctacca atcccgacaa	7320
gaccaagaag tggtggctgt gcttagtgtc gggacctcct tattacgaag gagtagcgg	7380
cgtgggcact tataccaatc attccaccgc tccggccaac tgtacggcca cttcccaaca	7440
taagcttacc ctatctgaag tgacaggaca gggcctatgc atgggggcag tacctaaaac	7500
tcaccaggcc ttatgtaaca ccacccaaag cgccggctca ggatcctact accttgacgc	7560
accgcgcgga acaatgtggg cttgcagcac tggattgact ccctgcttgt ccaccacgg	7620
gctcaatcta accacagatt attgtgtatt agttgaactc tggcccagag taatttacca	7680
ctccccgat tatatgtatg gtcagcttga acagcgtacc aaatataaaa gagagccagt	7740
atcattgacc ctggcccttc tactaggagg attaaccatg ggagggttg cagctggaat	7800
agggacgggg accactgcct taattaaaac ccagcagttt gagcagcttc atgccgctat	7860
ccagacagac ctcaacgaag tcgaaaagtc aattaccaac ctagaaaagt cactgacctc	7920
gttgtctgaa gtagtcctac agaaccgcag aggcctagat ttgctattcc taaaggagg	7980
aggtctctgc gcagccctaa aagaagaatg ttgtttttat gcagaccaca cggggctagt	8040
gagagacagc atggccaaat taagagaaag gcttaatcag agacaaaaac tatttgagac	8100
aggccaagga tggttcgaag ggctgtttta tagatcccc tggtttacca ccttaatctc	8160
caccatcatg ggacctctaa tagtactctt actgatctta ctctttggac cttgcattct	8220
caatcgattg gtccaatttg ttaaagacag gatctcagtg gtccaggctc tggttttgac	8280
tcagcaatat caccagctaa aaccataga gtacgagcca tgaacgcgtt actggccgaa	8340
gccgcttgga ataaggccgg tgtgcgtttg tctatatgtt attttccacc atattgccgt	8400
cttttggaac tgtgagggcc cggaacctg gccctgtctt cttgacgagc attcctagg	8460
gtctttcccc tctcgccaaa ggaatgcaag gtctgttgaa tgcgtgaag gaagcagttc	8520
ctctggaagc ttcttgaaaga caaacaacgt ctgtagcgac cttttgcagg cagcggaacc	8580
ccccacctgg cgacaggtgc ctctcgggcc aaaagccacg tgtataagat acacctgcaa	8640

ES 2 779 149 T3

aggcggcaca	acccagctgc	cacgttgtga	gttgatagtg	tgtggaaaga	gtcaaagtcg	8700
tctcctcaag	cgtattcaac	aaggggctga	aggatgcccc	gaaggtaccc	cattgtatgg	8760
gatctgatct	ggggcctcgg	tgcacatgct	ttacatgtgt	ttagtcgagg	ttaaaaaac	8820
gtctaggccc	cccgaaccac	ggggacgtgg	ttttcctttg	aaaaacacga	ttataaatgg	8880
tgaccggcgg	catggcctcc	aagtgggacg	aaaagggcat	ggatatcgct	tacgaggagg	8940
ccctgctggg	ctacaaggag	ggcggcgtgc	ctatcgccgg	ctgtctgacg	aacaacaagg	9000
acggcagtg	gctgggcagg	ggccacaaca	tgaggttcca	gaagggctcc	gccaccctgc	9060
acggcgagat	ctccaccctg	gagaactgtg	gcaggctgga	gggcaagggtg	tacaaggaca	9120
ccaccctgta	caccaccctg	tccccttgtg	acatgtgtac	cggcgctatc	atcatgtacg	9180
gcatccctag	gtgtgtgacg	ggcgagaacg	tgaacttcaa	gtccaagggc	gagaagtacc	9240
tgcaaaccag	gggccacgag	gtggtggttg	ttgacgatga	gaggtgtaag	aagctgatga	9300
agcagttcat	cgacgagagg	cctcaggact	ggttcgagga	tatcggcgag	taagcggccg	9360
cagataaaat	aaaagatttt	atttagtctc	cagaaaaagg	ggggaatgaa	agaccccacc	9420
tgtaggtttg	gcaagctagc	ttaagtaacg	ccattttgca	aggcatggaa	aaatacataa	9480
ctgagaatag	agaagttcag	atcaagggtc	ggaacagatg	gaacagctga	atatgggcca	9540
aacaggatat	ctgtggtaag	cagttcctgc	ccgggctcag	ggccaagaac	agatggaaca	9600
gctgaatatg	ggccaaacag	gatatctgtg	gtaagcagtt	cctgccccgg	ctcagggcca	9660
agaacagatg	gtccccagat	gcgggtccagc	cctcagcagt	ttctagagaa	ccatcagatg	9720
tttccagggt	gccccaaagg	cctgaaatga	ccctgtgcct	tatttgaaact	aaccaatcag	9780
ttcgtttctc	gcttctgttc	gcgcgcttct	gctccccgag	ctcaataaaa	gagcccacaa	9840
cccctcactc	ggggcgccag	tcctccgatt	gactgagtcg	ccgggtacc	cgtgtatcca	9900
ataaaccttc	ttgcagttgc	atccgacttg	tggctctcgct	gttccttggg	aggggtctcct	9960
ctgagtgatt	gactaccctg	cagcgggggg	ctttcattac	atgtgagcaa	aaggccagca	10020
aaaggccagg	aaccgtaaaa	aggccgcgtt	gctggcggtt	ttccataggc	tccgcccccc	10080
tgacgagcat	cacaaaaatc	gacgctcaag	tcagaggtgg	cgaaacccga	caggactata	10140
aagataccag	gcgtttcccc	ctggaagctc	cctcggtcgc	tctcctgttc	cgaccctgcc	10200
gcttaccgga	tacctgtccg	cctttctccc	ttcggaagc	gtggcgcttt	ctcaatgctc	10260
acgctgtagg	tatctcagtt	cgggtgtagg	cggtcgtctc	aagctgggct	gtgtgcacga	10320
acccccggt	cagcccgacc	gctgcgcctt	atccggtaac	tatcgtcttg	agtccaaccc	10380
ggtaagacac	gacttatcgc	cactggcagc	agccactggg	aacaggatta	gcagagcgag	10440
gtatgtaggc	gggtctacag	agttcttgaa	gtgggtggcct	aactacggct	acactagaag	10500
gacagtattt	gggtatctgcg	ctctgctgaa	gccagttacc	ttcggaaaaa	gagttggtag	10560

ctcttgatcc ggcaaacaaa ccaccgctgg tagcgggtgg ttttttgttt gcaagcagca 10620
gattacgcgc agaaaaaag gatctcaaga agatcctttg atcttttcta cggggtctga 10680
cgctcagtgg aacgaaaact cacgttaagg gattttggtc atgagattat caaaaaggat 10740
cttcacctag atccttttaa attaaaaatg aagttttaaa tcaatctaaa gtatatatga 10800
gtaaacttgg tctgacagtt accaatgctt aatcagtggg gcacctatct cagcgatctg 10860
tctatttcgt tcatccatag ttgctgact ccccgctgtg tagataacta cgatacggga 10920
gggcttacca tctggcccca gtgctgcaat gataccgga gacccacgct caccggctcc 10980
agatttatca gcaataaacc agccagccgg aagggccgag cgcagaagtg gtcctgcaac 11040
tttatccgcc tccatccagt ctattaattg ttgccgggaa gctagagtaa gtagtctgcc 11100
agttaatagt ttgcgcaacg ttgttgccat tgctgcaggc atcgtgggtg caccgctcgc 11160
gtttggtatg gcttcattca gctccggttc ccaacgatca aggcgagtta catgatcccc 11220
catgttggtc aaaaaagcgg ttagctcctt cggctcctcg atcgttgtca gaagtaagtt 11280
ggcgcagtg ttatcactca tggttatggc agcactgcat aattctctta ctgtcatgcc 11340
atccgtaaga tgcttttctg tgactggtga gtactcaacc aagtcattct gagaatagtg 11400
tatgcggcga ccgagttgct cttgcccgcc gtcaacacgg gataataacc cgccacatag 11460
cagaacttta aaagtgtc tcatggaaa acgttcttcg gggcgaaaac tctcaaggat 11520
cttaccgctg ttgagatcca gttcgatga acccactcgt gcacccaact gatcttcagc 11580
atcttttact ttcaccagcg tttctgggtg agcaaaaaca ggaaggcaaa atgccgcaa 11640
aaaggaata agggcgacac ggaaatgtg aatactcata ctcttccttt ttcaatatta 11700
ttgaagcatt tatcagggtt attgtctcat gagcgggatac atatttgaat gtatttagaa 11760
aaataaacia ataggggttc cgcgcacatt tccccgaaa gtgccacctg acgtctaaga 11820
aaccattatt atcatgacat taacctataa aaataggcgt atcacgaggc cctttcgtct 11880
tcaagaattc at 11892

<210> 2
<211> 19
5 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
10 <223> Cebador MLV-U3-B

<400> 2
agccacaac ccctactc 19

<210> 3
15 <211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
20 <223> Cebador MLV-Psi

<400> 3
tctccgatc ccggacga 18

<210> 4

<211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> Sonda

<400> 4
 ccccaaataa aagacccccg ctgacg 26

10 <210> 5
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> Cebador 3' Env

<400> 5
 20 ctgatcttac tctttgacc ttg 23

<210> 6
 <211> 24
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Cebador 3' UTR

30 <400> 6
 ccccttttc tggagactaa ataa 24

<210> 7
 <211> 11489
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Vector pAC3-H1-IDO1miR30ARNsh2

40 <400> 7
 tagttattaa tagtaatcaa ttacggggtc attagttcat agcccatata tggagttccg 60
 cgttacataa cttacggtaa atggcccgcc tggctgaccg cccaacgacc ccgcccatt 120
 gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagt aacgccaata gggactttcc attgacgtca 180
 atgggtggag tatttacggt aaactgcca cttggcagta catcaagtgt atcatatgcc 240
 aagtacgccc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt atgcccagta 300

ES 2 779 149 T3

catgacotta tgggactttc ctacttggca gtacatctac gtattagtca tcgctattac	360
catggtgatg cgggttttggc agtacatcaa tgggcgtgga tagcggtttg actcacgggg	420
atttccaagt ctccacccca ttgacgtcaa tgggagtttg ttttggcacc aaaatcaacg	480
ggactttcca aaatgtcgta acaactccgc cccattgacg caaatgggcg gtaggcgtgt	540
acggtgggag gtctatataa gcagagctgg tttagtgaac cggcgccagt cctccgattg	600
actgagtcgc ccgggtaccc gtgtatccaa taaaccctct tgcagttgca tccgacttgt	660
ggtctcgctg ttcccttggga gggctcctc tgagtgattg actaccgcgc agcgggggctc	720
tttcatttgg gggctcgtcc gggatcggga gaccctgcc caggggaccac cgaccacca	780
ccgggaggtg agctggccag caacttatct gtgtctgtcc gattgtctag tgtctatgac	840
tgattttatg cgctgcgtc ggtactagtt agctaactag ctctgtatct ggcggaaccg	900
tggtggaact gacgagttcg gaacaccgcg ccgcaaccct gggagacgct ccagggactt	960
cggggggcgt ttttgtggcc cgacctgagt ccaaaaatcc cgatcgtttt ggactctttg	1020
gtgcaccccc cttagaggag ggatatgtgg ttctggtagg agacgagaac ctaaaacagt	1080
tcccgcctcc gtctgaatth ttgctttcgg tttgggaccg aagccgcgcc gcgcgtcttg	1140
tctgtcgcag catcgttctg tgttgtctct gtctgactgt gtttctgtat ttgtctgaaa	1200
atatgggcca gactgttacc actcccttaa gtttgacctt aggtcactgg aaagatgtcg	1260
agcggatcgc tcacaaccag tcggtagatg tcaagaagag acgttgggtt accttctgct	1320
ctgcagaatg gccaaccttt aacgtcggat ggccgcgaga cggcaccttt aaccgagacc	1380
tcacacccca ggttaagatc aaggtctttt cacctggccc gcatggacac ccagaccagg	1440
tcccctacat cgtgacctgg gaagccttgg cttttgaccc cctccctgg gtcaagccct	1500
ttgtacaccc taagcctccg cctcctcttc ctccatccgc cccgtctctc ccccttgaac	1560
ctcctcgttc gaccccgct cgatcctccc tttatccagc cctcaactct tctctaggcg	1620
ccaaacctaa acctcaagtt ctttctgaca gtggggggcc gctcatcgac ctacttacag	1680
aagaccccc gccttatagg gacccaagac caccctctc cgacagggac ggaaatggtg	1740
gagaagcgac ccctgcggga gaggcaccg acccctcccc aatggcatct cgcctacgtg	1800
ggagacggga gccccctgtg gccgactcca ctacctgca ggcattcccc ctccgcgcag	1860
gaggaaacgg acagcttcaa tactggccgt tctcctcttc tgacctttac aactggaaaa	1920
ataataaccc ttctttttct gaagatccag gttaaactgac agctctgac gagtctgtcc	1980
tcacacccca tcagcccacc tgggacgact gtcagcagct gttggggact ctgctgaccg	2040
gagaagaaaa acaacgggtg ctcttagagg ctagaaaggc ggtgcggggc gatgatgggc	2100
gccccactca actgcccaat gaagtcgatg ccgcttttcc cctcgagcgc ccagactggg	2160

ES 2 779 149 T3

attacaccac	ccaggcaggt	aggaaccacc	tagtccacta	tcgccagttg	ctcctagcgg	2220
gtctccaaaa	cgcgggcaga	agccccacca	atttggccaa	ggtaaaagga	ataacacaag	2280
ggcccaatga	gtctccctcg	gccttcctag	agagacttaa	ggaagcctat	cgcaggtaca	2340
ctccttatga	ccctgaggac	ccagggcaag	aaactaatgt	gtctatgtct	ttcatttggc	2400
agtctgcccc	agacattggg	agaaagttag	agaggttaga	agatttaaaa	aacaagacgc	2460
ttggagattt	ggttagagag	gcagaaaaga	tctttaataa	acgagaaacc	ccggaagaaa	2520
gagaggaacg	tatcaggaga	gaaacagagg	aaaaagaaga	acgccgtagg	acagaggatg	2580
agcagaaaaga	gaaagaaaga	gatcgtagga	gacatagaga	gatgagcaag	ctattggcca	2640
ctgtcgttag	tggaacagaaa	caggatagac	agggaggaga	acgaaggagg	tcccaactcg	2700
atcgcgacca	gtgtgcctac	tgcaaaagaaa	aggggcaactg	ggctaaagat	tgtcccaaga	2760
aaccacgagg	acctcgggga	ccaagacccc	agacctccct	cctgacccta	gatgactagg	2820
gaggtcaggg	tcaggagccc	ccccctgaac	ccaggataac	cctcaaagtc	ggggggcaac	2880
ccgtcacctt	cctggtagat	actggggccc	aacactccgt	gctgacccaa	aatcctggac	2940
ccctaagtga	taagtctgcc	tgggtccaag	gggctactgg	aggaaagcgg	tatcgctgga	3000
ccacggatcg	caaagtacat	ctagctaccg	gtaaggtcac	ccactctttc	ctccatgtac	3060
cagactgtcc	ctatcctctg	ttaggaagag	atttgctgac	taaactaaaa	gccccaatcc	3120
actttgaggg	atcaggagcc	caggttatgg	gaccaatggg	gcagcccctg	caagtgttga	3180
ccctaaatat	agaagatgag	tatcggtac	atgagacctc	aaaagagcca	gatgtttctc	3240
taggtccac	atggctgtct	gattttcctc	aggcctgggc	ggaaaccggg	ggcatgggac	3300
tggcagttcg	ccaagctcct	ctgatcatac	ctctgaaagc	aacctctacc	cccgtgtcca	3360
taaaaacaata	ccccatgtca	caagaagcca	gactggggat	caagccccac	atacagagac	3420
tgttggaacca	gggaataactg	gtaccctgcc	agtccccctg	gaacacgccc	ctgctacccg	3480
ttaagaaacc	agggactaat	gattataggc	ctgtccagga	tctgagagaa	gtcaacaagc	3540
gggtggaaga	catccacccc	accgtgcccc	acccttacia	cctcttgagc	gggtctccac	3600
cgtcccacca	gtggtacact	gtgcttgatt	taaaggatgc	ctttttctgc	ctgagactcc	3660
acccaccag	tcagcctctc	ttcgcccttg	agtggagaga	tccagagatg	ggaatctcag	3720
gacaattgac	ctggaccaga	ctccacagg	gtttcaaaaa	cagtcccacc	ctgtttgatg	3780
aggcactgca	cagagacctc	gcagacttcc	ggatccagca	cccagacttg	atcctgctac	3840
agtacgtgga	tgacttactg	ctggccgcca	cttctgagct	agactgcca	caaggctactc	3900
gggccctggt	acaaacccta	gggaacctcg	ggtatcgggc	ctcgcccaag	aaagcccaaa	3960
tttgccagaa	acaggtcaag	tatctggggg	atcttctaaa	agaggggtcag	agatggctga	4020
ctgaggccag	aaaagagact	gtgatggggc	agcctactcc	gaagaccctc	cgacaactaa	4080

gggagttcct	agggacggca	ggcttctgtc	gcctctggat	ccctgggttt	gcagaaatgg	4140
cagccccctt	gtaccctctc	accaaaacgg	ggactctgtt	taattggggc	ccagaccaac	4200
aaaaggccta	tcaagaaatc	aagcaagctc	ttctaactgc	cccagccctg	gggttgccag	4260
atttgactaa	gccctttgaa	ctctttgtcg	acgagaagca	gggctacgcc	aaaggtgtcc	4320
taacgcaaaa	actgggacct	tggcgtcggc	cgggtggccta	cctgtccaaa	aagctagacc	4380
cagtagcagc	tgggtggccc	ccttgccctac	ggatggtagc	agccattgcc	gtactgacaa	4440
aggatgcagg	caagctaacc	atgggacagc	cactagtcat	tctggccccc	catgcagtag	4500
aggcactagt	caaacaaccc	cccgaaccgt	ggctttccaa	cggccggatg	actcactatc	4560
aggccttgct	tttggacacg	gaccgggtcc	agttcggacc	ggtggtagcc	ctgaacccgg	4620
ctacgtctgt	cccactgcct	gaggaagggc	tgcaacacaa	ctgccttgat	atcctggccg	4680
aagcccacgg	aacccgaccc	gacctaacgg	accagccgct	cccagacgcc	gaccacacct	4740
ggtacacgga	tggaagcagt	ctcttacaag	agggacagcg	taaggcgga	gctgcggtga	4800
ccaccgagac	cgaggtaatc	tgggctaaag	ccctgccagc	cgggacatcc	gtcagcggg	4860
ctgaactgat	agcactcacc	caggccctaa	agatggcaga	aggtaagaag	ctaaatgttt	4920
atactgatag	ccgttatgct	tttgctactg	cccatatcca	tggagaaata	tacagaaggc	4980
gtgggttgct	cacatcagaa	ggcaaagaga	tcaaaaataa	agacgagatc	ttggccctac	5040
taaaagccct	ctttctgccc	aaaagactta	gcataatcca	ttgtccagga	catcaaaagg	5100
gacacagcgc	cgaggctaga	ggcaaccgga	tggctgacca	agcggcccga	aaggcagcca	5160
tcacagagac	tccagacacc	tctaccctcc	tcatagaaaa	ttcatacccc	tacacctcag	5220
aacattttca	ttacacagtg	actgatataa	aggacctaac	caagttgggg	gccatttatg	5280
ataaaacaaa	gaagtattgg	gtctaccaag	gaaaacctgt	gatgcctgac	cagtttactt	5340
ttgaattatt	agactttctt	catcagctga	ctcacctcag	cttctcaaaa	atgaaggctc	5400
tcctagagag	aagccacagt	ccctactaca	tgctgaaccg	ggatcgaaca	ctcaaaaata	5460
tcactgagac	ctgcaaagct	tgtgcacaag	tcaacgccag	caagtctgcc	gttaaacagg	5520
gaactagggg	ccgcgggcat	cggcccgga	ctcattggga	gatcgatttc	accgagataa	5580
agcccgatt	gtatggctat	aaatatcttc	tagtttttat	agataccttt	tctggctgga	5640
tagaagcctt	cccaaccaag	aaagaaaccg	ccaaggtcgt	aaccaagaag	ctactagagg	5700
agatcttccc	caggttcggc	atgcctcagg	tattgggaac	tgacaatggg	cctgccttcg	5760
tctccaaggt	gagtcagaca	gtggccgatc	tgttggggat	tgattggaaa	ttacattgtg	5820
catacagacc	ccaaagctca	ggccaggtag	aaagaatgaa	tagaaccatc	aaggagactt	5880
taactaaatt	aacgcttgca	actggctcta	gagactgggt	gctcctactc	cccttagccc	5940

ES 2 779 149 T3

tgtaccgagc	ccgcaacacg	ccggggccccc	atggcctcac	cccatatgag	atcttatatg	6000
gggcaccccc	gccccttgta	aacttccctg	accctgacat	gacaagagtt	actaacagcc	6060
cctctctcca	agctcactta	caggctctct	acttagtcca	gcacgaagtc	tggagacctc	6120
tggcggcagc	ctaccaagaa	caactggacc	gaccggtggt	acctcaccct	taccgagtcg	6180
gcgacacagt	gtgggtccgc	cgacaccaga	ctaagaacct	agaacctcgc	tggaaaggac	6240
cttacacagt	cctgctgacc	acccccaccg	ccctcaaagt	agacggcatc	gcagcttgga	6300
tacacgccgc	ccacgtgaag	gctgccgacc	ccgggggttg	accatcctct	agactgacat	6360
ggcgcgttca	acgctctcaa	aacccctca	agataagatt	aaccctgga	agcccttaat	6420
agtcatggga	gtcctgttag	gagtagggat	ggcagagagc	ccccatcagg	tctttaatgt	6480
aacctggaga	gtcaccaacc	tgatgactgg	gcgtaccgcc	aatgccacct	ccctcctggg	6540
aactgtacaa	gatgccttcc	caaaattata	ttttgatcta	tgtgatctgg	tcggagagga	6600
gtgggacctt	tcagaccagg	aaccgtatgt	cgggtatggc	tgcaagtacc	ccgcaggagg	6660
acagcggacc	cggacttttg	acttttacgt	gtgccctggg	cataccgtaa	agtcgggggtg	6720
tgggggacca	ggagagggct	actgtggtaa	atgggggtgt	gaaaccaccg	gacaggctta	6780
ctggaagccc	acatcatcgt	gggaccta	ctcccttaag	cgcggtaaca	ccccctggga	6840
cacgggatgc	tctaaagttg	cctgtggccc	ctgctacgac	ctctccaaag	tatccaattc	6900
cttccaaggg	gctactcgag	ggggcagatg	caaccctcta	gtcctagaat	tactgatgc	6960
aggaaaaaag	gctaactggg	acgggccc	atcgtgggga	ctgagactgt	accggacagg	7020
aacagatcct	attaccatgt	tctccctgac	ccggcaggtc	cttaatgtgg	gaccccgagt	7080
cccataggg	cccaaccag	tattaccoga	ccaaagactc	ccttcctcac	caatagagat	7140
tgtaccggct	ccacagccac	ctagccccct	caataccagt	tacccccctt	ccactaccag	7200
tacaccctca	acctccccta	caagtccaag	tgtcccacag	ccacccccag	gaactggaga	7260
tagactacta	gctctagtca	aaggagccta	tcaggcgctt	aacctacca	atcccgacaa	7320
gaccaagaa	tgttggctgt	gcttagtgtc	gggacctcct	tattacgaag	gagtagcggt	7380
cgtgggcact	tataccaatc	attccaccgc	tccggccaac	tgtacggcca	cttccaaca	7440
taagcttacc	ctatctgaag	tgacaggaca	gggcctatgc	atgggggcag	tacctaaaac	7500
tcaccaggcc	ttatgtaaca	ccacccaaag	cgcggctca	ggatcctact	accttgcagc	7560
acccgcggga	acaatgtggg	cttgcagcac	tggattgact	ccctgcttgt	ccaccacggt	7620
gctcaatcta	accacagatt	attgtgtatt	agttgaactc	tggcccagag	taatttacca	7680
ctccccgat	tatatgtatg	gtcagcttga	acagcgtacc	aaatataaaa	gagagccagt	7740
atcattgacc	ctggcccttc	tactaggagg	attaaccatg	ggagggattg	cagctggaat	7800
agggacgggg	accactgcct	taattaaaac	ccagcagttt	gagcagcttc	atgccgctat	7860

ES 2 779 149 T3

ccagacagac ctcaacgaag tcgaaaagtc aattaccaac ctagaaaagt cactgacctc	7920
gttgtctgaa gtagtcctac agaaccgcag aggcctagat ttgctattcc taaaggaggg	7980
aggtctctgc gcagccctaa aagaagaatg ttgtttttat gcagaccaca cggggcctagt	8040
gagagacagc atggccaaat taagagaaag gcttaatcag agacaaaaac tatttgagac	8100
aggccaagga tggttcgaag ggctgtttta tagatcccc tggtttacca ccttaatctc	8160
caccatcatg ggacctctaa tagtactctt actgatctta ctctttggac cttgcattct	8220
caatcgattg gtccaatttg ttaaagacag gatctcagtg gtccaggctc tggttttgac	8280
tcagcaatat caccagctaa aaccataga gtacgagcca tgaacgcgtg aacgctgacg	8340
tcacaaacc gctccaagga atcgcgggcc cagtgtcact aggcgggaac acccagcgcg	8400
cgtgcgcctt ggcaggaaga tggctgtgag ggacagggga gtggcgccct gcaatatattg	8460
catgtcgcta tgtgttcttg gaaatcacca taaacgtgaa atgtcttttg atttggaat	8520
cttataagtt ctgtatgaga ccactctttc cggatcctg ctcgcttcgg cagcacatat	8580
actagtcgac tagggataac agggtaattg tttgaatgag gcttcagtac tttacagaat	8640
cgttgccctgc acatcttgga aacacttgct gggattactt cttcaggtta acccaacaga	8700
aggctcgaga aggtatattg ctgttgacag tgagcgacac gatcatgtga acccaaatag	8760
tgaagccaca gatgtatttg ggttcacatg atcgtggtgc ctactgcctc ggaattcaag	8820
gggctacttt aggagcaatt atcttgttta ctaaaactga ataccttgct atctctttga	8880
tacattttta caaagctgaa ttaaaatggt ataaattaaa tcactttttt caattggaag	8940
actaatgcgg cgggccgaga taaaataaaa gattttattt agtctccaga aaaagggggg	9000
aatgaaagac cccacctgta ggtttggcaa gctagcttaa gtaacgccat tttgcaaggc	9060
atggaaaaat acataactga gaatagagaa gttcagatca aggtcaggaa cagatggaac	9120
agctgaatat gggccaaaca ggatatctgt ggtaagcagt tcctgccccg gctcagggcc	9180
aagaacagat ggaacagctg aatatgggcc aaacaggata tctgtggtaa gcagttcctg	9240
ccccggctca gggccaagaa cagatggtcc ccagatgcgg tccagccctc agcagtttct	9300
agagaaccat cagatgtttc cagggtgccc caaggacctg aaatgaccct gtgccttatt	9360
tgaactaacc aatcagttcg cttctcgctt ctgttcgcgc gcttctgctc cccgagctca	9420
ataaaagagc ccacaacccc tctctgggg cgccagtcct ccgattgact gagtcgcccg	9480
ggtaccogtg tatccaataa accctcttgc agttgcatcc gacttgtggt ctcgctgttc	9540
cttgggaggg tctcctctga gtgattgact acccgctcagc gggggctctt cattacatgt	9600
gagcaaaagg ccagcaaaag gccaggaacc gtaaaaaggc cgcgttgctg gcgtttttcc	9660
ataggctccg cccccctgac gagcatcaca aaaatcgacg ctcaagtcag aggtggcgaa	9720

ES 2 779 149 T3

```

acccgacagg actataaaga taccaggcgt ttccccctgg aagctccctc gtgcgctctc 9780
ctgttccgac cctgccgctt accggatacc tgtccgcctt tctcccttcg ggaagcgtgg 9840
cgctttctca tagctcacgc tgtaggtatc tcagttcggg taggtcgtt cgctccaagc 9900
tgggctgtgt gcacgaaccc cccgttcagc ccgaccgctg cgccttatcc ggtaactatc 9960
gtcttgagtc caaccggta agacacgact tatcgccact ggcagcagcc actggttaaca 10020
ggattagcag agcgagggtat gtaggcgggtg ctacagagtt cttgaagtgg tggcctaact 10080
acggctacac tagaaggaca gtatttggtg tctgcgctct gctgaagcca gttaccttcg 10140
gaaaaagagt tggtagctct tgatccggca aacaaaccac cgctggtagc ggtggttttt 10200
ttgtttgcaa gcagcagatt acgcgcagaa aaaaaggatc tcaagaagat cctttgatct 10260
tttctacggg gtctgacgct cagtggaaagc aaaactcacg ttaagggtatt ttggtcatga 10320
gattatcaaa aaggatcttc acctagatcc ttttaaatta aaaatgaagt tttaaatcaa 10380
tctaaagtat atatgagtaa acttggtctg acagttacca atgcttaatc agtgaggcac 10440
ctatctcagc gatctgtcta tttcgttcac ccatagttgc ctgactcccc gtcgtgtaga 10500
taactacgat acgggagggc ttaccatctg gcccagtgcc tgcaatgata ccgcgagacc 10560
cacgctcacc ggctccagat ttatcagcaa taaaccagcc agccggaagg gccgagcgca 10620
gaagtgttcc tgcaacttta tccgcctcca tccagtctat taattgttgc cgggaagcta 10680
gagtaagtag ttcgccagtt aatagtttgc gcaacgttgt tgccattgct gcaggcatcg 10740
tggtgtcacg ctctgctgtt ggtatggctt cattcagctc cggttcccaa cgatcaaggc 10800
gagttacatg atcccccatg ttgtgcaaaa aagcggttag ctcttcggt cctccgatcg 10860
ttgtcagaag taagttggcc gcagtgttat cactcatggt tatggcagca ctgcataatt 10920
ctcttactgt catgccatcc gtaagatgct tttctgtgac tggtgagtac tcaaccaagt 10980
cattctgaga atagtgtatg cggcgaccga gttgctcttg cccggcgtca acacgggata 11040
ataccgcgcc acatagcaga actttaaaag tgctcatcat tggaaaacgt tcttcggggc 11100
gaaaactctc aaggatctta ccgctgttga gatccagttc gatgtaacct actcgtgcac 11160
ccaactgatc ttcagcatct tttactttca ccagcgtttc tgggtgagca aaaacaggaa 11220
ggcaaaatgc cgcaaaaaag ggaataaggg cgacacggaa atgttgaata ctcatactct 11280
tcctttttca atattattga agcatttatc agggttattg tctcatgagc ggatacatat 11340
ttgaatgtat ttagaaaaat aaacaaatag gggttccgcg cacatttccc cgaaaagtgc 11400
cacctgacgt ctaagaaacc attattatca tgacattaac ctataaaaat aggcgtatca 11460
cgaggccctt tcgtcttcaa gaattccat 11489

```

<210> 8

<211> 11526

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Vector pAC3-U6-IDO1miRARNsh2

<400> 8

ES 2 779 149 T3

tagttattaa tagtaatcaa ttacggggtc attagttcat agcccatata tggagttccg	60
cgttacataa cttacggtaa atggcccgcc tggctgaccg cccaacgacc cccgcccatt	120
gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagt aacgccaata gggactttcc attgacgtca	180
atgggtggag tatttacggt aaactgccc cttggcagta catcaagtgt atcatatgcc	240
aagtacgccc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt atgccagta	300
catgacctta tgggactttc ctacttggca gtacatctac gtattagtca tcgctattac	360
catggtgatg cggttttggc agtacatcaa tgggcgtgga tagcggtttg actcacgggg	420
atttccaagt ctccacccca ttgacgtcaa tgggagtttg ttttggcacc aaaatcaacg	480
ggactttcca aaatgtcgta acaactccgc cccattgacg caaatgggcg gtaggcgtgt	540
acggtgggag gtctatataa gcagagctgg tttagtgaac cggcgccagt cctccgattg	600
actgagtcgc ccgggtaccc gtgtatccaa taaaccctct tgcagttgca tccgacttgt	660
ggtctcgctg ttccttggga gggctcctc tgagtgattg actaccgctc agcgggggctc	720
tttcatttgg gggctcgctc gggatcggga gaccctgcc cagggaccac cgaccaccca	780
ccgggaggta agctggccag caacttatct gtgtctgtcc gattgtctag tgtctatgac	840
tgattttatg cgcctgcgtc ggtactagtt agctaactag ctctgtatct ggcggaccog	900
tgggtggaact gacgagttcg gaacaccgga ccgcaaccct gggagacgtc ccagggactt	960
cgggggccgt ttttgtggcc cgacctgagt ccaaaaatcc cgatcgtttt ggactctttg	1020
gtgcaccccc cttagaggag ggatatgtgg ttctggtagg agacgagaac ctaaaacagt	1080
tcccgccctc gtctgaattt ttgctttcgg tttgggaccg aagccgcgcc gcgcgtcttg	1140
tctgctgcag catcgttctg tggtgtctct gtctgactgt gtttctgtat ttgtctgaaa	1200
atatgggcca gactgttacc actcccttaa gtttgacctt aggtcactgg aaagatgtcg	1260
agcggatcgc tcacaaccag tcggtagatg tcaagaagag acgttgggtt accttctgct	1320
ctgcagaatg gccaaccttt aacgtcggat ggccgcgaga cggcaccttt aaccgagacc	1380
tcatcaccca ggtaagatc aaggtctttt cacctggccc gcatggacac ccagaccagg	1440
tcccctacat cgtgacctgg gaagccttgg cttttgaccc ccctccctgg gtcaagccct	1500
ttgtacaccc taagcctccg cctcctcttc ctccatccgc cccgtctctc ccccttgaac	1560
ctcctcgttc gaccccgctc cgatcctccc tttatccagc cctcactcct tctctaggcg	1620
ccaaaccta acctcaagtt ctttctgaca gtggggggcc gctcatcgac ctacttacag	1680

ES 2 779 149 T3

aagaccccc	gccttatagg	gacccaagac	caccccccttc	cgacagggac	ggaaatggtg	1740
gagaagcgac	ccctgcggga	gaggcaccgg	acccctcccc	aatggcatct	cgcctacgtg	1800
ggagacggga	gccccctgtg	gccgactcca	ctacctcgca	ggcattcccc	ctccgcgcag	1860
gaggaaacgg	acagcttcaa	tactggccgt	tctcctcttc	tgacctttac	aactggaaaa	1920
ataataaccc	ttctttttct	gaagatccag	gtaaactgac	agctctgato	gagtctgtcc	1980
tcatcaccca	tcagcccacc	tgggacgact	gtcagcagct	gttggggact	ctgctgaccg	2040
gagaagaaaa	acaacgggtg	ctcttagagg	ctagaaaggc	ggtgcggggc	gatgatgggc	2100
gccccactca	actgcccaat	gaagtccgat	ccgcttttcc	cctcgagcgc	ccagactggg	2160
attacaccac	ccaggcaggt	aggaaccacc	tagtccacta	tcgccagtgt	ctcctagcgg	2220
gtctccaaaa	cgcgggcaga	agccccacca	atttggccaa	ggtaaaagga	ataacacaag	2280
ggcccaatga	gtctccctcg	gccttcctag	agagacttaa	ggaagcctat	cgcaggtaca	2340
ctccttatga	ccctgaggac	ccagggcaag	aaactaatgt	gtctatgtct	ttcatttggc	2400
agtctgcccc	agacattggg	agaaagttag	agaggttaga	agatttaaaa	aacaagacgc	2460
ttggagattt	ggttagagag	gcagaaaaga	tctttaataa	acgagaaaacc	ccggaagaaa	2520
gagaggaacg	tatcaggaga	gaaacagagg	aaaaagaaga	acgccgtagg	acagaggatg	2580
agcagaaaaga	gaaagaaaga	gatcgtagga	gacatagaga	gatgagcaag	ctattggcca	2640
ctgtcgttag	tggacagaaa	caggatagac	agggaggaga	acgaaggagg	tcccaactcg	2700
atcgcgacca	gtgtgcctac	tgcaaagaaa	aggggcactg	ggctaaagat	tgtccaaga	2760
aaccacgagg	acctcgggga	ccaagacccc	agacctccct	cctgacccta	gatgactagg	2820
gaggtcaggg	tcaggagccc	ccccctgaac	ccaggataac	cctcaaagtc	ggggggcaac	2880
ccgtcacctt	cctggtagat	actggggccc	aacactccgt	gctgacccaa	aatcctggac	2940
ccctaagtga	taagtctgcc	tgggtccaag	gggctactgg	aggaaagcgg	tatcgctgga	3000
ccacggatcg	caaagtacat	ctagctaccg	gtaaggtcac	ccactctttc	ctccatgtac	3060
cagactgtcc	ctatcctctg	ttaggaagag	atttgctgac	taaactaaaa	gccccaatcc	3120
actttgaggg	atcaggagcc	caggttatgg	gaccaatggg	gcagcccctg	caagtgttga	3180
ccctaaatat	agaagatgag	tatcggtcac	atgagacctc	aaaagagcca	gatgtttctc	3240
taggggccac	atggctgtct	gattttcctc	aggcctgggc	ggaaaccggg	ggcatgggac	3300
tggcagttcg	ccaagctcct	ctgatcatac	ctctgaaagc	aacctctacc	cccggtgtcca	3360
taaaaacaata	ccccatgtca	caagaagcca	gactggggat	caagccccac	atacagagac	3420
tgttggaacca	gggaatactg	gtacctgccc	agtccccctg	gaacacgccc	ctgctacccg	3480
ttaagaaacc	agggactaat	gattataggc	ctgtccagga	tctgagagaa	gtcaacaagc	3540
gggtggaaga	catccacccc	accgtgcccc	acccttacia	cctcttgagc	gggctcccac	3600

ES 2 779 149 T3

cgccccacca gtggtacact gtgcttgatt taaaggatgc ctttttctgc ctgagactcc	3660
accccaccag tcagcctctc ttcgcctttg agtggagaga tccagagatg ggaatctcag	3720
gacaattgac ctggaccaga ctcccacagg gtttcaaaaa cagtcccacc ctgtttgatg	3780
aggcactgca cagagaccta gcagacttcc ggatccagca cccagacttg atcctgctac	3840
agtacgtgga tgacttactg ctggccgcca cttctgagct agactgcaa caaggtactc	3900
gggccctgtt acaaacctta gggaacctcg ggtatcgggc ctcgccaag aaagcccaa	3960
tttgccagaa acaggtcaag tatctgggggt atcttctaaa agagggtcag agatggctga	4020
ctgaggccag aaaagagact gtgatggggc agcctactcc gaagaccct cgacaactaa	4080
gggagttcct agggacggca ggcttctgtc gcctctggat ccctgggttt gcagaaatgg	4140
cagccccctt gtaccctctc accaaaacgg ggactctgtt taattggggc ccagaccaac	4200
aaaaggccta tcaagaaatc aagcaagctc ttctaactgc cccagccctg gggttgccag	4260
at ttgactaa gccctttgaa ctctttgtcg acgagaagca gggctacgcc aaaggtgtcc	4320
taacgcaaaa actgggacct tggcgctggc cgggtggccta cctgtccaaa aagctagacc	4380
cagtagcagc tgggtggccc ccttgccctac ggatggtagc agccattgcc gtactgacaa	4440
aggatgcagg caagctaacc atgggacagc cactagtcat tctggcccc catgcagtag	4500
aggcactagt caaacaaccc cccgaccgct ggctttccaa cgcccgatg actcactatc	4560
aggccttgct tttggacagc gaccgggtcc agttcggacc ggtggtagcc ctgaaccgg	4620
ctacgctgct cccactgcct gaggaagggc tgcaacacaa ctgccttgat atcctggccg	4680
aagcccacgg aacccgaccc gacctaacgg accagccgct cccagacgcc gaccacacct	4740
ggtacacgga tggaagcagt ctcttacaag agggacagcg taaggcggga gctgcggtga	4800
ccaccgagac cgaggtaatc tgggctaaag ccctgccagc cgggacatcc gctcagcggg	4860
ctgaactgat agcactcacc caggccctaa agatggcaga aggtaagaag ctaaagtgtt	4920
atactgatag ccgttatgct tttgctactg cccatatcca tggagaaata tacagaaggc	4980
gtgggttgct cacatcagaa ggcaaagaga tcaaaaataa agacgagatc ttggccctac	5040
taaaagccct ctttctgccc aaaagactta gcataatcca ttgtccagga catcaaaagg	5100
gacacagcgc cgaggctaga ggcaaccgga tggctgacca agcggcccg aaggcagcca	5160
tcacagagac tccagacacc tctaccctcc tcatagaaaa ttcacaccc tacacctcag	5220
aacattttca ttacacagt actgatataa aggacctaac caagttgggg gccatttatg	5280
ataaaacaaa gaagtattgg gtctaccaag gaaaacctgt gatgcctgac cagtttactt	5340
ttgaattatt agactttctt catcagctga ctcacctcag cttctcaaaa atgaaggctc	5400
tcctagagag aagccacagt ccctactaca tgctgaaccg ggatcgaaca ctcaaaaata	5460

ES 2 779 149 T3

tcactgagac	ctgcaaagct	tgtgcacaag	tcaacgccag	caagtctgcc	gttaaacagg	5520
gaactagggg	ccgcgggcat	cggcccgga	ctcattggga	gatcgatttc	accgagataa	5580
agcccggtt	gtatggctat	aaatatcttc	tagtttttat	agataccttt	tctggctgga	5640
tagaagcctt	cccaaccaag	aaagaaaccg	ccaaggctgt	aaccaagaag	ctactagagg	5700
agatcttccc	caggttcggc	atgcctcagg	tattgggaac	tgacaatggg	cctgccttcg	5760
tctccaaggt	gagtcagaca	gtggccgata	tgttggggat	tgattggaaa	ttacattgtg	5820
catacagacc	ccaaagctca	ggccaggtag	aaagaatgaa	tagaaccatc	aaggagactt	5880
taactaaatt	aacgcttgca	actggctcta	gagactgggt	gctcctactc	cccttagccc	5940
tgtaccgagc	ccgcaacacg	ccggggcccc	atggcctcac	cccatatgag	atcttatatg	6000
gggcaccccc	gccccttgta	aacttccctg	accctgacat	gacaagagtt	actaacagcc	6060
cctctctcca	agctcactta	caggctctct	acttagtcca	gcacgaagtc	tggagacctc	6120
tggcggcagc	ctaccaagaa	caactggacc	gaccgggtgt	acctcaccct	taccgagtcg	6180
gcgacacagt	gtgggtccgc	cgacaccaga	ctaagaacct	agaacctcgc	tggaaggac	6240
cttacacagt	cctgctgacc	acccccaccg	ccctcaaagt	agacggcata	gcagcttga	6300
tacacgccgc	ccacgtgaag	gctgccgacc	ccgggggtgg	accatcctct	agactgacat	6360
ggcgcggttca	acgctctcaa	aacccctca	agataagatt	aacccgtgga	agcccttaat	6420
agtcatggga	gtcctgttag	gagtagggat	ggcagagagc	ccccatcagg	tctttaatgt	6480
aacctggaga	gtcaccaacc	tgatgactgg	gcgtaccgcc	aatgccacct	ccctcctggg	6540
aactgtacaa	gatgccttcc	caaaattata	ttttgatcta	tgtgatctgg	tcggagagga	6600
gtgggacctt	tcagaccagg	aaccgtatgt	cgggtatggc	tgcaagtacc	ccgcaggagg	6660
acagcggacc	cggacttttg	acttttacct	gtgccctggg	cataccgtaa	agtcgggggtg	6720
tgggggacca	ggagagggct	actgtggtaa	atgggggtgt	gaaaccaccg	gacaggctta	6780
ctggaagccc	acatcatcgt	gggacctaat	ctcccttaag	cgcggtaaca	ccccctggga	6840
cacgggatgc	tctaaagttg	cctgtggccc	ctgctacgac	ctctccaaag	tatccaattc	6900
cttccaaggg	gctactcgag	ggggcagatg	caaccctcta	gtcctagaat	tcactgatgc	6960
aggaaaaaag	gctaactggg	acgggcccac	atcgtgggga	ctgagactgt	accggacagg	7020
aacagatcct	attaccatgt	tctccctgac	ccggcaggtc	cttaatgtgg	gaccccgagt	7080
ccccataggg	cccaaccacg	tattaccoga	ccaaagactc	ccttcctcac	caatagagat	7140
tgtaccggct	ccacagccac	ctagccccct	caataccagt	tacccccctt	ccactaccag	7200
tacaccctca	acctccccta	caagtccaag	tgtcccacag	ccacccccag	gaactggaga	7260
tagactacta	gctctagtca	aaggagccta	tcaggcgctt	aacctacca	atcccgacaa	7320
gaccaagaa	tgttggctgt	gcttagtgtc	gggacctcct	tattacgaag	gagtagcggt	7380

ES 2 779 149 T3

cgtgggcact tataccaatc attccaccgc tccggccaac tgtacggcca cttcccaaca	7440
taagcttacc ctatctgaag tgacaggaca gggcctatgc atgggggcag tacctaaaac	7500
tcaccaggcc ttatgtaaca ccacccaaag cgccggctca ggatcctact accttgacgc	7560
acccgcgga acaatgtggg cttgcagcac tggattgact ccctgcttgt ccaccacggt	7620
gctcaatcta accacagatt attgtgtatt agttgaactc tggcccagag taatttacca	7680
ctccccgat tatatgtatg gtcagcttga acagcgtacc aaatataaaa gagagccagt	7740
atcattgacc ctggcccttc tactaggagg attaaccatg ggagggattg cagctggaat	7800
agggacgggg accactgcct taattaaaac ccagcagttt gagcagcttc atgccgctat	7860
ccagacagac ctcaacgaag tcgaaaagtc aattaccaac ctagaaaagt cactgacctc	7920
gttgtctgaa gtagtcctac agaaccgcag aggcctagat ttgctattcc taaaggagg	7980
aggtctctgc gcagccctaa aagaagaatg ttgtttttat gcagaccaca cggggctagt	8040
gagagacagc atggccaaat taagagaaag gcttaatcag agacaaaaac tatttgagac	8100
aggccaagga tgggttcgaag ggctgtttta tagatcccc tggtttacca ccttaatctc	8160
caccatcatg ggacctctaa tagtactctt actgatctta ctctttggac cttgcattct	8220
caatcgattg gtccaatttg ttaaagacag gatctcagtg gtccaggctc tggttttgac	8280
tcagcaatat caccagctaa aacccataga gtacgagcca tgaacgcgta aggtcgggca	8340
ggaagagggc ctatttccca tgattccttc atatttgcac atacgataca aggctgttag	8400
agagataatt agaattaatt tgactgtaaa cacaaagata ttagtacaaa atacgtgacg	8460
tagaaagtaa taatttcttg ggtagtttgc agttttttaa attatgtttt aaaatggact	8520
atcatatgct taccgtaact tgaaagtatt tcgatttctt ggctttatat atcttgtgga	8580
aaggacgaaa caccgtgctc gcttcggcag cacatatact agtcgactag ggataacagg	8640
gtaattgttt gaatgaggct tcagtacttt acagaatcgt tgcctgcaca tcttggaac	8700
acttgctggg attacttctt caggttaacc caacagaagg ctcgagaagg tatattgctg	8760
ttgacagtga gcgacacgat catgtgaacc caaatagtga agccacagat gtatttgggt	8820
tcacatgac gtggtgccta ctgcctcgga attcaagggg ctactttagg agcaattatc	8880
ttgtttacta aaactgaata ctttctatc tctttgatac atttttacia agctgaatta	8940
aaatggtata aattaaatca cttttttcaa ttggaagact aatgcggcgg ccgcagataa	9000
aataaaagat tttatttagt ctccagaaaa aggggggaat gaaagacccc acctgtaggt	9060
ttggcaagct agcttaagta acgccatttt gcaaggcatg gaaaaatata taactgagaa	9120
tagagaagtt cagatcaagg tcaggaacag atggaacagc tgaatatggg ccaaacagga	9180
tatctgtggt aagcagttcc tgccccggct cagggccaaag aacagatgga acagctgaat	9240

ES 2 779 149 T3

atgggccaaa caggatatct gtggtaagca gttcctgccc cggtcaggg ccaagaacag	9300
atggtcccca gatgcggtcc agccctcagc agtttctaga gaaccatcag atgtttccag	9360
gggtgccccaa ggacctgaaa tgacctgtg ccttatttga actaaccaat cagttcgctt	9420
ctcgcttctg ttcgcgcgct tctgctcccc gagctcaata aaagagccca caaccctca	9480
ctcggggcgc cagtcctccg attgactgag tcgcccgggt acccgtgtat ccaataaacc	9540
ctcttgacgt tgcacccgac ttgtggtctc gctgttcctt gggagggctc cctctgagt	9600
attgactacc cgtcagcggg ggtctttcat tacatgtgag caaaaggcca gcaaaaggcc	9660
aggaaccgta aaaaggccgc gttgctggcg tttttccata ggctccgccc ccctgacgag	9720
catcacaaaa atcgacgctc aagtcagagg tggcgaaaacc cgacaggact ataaagatac	9780
caggcgtttc cccctggaag ctccctcgtg cgctctcctg ttccgaccct gccgcttacc	9840
ggatacctgt ccgcctttct cccttcggga agcgtggcgc tttctcatag ctacgctgt	9900
aggtatctca gttcggtgta ggtcgttcgc tccaagctgg gctgtgtgca cgaaccccc	9960
gttcagcccc accgctgcgc cttatccggt aactatcgtc ttgagtcaa cccgtaaga	10020
cacgacttat cgccactggc agcagccact ggtaacagga ttagcagagc gaggtatgta	10080
ggcggtgcta cagagttctt gaagtggtag cctaactacg gctacactag aaggacagta	10140
tttggatatct gcgctctgct gaagccagtt accttcggaa aaagagttgg tagctcttga	10200
tccggcaaac aaaccaccgc tggtagcggg ggtttttttg tttgcaagca gcagattacg	10260
cgcagaaaaa aaggatctca agaagatcct ttgatctttt ctacggggtc tgacgctcag	10320
tggaaacgaaa actcacgtta agggattttg gtcagtatat tatcaaaaag gatcttcacc	10380
tagatccttt taaattaaaa atgaagtttt aaatcaatct aaagtatata tgagtaaact	10440
tggctctgaca gttaccaatg cttaatcagt gaggcaccta tctcagcgat ctgtctattt	10500
cgttcaccca tagttgcctg actccccgtc gtgtagataa ctacgatacg ggagggctta	10560
ccatctggcc ccagtgtgc aatgataccg cgagaccac gctcaccggc tccagattta	10620
tcagcaataa accagccagc cggaagggcc gagcgagaa gtggtcctgc aactttatcc	10680
gcctccatcc agtctattaa ttggtgccgg gaagctagag taagtagttc gccagttaat	10740
agtttgcgca acgttggtgc cattgctgca ggcacgtgg tgtcacgctc gtcgtttggt	10800
atggcttcat tcagctccg ttcccaacga tcaaggcgag ttacatgac ccccatgttg	10860
tgcaaaaaag cggttagctc cttcgtgctc ccgatcgttg tcagaagtaa gttggccgca	10920
gtgttatcac tcatggttat ggcagcactg cataattctc ttactgtcat gccatccgta	10980
agatgctttt ctgtgactgg tgagtaactca accaagtcac tctgagaata gtgtatgcgg	11040
cgaccgagtt gctcttgccc ggcgtcaaca cgggataata ccgcgccaca tagcagaact	11100
ttaaaagtgc tcatcattgg aaaacgttct tcggggcgaa aactctcaag gatcttaccg	11160

ES 2 779 149 T3

ctgttgagat ccagttcgat gtaaccact cgtgcacca actgatcttc agcatctttt	11220
actttcacca gcgtttctgg gtgagcaaaa acaggaaggc aaaatgccgc aaaaaaggga	11280
ataagggcga cacggaaatg ttgaatactc atactcttcc tttttcaata ttattgaagc	11340
atztatcagg gttattgtct catgagcggg tacatatattg aatgtattta gaaaaataaa	11400
caaatagggg ttccgcgcac atttccccga aaagtgccac ctgacgtcta agaaaccatt	11460
attatcatga cattaaccta taaaaatagg cgtatcacga ggccctttcg tcttcaagaa	11520
ttccat	11526

<210> 9

<211> 11528

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Vector pAC3-RSV-IDO1miR30ARNsh2

<400> 9

tagttattaa tagtaatcaa ttacgggggtc attagtcat agcccatata tggagttccg	60
cgttacataa cttacggtaa atggcccgcc tggctgaccg cccaacgacc ccgcccatt	120
gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagt aacgccaata gggactttcc attgacgtca	180
atgggtggag tatttacggt aaactgccca cttggcagta catcaagtgt atcatatgcc	240
aagtagcccc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt atgccagta	300
catgacctta tgggactttc ctacttggca gtacatctac gtattagtca tcgctattac	360
catggtgatg cggttttggc agtacatcaa tgggcgtgga tagcggtttg actcacgggg	420
atttccaagt ctccacccca ttgacgtcaa tgggagtttg ttttggcacc aaaatcaacg	480
ggactttcca aaatgtcgta acaactccgc cccattgacg caaatgggcg gtaggcgtgt	540
acggtgggag gtctatataa gcagagctgg tttagtgaac cggcgccagt cctccgattg	600
actgagtcgc ccgggtaccc gtgtatccaa taaaccctct tgcagttgca tccgacttgt	660
gggtctcgctg ttccttggga gggctcctc tgagtgattg actaccgctc agcgggggtc	720
tttcatattg gggctcgtcc gggatcgga gaccctgcc cagggaccac cgaccacca	780
ccgggaggta agctggccag caacttatct gtgtctgtcc gattgtctag tgtctatgac	840
tgattttatg cgctgcgtc ggtactagtt agctaaactag ctctgtatct ggcgaccgg	900
tggtggaact gacgagttcg gaacacccgg ccgcaaccct gggagacgtc ccagggactt	960
cgggggccgt ttttgtggcc cgacctgagt ccaaaaatcc cgatcgtttt ggactctttg	1020
gtgcaccccc cttagaggag ggatatgtgg ttctggtagg agacgagaac ctaaacagtt	1080
tccgcctcc gtctgaattt ttgctttcgg tttgggaccg aagccgcgcc gcgctcttg	1140

ES 2 779 149 T3

tctgctgcag	catcgttctg	tgttgctctct	gtctgactgt	gtttctgtat	ttgtctgaaa	1200
atatggggcca	gactgttacc	actcccttaa	gtttgacctt	aggtcactgg	aaagatgtcg	1260
agcggatcgc	tcacaaccag	tcggtagatg	tcaagaagag	acgttggtt	accttctgct	1320
ctgcagaatg	gccaaacctt	aacgtcggat	ggccgcgaga	cggcacctt	aaccgagacc	1380
tcatacccca	ggttaagatc	aaggctcttt	cacctggccc	gcatggacac	ccagaccagg	1440
tcccctacat	cgtgacctgg	gaagccttgg	cttttgacct	ccctccctgg	gtcaagccct	1500
ttgtacaccc	taagcctccg	cctcctcttc	ctccatccgc	ccgtctctc	ccccttgaac	1560
ctcctcgttc	gaccccgcc	cgtacctccc	tttatccagc	cctcactcct	tctctaggcg	1620
ccaaacctaa	acctcaagtt	ctttctgaca	gtggggggcc	gctcatcgac	ctacttacag	1680
aagaccccc	gccttatagg	gacccaagac	caccccttc	cgacagggac	ggaaatggtg	1740
gagaagcgac	ccctgcggga	gaggcaccgg	acccctcccc	aatggcatct	cgcctacgtg	1800
ggagacggga	gccccctgtg	gccgactcca	ctacctcgca	ggcattcccc	ctccgcgcag	1860
gaggaaacgg	acagcttcaa	tactggccgt	tctcctcttc	tgacctttac	aactggaaaa	1920
ataataaccc	ttctttttct	gaagatccag	gtaaactgac	agctctgac	gagtctgtcc	1980
tcatacccca	tcagcccacc	tgggacgact	gtcagcagct	gttggggact	ctgctgaccg	2040
gagaagaaaa	acaacgggtg	ctcttagagg	ctagaaaggc	ggtgcggggc	gatgatgggc	2100
gccccactca	actgcccaat	gaagtcgatg	ccgcttttcc	cctcgagcgc	ccagactggg	2160
attacaccac	ccaggcaggt	aggaaccacc	tagtccacta	tcgccagttg	ctcctagcgg	2220
gtctccaaaa	cgcgggcaga	agccccacca	atttgcccaa	ggtaaaagga	ataacacaag	2280
ggcccaatga	gtctccctcg	gccttcctag	agagacttaa	ggaagcctat	cgcaggtaca	2340
ctccttatga	ccctgaggac	ccagggcaag	aaactaatgt	gtctatgtct	ttcatttggc	2400
agtctgcccc	agacattggg	agaaagttag	agaggttaga	agatttaaaa	aacaagacgc	2460
ttggagattt	ggttagagag	gcagaaaaga	tctttaataa	acgagaaaac	ccggaagaaa	2520
gagaggaacg	tatcaggaga	gaaacagagg	aaaaagaaga	acgccgtagg	acagaggatg	2580
agcagaaaaga	gaaagaaaaga	gatcgtagga	gacatagaga	gatgagcaag	ctattggcca	2640
ctgtcgttag	tggaacagaaa	caggatagac	agggaggaga	acgaaggagg	tcccaactcg	2700
atcgcgacca	gtgtgcctac	tgcaaaagaaa	aggggcactg	ggctaaagat	tgtcccaaga	2760
aaccacgagg	acctcgggga	ccaagacccc	agacctccct	cctgacccta	gatgactagg	2820
gaggtcaggg	tcaggagccc	ccccctgaac	ccaggataac	cctcaaagtc	ggggggcaac	2880
ccgtcacctt	cctggttagat	actggggccc	aacactccgt	gctgacccaa	aatcctggac	2940
ccctaagtga	taagtctgcc	tgggtccaag	gggctactgg	aggaaagcgg	tatcgtctga	3000
ccacggatcg	caaagtacat	ctagctaccg	gtaaggtcac	ccactcttcc	ctccatgtac	3060

ES 2 779 149 T3

cagactgtcc ctatcctctg ttaggaagag atttgctgac taaactaaaa gcccaaatcc	3120
actttgaggg atcaggagcc caggttatgg gaccaatggg gcagcccctg caagtgttga	3180
ccctaaatat agaagatgag tatcggctac atgagacctc aaaagagcca gatgtttctc	3240
taggggtccac atggctgtct gattttcctc aggcctgggc ggaaaccggg ggcattgggac	3300
tggcagttcg ccaagctcct ctgatcatat ctctgaaagc aacctctacc cccgtgtcca	3360
taaaacaata ccccatgtca caagaagcca gactggggat caagccccac atacagagac	3420
tgttgagcca gggaatactg gtaccctgcc agtccccctg gaacacgccc ctgctaccgg	3480
ttaagaaacc agggactaat gattataggc ctgtccagga tctgagagaa gtcaacaagc	3540
gggtggaaga catccacccc accgtgccc acccttaca cctcttgagc gggctccac	3600
cgtcccacca gtggtacact gtgcttgatt taaaggatgc ctttttctgc ctgagactcc	3660
acccaccag tcagcctctc ttgcctttg agtggagaga tccagagatg ggaatctcag	3720
gacaattgac ctggaccaga ctcccacagg gtttcaaaaa cagtcccacc ctgtttgatg	3780
aggcactgca cagagaccta gcagacttcc ggatccagca cccagacttg atcctgctac	3840
agtacgtgga tgacttactg ctggccgcca cttctgagct agactgcaa caaggtactc	3900
gggcctgtt acaaaccta gggaacctcg ggtatcgggc ctgcgccaag aaagccaaa	3960
tttgccagaa acaggtcaag tatctggggt atcttctaaa agagggtcag agatggctga	4020
ctgaggccag aaaagagact gtgatggggc agcctactcc gaagaccctc cgacaactaa	4080
gggagttcct agggacggca ggcttctgtc gcctctggat ccctgggttt gcagaaatgg	4140
cagccccctt gtaccctctc accaaaacgg ggactctgtt taattggggc ccagaccaac	4200
aaaaggccta tcaagaaatc aagcaagctc ttctaactgc cccagccctg gggttgccag	4260
atttgactaa gccctttgaa ctctttgtcg acgagaagca gggctacgcc aaaggtgtcc	4320
taacgcaaaa actgggacct tggcgtcggc cgggtggccta cctgtccaaa aagctagacc	4380
cagtagcagc tgggtggccc ccttgccctac ggatggtagc agccattgcc gtactgacaa	4440
aggatgcagg caagctaacc atgggacagc cactagtcac tctggcccc catgcagtag	4500
aggcactagt caaacaaccc cccgaccgct ggctttccaa cggccggatg actcactatc	4560
aggccttgct tttggacagc gaccgggtcc agttcggacc ggtggtagcc ctgaaccggg	4620
ctacgtgct cccactgcct gaggaagggc tgcaacacaa ctgccttgat atcctggccg	4680
aagcccacgg aacccgaccc gacctaacgg accagccgct cccagacgcc gaccacacct	4740
ggtacacgga tggaagcagt ctcttacaag agggacagcg taaggcggga gctgcggtga	4800
ccaccgagac cgaggtaatc tgggctaaag ccctgccagc cgggacatcc gctcagcggg	4860
ctgaactgat agcactcacc caggccctaa agatggcaga aggtaagaag ctaaagtgtt	4920

atactgatag	ccgttatgct	tttgctactg	cccatatcca	tggagaaata	tacagaaggc	4980
gtgggttgct	cacatcagaa	ggcaaagaga	tcaaaaataa	agacgagatc	ttggccctac	5040
taaaagccct	ctttctgccc	aaaagactta	gcataatcca	ttgtccagga	catcaaaagg	5100
gacacagcgc	cgaggctaga	ggcaaccgga	tggctgacca	agcggcccga	aaggcagcca	5160
tcacagagac	tccagacacc	tctaccctcc	tcatagaaaa	ttcatcacco	tacacctcag	5220
aacattttca	ttacacagt	actgatataa	aggacctaac	caagttgggg	gccatztatg	5280
ataaaacaaa	gaagtattgg	gtctaccaag	gaaaacctgt	gatgcctgac	cagtttactt	5340
ttgaattatt	agactttctt	catcagctga	ctcacctcag	cttctcaaaa	atgaaggctc	5400
tcctagagag	aagccacagt	ccctactaca	tgtctgaaccg	ggatcgaaca	ctcaaaaata	5460
tcactgagac	ctgcaaagct	tgtgcacaag	tcaacgccag	caagtctgcc	gttaaacagg	5520
gaactagggt	ccgcgggcat	cggcccggca	ctcattggga	gatcgatttc	accgagataa	5580
agcccggtt	gtatggctat	aaatatcttc	tagtttttat	agataccttt	tctggctgga	5640
tagaagcctt	cccaaccaag	aaagaaaccg	ccaaggtcgt	aaccaagaag	ctactagagg	5700
agatcttccc	caggttcggc	atgcctcagg	tattgggaac	tgacaatggg	cctgccttcg	5760
tctccaaggt	gagtcagaca	gtggccgatac	tgttggggat	tgattggaaa	ttacattgtg	5820
catacagacc	ccaaagctca	ggccaggtag	aaagaatgaa	tagaaccatc	aaggagactt	5880
taactaaatt	aacgcttgca	actggctcta	gagactgggt	gctcctactc	cccttagccc	5940
tgtaccgagc	ccgcaacacg	ccgggcccc	atggcctcac	cccatatgag	atcttatatg	6000
gggcaccccc	gccccttgta	aacttccctg	accctgacat	gacaagagtt	actaacagcc	6060
cctctctcca	agctcaacta	caggctctct	acttagtcca	gcacgaagtc	tggagacctc	6120
tggcggcagc	ctaccaagaa	caactggacc	gaccggtggt	acctcaccct	taccgagtcg	6180
gcgacacagt	gtgggtccgc	cgacaccaga	ctaagaacct	agaacctcgc	tggaaaggac	6240
cttacacagt	cctgctgacc	acccccaccg	ccctcaaagt	agacggcatc	gcagcttgga	6300
tacacgccgc	ccacgtgaag	gctgccgacc	ccgggggttg	accatcctct	agactgacat	6360
ggcgcgttca	acgctctcaa	aacccccctca	agataagatt	aaccctgga	agcccttaat	6420
agtcatggga	gtcctgttag	gagtagggat	ggcagagagc	ccccatcagg	tctttaatgt	6480
aacctggaga	gtcaccaacc	tgatgactgg	gcgtaccgcc	aatgccacct	ccctcctggg	6540
aactgtacaa	gatgccttcc	caaaattata	ttttgatcta	tgtgatctgg	tcggagagga	6600
gtgggaccct	tcagaccagg	aaccgtatgt	cgggtatggc	tgcaagtacc	ccgcaggagg	6660
acagcggacc	cggacttttg	acttttacgt	gtgccctggg	cataccgtaa	agtcggggtg	6720
tgggggacca	ggagagggct	actgtggtaa	atgggggtgt	gaaaccaccg	gacaggctta	6780
ctggaagccc	acatcatcgt	gggacctaat	ctcccttaag	cgcggtaaca	ccccctggga	6840

ES 2 779 149 T3

cacgggatgc tctaaagttg cctgtggccc ctgctacgac ctctccaaag tatccaattc	6900
cttccaaggg gctactcgag ggggcagatg caacctcta gtcctagaat tcaactgatgc	6960
aggaaaaaag gctaactggg acgggcccac atcgtgggga ctgagactgt accggacagg	7020
aacagatcct attaccatgt tctccctgac cgggcaggtc cttaaatgtgg gaccccaggt	7080
ccccataggg cccaaccag tattaccga ccaaagactc ccttcctcac caatagagat	7140
tgtaccggct ccacagccac ctagcccct caataccagt tacccccctt ccactaccag	7200
tacacctca acctccccta caagtccaag tgtcccacag ccaccccag gaactggaga	7260
tagactacta gctctagtca aaggagccta tcaggcgctt aacctacca atcccacaa	7320
gaccaagaa tggtggctgt gcttagtgtc gggacctcct tattacgaag gagtagcgg	7380
cgtgggcact tataccaatc attccaccgc tccggccaac tgtacggcca cttcccaaca	7440
taagcttacc ctatctgaag tgacaggaca gggcctatgc atgggggcag tacctaaaac	7500
tcaccaggcc ttatgtaaca ccacccaaag cgccggctca ggatcctact accttgacgc	7560
acccgccgga acaatgtggg cttgcagcac tggattgact ccctgcttgt ccaccacgg	7620
gctcaatcta accacagatt attgtgtatt agttgaactc tggcccagag taatttacca	7680
ctccccgat tatatgtatg gtcagcttga acagcgtacc aaatataaaa gagagccagt	7740
atcattgacc ctggcccttc tactaggagg attaaccatg ggagggattg cagctggaat	7800
agggacgggg accactgcct taattaaaac ccagcagttt gagcagcttc atgccgctat	7860
ccagacagac ctcaacgaag tcgaaaagtc aattaccaac ctagaaaagt cactgacctc	7920
gttgtctgaa gtagtcctac agaaccgcag aggcctagat ttgctattcc taaaggagg	7980
aggtctctgc gcagccctaa aagaagaatg ttgtttttat gcagaccaca cggggctagt	8040
gagagacagc atggccaaat taagagaaag gcttaatcag agacaaaaac tatttgagac	8100
aggccaagga tggttcgaag ggctgtttta tagatcccc ttggtttacca ccttaatctc	8160
caccatcatg ggacctctaa tagtactctt actgatctta ctctttggac cttgcattct	8220
caatcgattg gtccaatttg ttaaagacag gatctcagt gtccaggctc tggttttgac	8280
tcagcaatat caccagctaa aaccataga gtacgagcca tgaacgcgta atgtagtctt	8340
atgcaatact cttgtagtct tgcaacatgg taacgatgag ttagcaacat gccttacaag	8400
gagagaaaaa gcaccgtgca tgccgattgg tggaagtaag gtggtacgat cgtgccttat	8460
taggaaggca acagacgggt ctgacatgga ttggacgaac cactgaattc cgcattgcag	8520
agatattgta tttaagtgcc tagctcgata caataaacgc catttgacca ttcaccacat	8580
tgggtgtcac cgatcctgc tcgcttcggc agcacatata ctagtcgact agggataaca	8640
gggtaattgt ttgaatgagg cttcagtact ttacagaatc gttgcctgca catcttgga	8700

ES 2 779 149 T3

acacttgctg	ggattacttc	ttcaggttaa	cccaacagaa	ggctcgagaa	ggtatattgc	8760
tgttgacagt	gagcgacacg	atcatgtgaa	cccaaatagt	gaagccacag	atgtatttgg	8820
gttcacatga	tcgtggtgcc	tactgcctcg	gaattcaagg	ggctacttta	ggagcaatta	8880
tcttgtttac	taaaactgaa	taccttgcta	tctctttgat	acattttttac	aaagctgaat	8940
taaaatggta	taaattaaat	cacttttttc	aattggaaga	ctaatacggc	ggccgcagat	9000
aaaataaaag	attttatatta	gtctccagaa	aaagggggga	atgaaagacc	ccacctgtag	9060
gtttggcaag	ctagcttaag	taacgccatt	ttgcaaggca	tggaaaaata	cataactgag	9120
aatagagaag	ttcagatcaa	ggtcaggaac	agatggaaca	gctgaatatg	ggccaaacag	9180
gatatctgtg	gtaagcagtt	cctgccccgg	ctcagggccca	agaacagatg	gaacagctga	9240
atatggggcca	aacaggatat	ctgtggttaag	cagttcctgc	cccggctcag	ggccaagaac	9300
agatgggtccc	cagatgcggg	ccagccctca	gcagtttcta	gagaaccatc	agatgtttcc	9360
agggtgcccc	aaggacctga	aatgacctg	tgccttattt	gaactaacca	atcagttcgc	9420
ttctcgcttc	tgttcgcgcg	cttctgctcc	ccgagctcaa	taaaagagcc	cacaaccctt	9480
cactcggggc	gccagtcctc	cgattgactg	agtcgccccg	gtaccctgtg	atccaataaa	9540
ccctcttgca	gttgcatccg	acttggtggtc	tcgctgttcc	ttgggagggg	ctcctctgag	9600
tgattgacta	cccgtcagcg	ggggtctttc	attacatgtg	agcaaaaagg	cagcaaaaagg	9660
ccaggaaccg	taaaaaggcc	gcgttgctgg	cgtttttcca	taggctccgc	ccccctgacg	9720
agcatcacia	aaatcgacgc	tcaagtcaga	ggtggcgaaa	cccgcacagg	ctataaagat	9780
accaggcggt	ccccctgga	agctccctcg	tgcgctctcc	tgttccgacc	ctgccgctta	9840
ccggatacct	gtccgccttt	ctcccttcgg	gaagcgtggc	gctttctcat	agctcacgct	9900
gtaggatctc	cagttcggtg	taggtcgctc	gctccaagct	gggctgtgtg	cacgaacccc	9960
ccgttcagcc	cgaccgctgc	gccttatccg	gtaactatcg	tcttgagtcc	aaccgggtaa	10020
gacacgactt	atcgccactg	gcagcagcca	ctggtaacag	gattagcaga	gcgaggtatg	10080
taggcggtgc	tacagagttc	ttgaagtggg	ggcctaacta	cggctacact	agaaggacag	10140
tatttggtat	ctgcgctctg	ctgaagccag	ttaccttcgg	aaaaagagtt	ggtagctctt	10200
gatccggcaa	acaaaccacc	gctggtagcg	gtggtttttt	tgtttgcaag	cagcagatta	10260
cgcgcagaaa	aaaaggatct	caagaagatc	ctttgatctt	ttctacgggg	tctgacgctc	10320
agtggaacga	aaactcacgt	taagggattt	tggtcatgag	attatcaaaa	aggatcttca	10380
cctagatcct	tttaaatata	aaatgaagtt	ttaaatcaat	ctaaagtata	tatgagtaaa	10440
cttggtctga	cagttaccaa	tgcttaataca	gtgaggcacc	tatctcagcg	atctgtctat	10500
ttcgttcac	catagttgcc	tgactccccg	tcgtgtagat	aactacgata	cgggagggct	10560
taccatctgg	cccagtgct	gcaatgatac	cgcgagaccc	acgctcaccc	gctccagatt	10620

ES 2 779 149 T3

tatcagcaat aaaccagcca gccggaaggg ccgagcgcag aagtggtcct gcaactttat	10680
ccgcctccat ccagtctatt aattgttgcc gggaagctag agtaagtagt tcgccagtta	10740
atagtttgcg caacgttggt gccattgctg caggcatcgt ggtgtcacgc tcgtcgtttg	10800
gtatggcttc attcagctcc ggttcccaac gatcaaggcg agttacatga tccccatgt	10860
tgtgcaaaaa agcgggttagc tccttcggtc ctccgatcgt tgtcagaagt aagttggccg	10920
cagtgttatc actcatgggt atggcagcac tgcataattc tcttactgtc atgccatccg	10980
taagatgctt ttctgtgact ggtgagtact caaccaagtc attctgagaa tagtgtatgc	11040
ggcgaccgag ttgctcttgc ccggcggtcaa cacgggataa taccgcgcca catagcagaa	11100
ctttaaaagt gctcatcatt ggaaaacgtt cttcgggcg aaaactctca aggatcttac	11160
cgctgttgag atccagttcg atgtaacca ctcgtgcacc caactgatct tcagcatctt	11220
ttactttcac cagcgtttct gggtagcaaa aaacaggaag gcaaatgcc gcaaaaaagg	11280
gaataagggc gacacggaaa tgttgaatac tcatactctt cttttttcaa tattattgaa	11340
gcatttatca gggttattgt ctcatgagcg gatacatatt tgaatgtatt tagaaaaata	11400
aacaaatagg ggttccgcgc acatttcccc gaaaagtgcc acctgacgtc taagaaacca	11460
ttattatcat gacattaacc tataaaaaata ggcgtatcac gaggcccttt cgtcttcaag	11520
aattccat	11528

<210> 10
 <211> 12008
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Vector pAC3-RSV-yCD2-IDO1miR30ARNsh2

<400> 10	
tagttattaa tagtaatcaa ttacgggggc attagttcat agcccatata tggagttccg	60
cgttacataa cttacggtaa atggcccgcc tggctgaccg cccaacgacc ccgcccatt	120
gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagt aacgccaata gggactttcc attgacgtca	180
atgggtggag tatttacggt aaactgccca cttggcagta catcaagtgt atcatatgcc	240
aagtacgcc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt atgccagta	300
catgacctta tgggactttc ctacttgcca gtacatctac gtattagtca tcgctattac	360
catggtgatg cggttttggc agtacatcaa tgggcgtgga tagcggtttg actcacgggg	420
atttccaagt ctccaccca ttgacgtcaa tgggagtttg ttttggcacc aaaatcaacg	480
ggactttcca aaatgtcgta acaactccgc cccattgacg caaatgggcg gtaggcgtgt	540
acggtgggag gtctatataa gcagagctgg tttagtgaac cggcgccagt cctccgattg	600

ES 2 779 149 T3

actgagtcgc ccgggtaccc gtgtatccaa taaaccctct tgcagttgca tccgacttgt	660
ggtctcgctg ttccttggga gggctctcctc tgagtgattg actaccctgc agcgggggtc	720
tttcatttgg gggctcgtcc gggatcggga gacccctgcc cagggaccac cgaaccacca	780
ccgggaggtg agctggccag caacttatct gtgtctgtcc gattgtctag tgtctatgac	840
tgattttatg cgcctgcgtc ggtactagt agctaactag ctctgtatct ggcggaccgg	900
tggtggaact gacgagttcg gaacaccgg ccgcaaccct gggagacgtc ccagggactt	960
cggggggcgt ttttgtggcc cgacctgagt ccaaaaatcc cgatcgtttt ggaactcttg	1020
gtgcaccccc cttagaggag ggatagtggg ttctggtagg agacgagaac ctaaaacagt	1080
tcccgctcc gtctgaattt ttgcttctgg tttgggaccg aagccgcgcc gcgcgtcttg	1140
tctgctgcag catcgttctg tgttgtctct gtctgactgt gtttctgtat ttgtctgaaa	1200
atatggggcca gactgttacc actcccttaa gtttgacctt aggtcactgg aaagatgtcg	1260
agcggatcgc tcacaaccag tcggtagatg tcaagaagag acgttgggtt accttctgct	1320
ctgcagaatg gccaaccttt aacgtcggat ggccgcgaga cggcaccttt aaccgagacc	1380
tcatcaccca ggttaagatc aaggtctttt cacctggccc gcatggacac ccagaccagg	1440
tcccctacat cgtgacctgg gaagccttgg cttttgacct ccctccctgg gtcaagccct	1500
ttgtacaccc taagcctccg cctcctcttc ctccatccgc ccggtctctc ccccttgaac	1560
ctcctcgttc gaccccgct cgatcctccc tttatccagc cctcactcct tctctaggcg	1620
ccaaacctaa acctcaagtt ctttctgaca gtggggggcc gctcatcgac ctacttacag	1680
aagaccccc gccttatagg gacccaagac caccctctc cgacagggac ggaaatggtg	1740
gagaagcgac ccctgcggga gaggcaccgg acccctcccc aatggcatct cgcctacgtg	1800
ggagacggga gccccctgtg gccgactcca ctacctcgca ggcattcccc ctccgcgcag	1860
gaggaaacgg acagcttcaa tactggcgtg tctcctcttc tgacctttac aactggaaaa	1920
ataataaccc ttctttttct gaagatccag gtaaaactgac agctctgac gagtctgtcc	1980
tcatcaccca tcagcccacc tgggacgact gtcagcagct gttggggact ctgctgaccg	2040
gagaagaaaa acaacgggtg ctcttagagg ctagaaaggc ggtgcggggc gatgatgggc	2100
gccccactca actgccaat gaagtcgatg ccgcttttcc cctcgagcgc ccagactggg	2160
attacaccac ccaggcaggt aggaaccacc tagtccacta tcgccagttg ctcttagcgg	2220
gtctccaaaa cgcgggcaga agccccacca atttgccaa ggtaaaagga ataacacaag	2280
ggcccaatga gtctccctcg gccttcctag agagacttaa ggaagcctat cgcaggtaca	2340
ctccttatga ccctgaggac ccagggcaag aaactaatgt gtctatgtct ttcatttggc	2400
agtctgcccc agacattggg agaaagttag agaggtaga agatttaaaa aacaagacgc	2460
ttggagattt ggttagagag gcagaaaaga tctttaataa acgagaaacc ccggaagaaa	2520

ES 2 779 149 T3

gagaggaacg tatcaggaga gaaacagagg aaaaagaaga acgccgtagg acagaggatg	2580
agcagaaaga gaaagaaaga gatcgtagga gacatagaga gatgagcaag ctattggcca	2640
ctgtcgttag tggacagaaa caggatagac agggaggaga acgaaggagg tcccaactcg	2700
atcgcgacca gtgtgcctac tgcaaagaaa aggggactg ggctaaagat tgtcccaaga	2760
aaccacgagg acctcgggga ccaagacccc agacctccct cctgacccta gatgactagg	2820
gaggtcaggg tcaggagccc cccctgaac ccaggataac cctcaaagtc ggggggcaac	2880
ccgtcacctt cctggtagat actggggccc aacctccgt gctgacccaa aatcctggac	2940
ccctaagtga taagtctgcc tgggtccaag gggctactgg aggaaagcgg tatcgctgga	3000
ccacggatcg caaagtacat ctagctaccg gtaaggtcac ccactctttc ctccatgtac	3060
cagactgtcc ctatcctctg ttaggaagag atttgctgac taaactaaaa gcccaaatcc	3120
actttgaggg atcaggagcc caggttatgg gaccaatggg gcagcccctg caagtgttga	3180
ccctaaatat agaagatgag tatcggtac atgagacctc aaaagagcca gatgtttctc	3240
taggggccac atggctgtct gattttcttc aggcctgggc ggaaaccggg ggcatgggac	3300
tggcagttcg ccaagctcct ctgatcatac ctctgaaagc aacctctacc cccgtgtcca	3360
taaaacaata ccccatgtca caagaagcca gactggggat caagccccac atacagagac	3420
tgttggacca ggaatactg gtaccctgcc agtccccctg gaacacgccc ctgctaccg	3480
ttaagaaacc agggactaat gattataggc ctgtccagga tctgagagaa gtcaacaagc	3540
gggtggaaga catccacccc accgtgccca acccttaca cctcttgagc gggctccac	3600
cgtcccacca gtggtacact gtgcttgatt taaaggatgc ctttttctgc ctgagactcc	3660
acccaccag tcagcctctc ttgcctttg agtggagaga tccagagatg ggaatctcag	3720
gacaattgac ctggaccaga ctcccacagg gtttcaaaaa cagtcccacc ctgtttgatg	3780
aggcactgca cagagaccta gcagacttcc ggatccagca cccagacttg atcctgctac	3840
agtacgtgga tgacttactg ctggccgcca cttctgagct agactgcca caaggtactc	3900
gggccctggt acaaacccta gggaacctcg ggtatcgggc ctcggccaag aaagccaaa	3960
tttgccagaa acaggtcaag tatctgggg atcttctaaa agagggtcag agatggctga	4020
ctgaggccag aaaagagact gtgatggggc agcctactcc gaagaccctc cgacaactaa	4080
gggagttcct agggacggca ggcttctgtc gcctctggat ccctgggttt gcagaaatgg	4140
cagccccctt gtaccctctc accaaaacgg ggactctgtt taattggggc ccagaccaac	4200
aaaaggccta tcaagaaatc aagcaagctc ttctaactgc cccagccctg gggttgccag	4260
atttgactaa gccctttgaa ctctttgtcg acgagaagca gggctacgcc aaaggtgtcc	4320
taacgcaaaa actgggacct tggcgtcggc cgggtggccta cctgtccaaa aagctagacc	4380

ES 2 779 149 T3

cagtagcagc	tggttgcccc	ccttgccctac	ggatggtagc	agccattgcc	gtactgacaa	4440
aggatgcagg	caagctaacc	atgggacagc	cactagtcac	tctggccccc	catgcagtag	4500
aggcactagt	caaacaaccc	cccgaccgct	ggctttccaa	cgcccgcatg	actcactatc	4560
aggccttgct	tttgacacg	gaccgggtcc	agttcggacc	ggtggtagcc	ctgaaccggg	4620
ctacgctgct	cccactgcct	gaggaagggc	tgcaacacaa	ctgccttgat	atcctggccg	4680
aagcccacgg	aacccgaccc	gacctaacgg	accagccgct	cccagacgcc	gaccacacct	4740
ggtacacgga	tggaagcagt	ctcttacaag	agggacagcg	taaggcgagg	gctgcgggtg	4800
ccaccgagac	cgaggtaatc	tggtgctaaag	ccctgccagc	cgggacatcc	gctcagcggg	4860
ctgaactgat	agcactcacc	caggccctaa	agatggcaga	aggtaagaag	ctaaatgttt	4920
atactgatag	ccgttatgct	tttgctactg	cccataatcca	tgagaaaata	tacagaaggc	4980
gtgggttgct	cacatcagaa	ggcaaagaga	tcaaaaataa	agacgagatc	ttggccctac	5040
taaaagccct	ctttctgccc	aaaagactta	gcataatcca	ttgtccagga	catcaaaagg	5100
gacacagcgc	cgaggctaga	ggcaaccgga	tggtgacca	agcgcccgga	aaggcagcca	5160
tcacagagac	tccagacacc	tctaccctcc	tcatagaaaa	ttcatcacc	tacacctcag	5220
aacattttca	ttacacagt	actgatataa	aggacctaac	caagttgggg	gccatttatg	5280
ataaaacaaa	gaagtattgg	gtctaccaag	gaaaacctgt	gatgcctgac	cagtttactt	5340
ttgaattatt	agactttctt	catcagctga	ctcacctcag	cttctcaaaa	atgaaggctc	5400
tcctagagag	aagccacagt	ccctactaca	tgctgaaccg	ggatcgaaca	ctcaaaaata	5460
tcactgagac	ctgcaaagct	tgtgcacaag	tcaacgccag	caagtctgcc	gttaaacagg	5520
gaactagggg	ccgcgggcat	cggcccgga	ctcattggga	gatcgatttc	accgagataa	5580
agcccggtat	gtatggctat	aaatatcttc	tagtttttat	agataccttt	tctggctgga	5640
tagaagcctt	cccaaccaag	aaagaaaccg	ccaaggctcg	aaccaagaag	ctactagagg	5700
agatcttccc	caggttcggc	atgcctcagg	tattgggaac	tgacaatggg	cctgccttcg	5760
tctccaaggt	gagtcagaca	gtggccgac	tggtggggat	tgattggaaa	ttacattgtg	5820
catacagacc	ccaaagctca	ggccaggtag	aaagaatgaa	tagaaccatc	aaggagactt	5880
taactaaatt	aacgcttgca	actggctcta	gagactgggt	gctcctactc	cccttagccc	5940
tgtaccgagc	ccgcaaacg	ccgggcccc	atggcctcac	cccatatgag	atcttatatg	6000
gggcaccccc	gccccttgta	aacttccctg	accctgacat	gacaagagtt	actaacagcc	6060
cctctctcca	agctcactta	caggctctct	acttagtcca	gcacgaagtc	tgagacctc	6120
tggcggcagc	ctaccaagaa	caactggacc	gaccgggtgt	acctcaccct	taccgagtcg	6180
gcgacacagt	gtgggtccgc	cgacaccaga	ctaagaacct	agaacctcgc	tggaaggac	6240
cttacacagt	cctgctgacc	acccccaccg	ccctcaaagt	agacggcatc	gcagcttgga	6300

ES 2 779 149 T3

tacacgccgc ccacgtgaag gctgccgacc ccgggggtgg accatcctct agactgacat	6360
ggcgcggttca acgctctcaa aacccccctca agataagatt aaccggtgga agcccttaat	6420
agtcatggga gtcctgttag gagtagggat ggcagagagc ccccatcagg tctttaatgt	6480
aacctggaga gtcaccaacc tgatgactgg gcgtaccgcc aatgccacct ccctcctggg	6540
aactgtacaa gatgccttcc caaaattata ttttgatcta tgtgatctgg tcggagagga	6600
gtgggaccct tcagaccagg aaccgtatgt cgggtatggc tgcaagtacc ccgagggag	6660
acagcggacc cggacttttg acttttacgt gtgccctggg cataccgtaa agtcgggggtg	6720
tgggggacca ggagagggt actgtggtaa atgggggtgt gaaaccaccg gacaggctta	6780
ctggaagccc acatcatcgt gggacctaata ctccttaag cgcggttaaca cccctggga	6840
cacgggatgc tctaaagtgt cctgtggccc ctgctacgac ctctccaaag tatccaattc	6900
cttccaaggg gctactcgag ggggcagatg caaccctcta gtcctagaat tcaactgatgc	6960
aggaaaaaag gctaactggg acgggcccaa atcgtgggga ctgagactgt accggacagg	7020
aacagatcct attaccatgt tctccctgac ccggcaggtc cttaatgtgg gaccccgagt	7080
cccataggg cccaaccag tattaccga ccaaagactc ccttcctcac caatagagat	7140
tgtaccggct ccacagccac ctagcccct caataccagt taccctcctt ccaactaccag	7200
tacaccctca acctccccta caagtccaag tgtcccacag ccaccccag gaactggaga	7260
tagactacta gctctagtca aaggagccta tcaggcgctt aacctacca atcccgacaa	7320
gaccaagaa tggtggctgt gcttagtgtc gggacctcct tattacgaag gagtagcgg	7380
cgtgggcact tataccaatc attccaccgc tccggccaac tgtacggcca cttcccaaca	7440
taagcttacc ctatctgaag tgacaggaca gggcctatgc atgggggcag tacctaaaac	7500
tcaccaggcc ttatgtaaca ccacccaaag cgccggtcga ggatcctact accttgacgc	7560
acccgccgga acaatgtggg cttgcagcac tggattgact ccctgcttgt ccaccacggt	7620
gctcaatcta accacagatt attgtgtatt agttgaactc tggcccagag taatttacca	7680
ctccccgat tatatgtatg gtcagcttga acagcgtacc aaatataaaa gagagccagt	7740
atcattgacc ctggcccttc tactaggagg attaaccatg ggagggattg cagctggaat	7800
agggacgggg accactgcct taattaaaac ccagcagttt gagcagcttc atgccgctat	7860
ccagacagac ctcaacgaag tcgaaaagtc aattaccaac ctagaaaagt cactgacctc	7920
gttgtctgaa gtagtcctac agaaccgcag aggcctagat ttgctattcc taaaggaggg	7980
aggtctctgc gcagccctaa aagaagaatg ttgtttttat gcagaccaca cggggctagt	8040
gagagacagc atggccaaat taagagaaag gcttaatcag agacaaaaac tatttgagac	8100
aggccaagga tggttcgaag ggctgtttaa tagatcccc tggtttacca ccttaatctc	8160

ES 2 779 149 T3

caccatcatg	ggacctctaa	tagtactctt	actgatctta	ctctttggac	cttgcatctt	8220
caatcgattg	gtccaatttg	ttaaagacag	gatctcagtg	gtccaggctc	tggttttgac	8280
tcagcaatat	caccagctaa	aacccataga	gtacgagcca	tgaacgcgta	atgtagtctt	8340
atgcaatact	cttgtagtct	tgcaacatgg	taacgatgag	ttagcaacat	gccttacaag	8400
gagagaaaaa	gcaccgtgca	tgccgattgg	tggaagtaag	gtggtacgat	cgtgccttat	8460
taggaaggca	acagacgggt	ctgacatgga	ttggacgaac	cactgaattc	cgcatcgag	8520
agatatgtga	tttaagtgcc	tagctcgata	caataaacgc	catttgacca	ttcaccacat	8580
tggtgtgcac	catggtgacc	ggcggcatgg	cctccaagtg	ggatcaaaag	ggcatggata	8640
tcgcttacga	ggagggcctg	ctgggctaca	aggaggcggg	cgtgcctatc	ggcggctgtc	8700
tgatcaacaa	caaggacggc	agtgtgctgg	gcaggggcca	caacatgagg	ttccagaagg	8760
gctccgccac	cctgcacggc	gagatctcca	ccctggagaa	ctgtggcagg	ctggaggggca	8820
aggtgtacaa	ggacaccacc	ctgtacacca	ccctgtcccc	ttgtgacatg	tgtaccggcg	8880
ctatcatcat	gtacggcatc	cctaggtgtg	tgatcggcga	gaacgtgaac	ttcaagtcca	8940
agggcgagaa	gtacctgcaa	accaggggcc	acgaggtggt	ggttggtgac	gatgagaggt	9000
gtaagaagct	gatgaagcag	ttcatcgacg	agaggcctca	ggactggttc	gaggatatcg	9060
gcgagtaatg	aggatcctgc	tcgcttcggc	agcacatata	ctagtcgact	agggataaca	9120
gggtaattgt	ttgaatgagg	cttcagtact	ttacagaatc	gttgccctgca	catcttgga	9180
acacttgctg	ggattacttc	ttcaggttaa	cccaacagaa	ggctcgagaa	ggtatattgc	9240
tgttgacagt	gagcgacacg	atcatgtgaa	cccaaatagt	gaagccacag	atgtatttgg	9300
gttcacatga	tcgtggtgcc	tactgcctcg	gaattcaagg	ggctacttta	ggagcaatta	9360
tcttgtttac	taaaactgaa	taccttgcta	tctctttgat	acattttttac	aaagctgaat	9420
taaaatggta	taaattaaat	cacttttttc	aattggaaga	ctaatacggc	ggccgcagat	9480
aaaataaaaag	attttattta	gtctccagaa	aaagggggga	atgaaagacc	ccacctgtag	9540
gtttggcaag	ctagcttaag	taacgccatt	ttgcaaggca	tgaaaaata	cataactgag	9600
aatagagaag	ttcagatcaa	ggtcagggaac	agatggaaca	gctgaatatg	ggccaaacag	9660
gatatctgtg	gtaagcagtt	cctgccccgg	ctcagggcca	agaacagatg	gaacagctga	9720
atatgggcca	aacaggatat	ctgtggtgaa	cagttcctgc	cccggctcag	ggccaagaac	9780
agatggtccc	cagatgcggg	ccagccctca	gcagtttcta	gagaaccatc	agatgtttcc	9840
agggtgcccc	aaggacctga	aatgacctg	tgcccttatt	gaactaacca	atcagttcgc	9900
ttctcgcttc	tggtcgcgcg	cttctgctcc	ccgagctcaa	taaaagagcc	cacaaccct	9960
cactcggggc	gccagtcctc	cgattgactg	agtcgcccgg	gtaccctgtg	atccaataaa	10020
ccctcttgca	gttgcatccg	acttggtggtc	tcgctgttcc	ttgggagggt	ctcctctgag	10080

ES 2 779 149 T3

tgattgacta cccgtcagcg ggggtctttc attacatgtg agcaaaaggc cagcaaaagg	10140
ccaggaaccg taaaaaggcc gcgttgctgg cgtttttcca taggctccgc cccctgacg	10200
agcatcacia aaatcgacgc tcaagtcaga ggtggcgaaa cccgacagga ctataaagat	10260
accaggcgtt tccccctgga agctccctcg tgcgctctcc tgttccgacc ctgccgctta	10320
ccggatacct gtccgccttt ctcccttcgg gaagcgtggc gctttctcat agctcacgct	10380
gtaggtatct cagttcgtg taggtcgttc gctccaagct gggctgtgtg cacgaacccc	10440
ccgttcagcc cgaccgctgc gccttatccg gtaactatcg tcttgagtcc aaccggtaa	10500
gacacgactt atcgccactg gcagcagcca ctggtaacag gattagcaga gcgaggtatg	10560
taggcggtgc tacagagttc ttgaagtggg ggcctaacta cggctacact agaaggacag	10620
tatttggtat ctgcgctctg ctgaagccag ttaccttcgg aaaaagagtt ggtagctctt	10680
gatccggcaa acaaaccacc gctggtagcg gtggtttttt tgtttgcaag cagcagatta	10740
cgcgagaaa aaaaggatct caagaagatc ctttgatctt ttctacgggg tctgacgctc	10800
agtggaacga aaactcacgt taagggattt tggctcatgag attatcaaaa aggatcttca	10860
cctagatcct tttaaattaa aaatgaagtt ttaaataaat cttaaagtata tatgagtaaa	10920
cttggtctga cagttaccaa tgcttaataca gtgaggcacc tatctcagcg atctgtctat	10980
ttcgttcac ccatagttgcc tgactccccg tcgtgtagat aactacgata cgggagggct	11040
taccatctgg cccagtgct gcaatgatac cgcgagacc acgctcacc gctccagatt	11100
tatcagcaat aaaccagcca gccggaaggg ccgagcgag aagtggctcct gcaactttat	11160
ccgcctccat ccagttctatt aattgttgcc ggggaagctag agtaagtagt tcgccagtta	11220
atagtttgcg caacgttggt gccattgctg caggcatcgt ggtgtcacgc tcgtcgtttg	11280
gtatggcttc attcagctcc ggttcccaac gatcaaggcg agttacatga tccccatgt	11340
tgtgcaaaaa agcgggttagc tccttcggtc ctccgatcgt tgtcagaagt aagttggccg	11400
cagtggtatc actcatggtt atggcagcac tgcataatc tcttactgtc atgccatccg	11460
taagatgctt ttctgtgact ggtgagtact caaccaagtc attctgagaa tagtgtatgc	11520
ggcgaccgag ttgctcttgc ccggcgtcaa cacgggataa taccgcgcca catagcagaa	11580
ctttaaaagt gctcatcatt ggaaaacggt cttcggggcg aaaactctca aggatcttac	11640
cgctgttgag atccagttcg atgtaacca ctcgtgcacc caactgatct tcagcatctt	11700
ttactttcac cagcgtttct gggtagcaaa aaacaggaag gcaaaatgcc gcaaaaaagg	11760
gaataagggc gacacggaaa tgttgaatac tcatactctt cttttttcaa tattattgaa	11820
gcatttatca gggttattgt ctcatgagcg gatacatatt tgaatgtatt tagaaaaata	11880
aacaaatagg ggttccgcgc acatttcccc gaaaagtgcc acctgacgtc taagaaacca	11940
ttattatcat gacattaacc tataaaaaata ggcgtatcac gaggcccttt cgtcttcaag	12000
aattccat	12008

- 5 <210> 11
 <211> 12273
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>

<223> Vector pAC3-RSV-yCD2-U6-IDO1miR30ARNsh2

<400> 11

tagttattaa tagtaatcaa ttacggggtc attagttcat agcccatata tggagttccg	60
cgttacataa cttacggtaa atggcccgcc tggctgaccg cccaacgacc cccgcccatt	120
gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagt aacgccaata gggactttcc attgacgtca	180
atgggtggag tattttacggt aaactgccc cttggcagta catcaagtgt atcatatgcc	240
aagtacgccc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt atgccagta	300
catgacctta tgggactttc ctacttgga gtacatctac gtattagtca tcgctattac	360
catggtgatg cggttttggc agtacatcaa tgggcgtgga tagcggtttg actcacggg	420
atttccaagt ctccacccca ttgacgtcaa tgggagtttg ttttggcacc aaaatcaacg	480
ggactttcca aaatgtcgta acaactccgc ccattgacg caaatgggcg gtaggcgtgt	540
acggtgggag gtctatataa gcagagctgg tttagtgaac cggcgccagt cctccgattg	600
actgagtcgc ccgggtaccc gtgtatccaa taaaccctct tgcagttgca tccgacttgt	660
ggtctcgctg ttccttggga ggtctcctc tgagtgttg actaccgctc agcgggggctc	720
tttcatttgg gggctcgctc gggatcgga gaccctgcc cagggaccac cgaccacca	780
ccgggaggtg agctggccag caacttatct gtgtctgtcc gattgtctag tgtctatgac	840
tgattttatg cgctgcgctc ggtactagtt agctaactag ctctgtatct ggcggacccg	900
tgggtggaact gacgagttcg gaacaccgga ccgcaaccct gggagacgtc ccagggactt	960
cggggggcgt ttttgtggcc cgacctgagt ccaaaaatcc cgatcgtttt ggactctttg	1020
gtgcaccccc cttagaggag ggatatgtgg ttctggtagg agacgagaac ctaaaacagt	1080
tcccgcctcc gtctgaattt ttgctttcgg tttgggaccg aagccgcgcc gcgcgtcttg	1140
tctgctgcag catcgttctg tggtgtctct gtctgactgt gtttctgtat ttgtctgaaa	1200
atatgggcca gactgttacc actcccttaa gtttgacctt aggtcactgg aaagatgtcg	1260
agcggatcgc tcacaaccag tcggtagatg tcaagaagag acgttgggtt accttctgct	1320
ctgcagaatg gccaaccttt aacgtcggat ggccgcgaga cggcaccttt aaccgagacc	1380
tcatcaccca ggttaagatc aaggtctttt cacctggccc gcatggacac ccagaccagg	1440
tcccctacat cgtgacctgg gaagccttgg cttttgacct ccctccctgg gtcaagccct	1500

ttgtacaccc taagcctccg cctcctcttc ctccatccgc cccgtctctc ccccttgaac	1560
ctcctcggtc gaccccgctt cgatcctccc tttatccagc cctcactcct tctctaggcg	1620
ccaaaccta acctcaagtt ctttctgaca gtggggggcc gctcatcgac ctacttacag	1680
aagaccccc gccttatagg gacccaagac caccctcttc cgacagggac ggaaatggtg	1740
gagaagcgac ccctgcggga gaggcaccgg acccctcccc aatggcatct cgcctacgtg	1800
ggagacggga gccccctgtg gccgactcca ctacctcgca ggcattcccc ctccgcgcag	1860
gaggaaacgg acagcttcaa tactggccgt tctcctcttc tgacctttac aactggaaaa	1920
ataataaccc ttctttttct gaagatccag gtaaactgac agctctgacg gagtctgtcc	1980
tcatcaccca tcagcccacc tgggacgact gtcagcagct gttggggact ctgctgaccg	2040
gagaagaaaa acaacgggtg ctcttagagg ctagaaaggc ggtgcggggc gatgatgggc	2100
gccccactca actgcccact gaagtcgatg ccgcttttcc cctcgagcgc ccagactggg	2160
attacaccac ccaggcaggt aggaaccacc tagtccacta tcgccagttg ctccctagcgg	2220
gtctccaaaa cgcgggcaga agccccacca atttggccaa ggtaaaagga ataacacaag	2280
ggcccaatga gtctccctcg gccttcctag agagacttaa ggaagcctat cgcaggtaca	2340
ctccttatga ccctgaggac ccagggcaag aaactaatgt gtctatgtct ttcatttggc	2400
agtctgcccc agacattggg agaaagttag agaggttaga agatttaaaa aacaagacgc	2460
ttggagattt ggtagagag gcagaaaaga tctttaataa acgagaaacc ccggaagaaa	2520
gagaggaacg tatcaggaga gaaacagagg aaaaagaaga acgccgtagg acagaggatg	2580
agcagaaaga gaaagaaaga gatcgtagga gacatagaga gatgagcaag ctattggcca	2640
ctgtcgtagg tggacagaaa caggatagac agggaggaga acgaaggagg tcccaactcg	2700
atcgcgacca gtgtgcctac tgcaaagaaa aggggcactg ggctaaagat tgtcccaaga	2760
aaccacgagg acctcgggga ccaagacccc agacctccct cctgacccta gatgactagg	2820
gaggtcaggg tcaggagccc cccctgaac ccaggataac cctcaaagtc ggggggcaac	2880
ccgtcacctt cctggtagat actggggccc aacactccgt gctgacccaa aatcctggac	2940
ccctaagtga taagtctgcc tgggtccaag gggctactgg aggaaagcgg tatcgctgga	3000
ccacggatcg caaagtacat ctagctaccg gtaaggtcac ccactcttct ctccatgtac	3060
cagactgtcc ctatcctctg ttaggaagag atttgctgac taaactaaaa gcccaaatcc	3120
actttgaggg atcaggagcc caggttatgg gaccaatggg gcagcccctg caagtgttga	3180
ccctaaatat agaagatgag tatcggctac atgagacctc aaaagagcca gatgtttctc	3240
tagggccac atggctgtct gatcttctc aggcctgggc ggaaaccggg ggcattggac	3300
tggcagttcg ccaagctcct ctgatcatac ctctgaaagc aacctctacc cccgtgtcca	3360

ES 2 779 149 T3

taaaacaata	ccccatgtca	caagaagcca	gactggggat	caagccccac	atacagagac	3420
tgttggaacca	gggaataactg	gtaccctgcc	agtccccctg	gaacacgccc	ctgctacccg	3480
ttaagaaacc	agggactaat	gattataggc	ctgtccagga	tctgagagaa	gtcaacaagc	3540
gggtggaaga	catccacccc	accgtgccc	acccttaca	cctcttgagc	gggtccccc	3600
cgtcccacca	gtggtacact	gtgcttgatt	taaaggatgc	ctttttctgc	ctgagactcc	3660
accccaccag	tcagcctctc	ttcgcccttg	agtggagaga	tccagagatg	ggaatctcag	3720
gacaattgac	ctggaccaga	ctcccacagg	gtttcaaaaa	cagtcccacc	ctgtttgatg	3780
aggcactgca	cagagaccta	gcagacttcc	ggatccagca	cccagacttg	atcctgctac	3840
agtacgtgga	tgacttactg	ctggccgcca	cttctgagct	agactgcaa	caaggtactc	3900
gggccctggt	acaaacccta	gggaacctcg	ggtatcgggc	ctcgccaag	aaagcccaa	3960
tttgccagaa	acaggtcaag	tatctggggt	atcttctaaa	agaggtcag	agatggctga	4020
ctgaggccag	aaaagagact	gtgatggggc	agcctactcc	gaagaccct	cgacaactaa	4080
gggagttcct	agggacggca	ggcttctgtc	gcctctggat	ccctgggttt	gcagaaatgg	4140
cagccccctt	gtaccctctc	acaaaaacgg	ggactctggt	taattggggc	ccagaccaac	4200
aaaaggccta	tcaagaaatc	aagcaagctc	ttctaactgc	cccagccctg	gggttgccag	4260
atttgactaa	gccctttgaa	ctctttgtcg	acgagaagca	gggtacgcc	aaaggtgtcc	4320
taacgcaaaa	actgggacct	tggcgctggc	cggtggccta	cctgtccaaa	aagctagacc	4380
cagtagcagc	tgggtggccc	ccttgccctac	ggatggtagc	agccattgcc	gtactgacaa	4440
aggatgcagg	caagctaacc	atgggacagc	cactagtcac	tctggccccc	catgcagtag	4500
aggcactagt	caaacaaccc	cccagccgct	ggctttccaa	cgcccgatg	actcactatc	4560
aggccttgct	tttgagacag	gaccgggtcc	agttcggacc	ggtggtagcc	ctgaaccggg	4620
ctacgctgct	cccactgcct	gaggaagggc	tgcaacacaa	ctgccttgat	atcctggccg	4680
aagcccacgg	aaccggaccc	gacctaacgg	accagccgct	cccagacgcc	gaccacacct	4740
ggtacacgga	tggaaagcagt	ctcttacaag	agggacagcg	taaggcggga	gctgcgggtga	4800
ccaccgagac	cgaggtaatc	tgggctaaag	ccctgccagc	cgggacatcc	gctcagcggg	4860
ctgaactgat	agcactcacc	caggccctaa	agatggcaga	aggtaagaag	ctaaatgttt	4920
atactgatag	ccgttatgct	tttgctactg	cccataacca	tggagaaata	tacagaaggc	4980
gtgggttgct	cacatcagaa	ggcaaagaga	tcaaaaataa	agacgagatc	ttggccctac	5040
taaaagccct	ctttctgccc	aaaagactta	gcataatcca	ttgtccagga	catcaaaagg	5100
gacacagcgc	cgaggctaga	ggcaaccgga	tggctgacca	agcggcccgga	aaggcagcca	5160
tcacagagac	tccagacacc	tctaccctcc	tcatagaaaa	ttcatcacc	tacacctcag	5220
aacatthttca	ttacacagtg	actgatataa	aggacctaac	caagttgggg	gccatthttatg	5280

ES 2 779 149 T3

ataaaacaaa gaagtattgg gtctaccaag gaaaacctgt gatgcctgac cagtttactt	5340
ttgaattatt agactttctt catcagctga ctcacctcag cttctcaaaa atgaaggctc	5400
tcctagagag aagccacagt ccctactaca tgctgaaccg ggatcgaaca ctcaaaaata	5460
tcactgagac ctgcaaagct tgtgcacaag tcaacgccag caagtctgcc gttaaacagg	5520
gaactagggc ccgcgggcat cggcccgga ctcattggga gatcgatttc accgagataa	5580
agcccgatt gtatggctat aaatatcttc tagtttttat agataccttt tctggctgga	5640
tagaagcctt cccaaccaag aaagaaaccg ccaaggtcgt aaccaagaag ctactagagg	5700
agatcttccc caggttcggc atgcctcagg tattgggaac tgacaatggg cctgccttcg	5760
tctccaaggt gagtcagaca gtggccgcatc tgttggggat tgattggaaa ttacattgtg	5820
catacagacc ccaaagctca ggccaggtag aaagaatgaa tagaaccatc aaggagactt	5880
taactaaatt aacgcttgca actggctcta gagactgggt gctcctactc cccttagccc	5940
tgtaccgagc ccgcaacacg ccgggcccc atggcctcac cccatatgag atcttatatg	6000
gggcaccccc gcccttgta aacttccctg accctgacat gacaagagtt actaacagcc	6060
cctctctcca agctcactta caggctctct acttagtcca gcacgaagtc tggagacctc	6120
tggcggcagc ctaccaagaa caactggacc gaccgggtgt acctcaccct taccgagtgc	6180
gcgacacagt gtgggtccgc cgacaccaga ctaagaacct agaacctcgc tggaaaggac	6240
cttacacagt cctgctgacc acccccaccg ccctcaaagt agacggcatc gcagcttggg	6300
tacacgccgc ccacgtgaag gctgccgacc ccgggggtgg accatcctct agactgacat	6360
ggcgcggtta acgctctcaa aacccccctc agataagatt aacccgtgga agcccttaat	6420
agtcattgga gtccctgttag gagtagggat ggcagagagc ccccatcagg tctttaatgt	6480
aacctggaga gtcaccaacc tgatgactgg gcgtaccgcc aatgccacct ccctcctggg	6540
aactgtacaa gatgccttcc caaaattata ttttgatcta tgtgatctgg tcggagagga	6600
gtgggacctt tcagaccagg aaccgtatgt cgggtatggc tgcaagtacc ccgcagggag	6660
acagcggacc cggacttttg acttttacgt gtgccctggg cataccgtaa agtcggggtg	6720
tgggggacca ggagagggct actgtggtaa atgggggtgt gaaaccaccg gacaggctta	6780
ctggaagccc acatcatcgt gggacctaat ctcccttaag cgcggtaaca cccctggga	6840
cacgggatgc tctaaagtg cctgtggccc ctgctacgac ctctccaaag tatccaattc	6900
cttccaaggg gctactcgag ggggcagatg caaccctcta gtcctagaat tcaactgatc	6960
aggaaaaaag gctaactggg acgggcccac atcgtgggga ctgagactgt accggacagg	7020
aacagatcct attaccatgt tctccctgac ccggcaggtc cttaatgtgg gaccccgagt	7080
cccataggg cccaaccag tattaccga ccaaagactc ccttcctcac caatagagat	7140

ES 2 779 149 T3

tgtaccggct	ccacagccac	ctagccccct	caataccagt	tacccccctt	ccactaccag	7200
tacaccctca	acctccccta	caagtccaag	tgtcccacag	ccacccccag	gaactggaga	7260
tagactacta	gctctagtca	aaggagccta	tcaggcgctt	aacctcacca	atcccgacaa	7320
gaccaagaa	tgttggctgt	gcttagtgtc	gggacctcct	tattacgaag	gagtagcggt	7380
cgtgggcact	tataccaatc	attccaccgc	tccggccaac	tgtacggcca	cttcccaaca	7440
taagcttacc	ctatctgaag	tgacaggaca	gggcctatgc	atgggggcag	tacctaaaac	7500
tcaccaggcc	ttatgtaaca	ccacccaaag	cgcgggctca	ggatcctact	acettgcagc	7560
acccgcggga	acaatgtggg	cttgccagcac	tggattgact	ccctgcttgt	ccaccacggt	7620
gctcaatcta	accacagatt	attgtgtatt	agttgaactc	tggcccagag	taattttacca	7680
ctccccgat	tatatgtatg	gtcagcttga	acagcgtacc	aaatataaaa	gagagccagt	7740
atcattgacc	ctggcccttc	tactaggagg	attaaccatg	ggagggattg	cagctggaat	7800
agggacgggg	accactgcct	taattaaaac	ccagcagttt	gagcagcttc	atgccgctat	7860
ccagacagac	ctcaacgaag	tcgaaaagtc	aattaccaac	ctagaaaagt	cactgacctc	7920
gttgtctgaa	gtagtcctac	agaaccgcag	aggcctagat	ttgctattcc	taaaggaggg	7980
aggtctctgc	gcagccctaa	aagaagaatg	ttgtttttat	gcagaccaca	cggggctagt	8040
gagagacagc	atggccaaat	taagagaaag	gcttaatcag	agacaaaaac	tatttgagac	8100
aggccaagga	tggttcgaag	ggctgtttta	tagatcccc	tggtttacca	ccttaatctc	8160
caccatcatg	ggacctctaa	tagtactctt	actgatctta	ctcttttgac	cttgcatctt	8220
caatcgattg	gtccaatttg	ttaaagacag	gatctcagtg	gtccaggctc	tggttttgac	8280
tcagcaatat	caccagctaa	aaccataga	gtacgagcca	tgaacgcgta	atgtagtctt	8340
atgcaatact	cttgtagtct	tgcaacatgg	taacgatgag	ttagcaacat	gccttacaag	8400
gagagaaaaa	gcaccgtgca	tgccgattgg	tggaagtaag	gtggtacgat	cgtgccttat	8460
taggaaggca	acagacgggt	ctgacatgga	ttggacgaac	cactgaattc	cgcattgcag	8520
agatattgta	tttaagtgcc	tagctcgata	caataaacgc	catttgacca	ttcaccacat	8580
tggtgtgcac	catggtgacc	ggcggcatgg	cctccaagtg	ggatcaaaag	ggcatggata	8640
tcgcttacga	ggaggccctg	ctgggctaca	aggagggcgg	cgtgcctatc	ggcggctgtc	8700
tgatcaacaa	caaggacggc	agtgtgctgg	gcaggggcca	caacatgagg	ttccagaagg	8760
gctccgccac	cctgcacggc	gagatctcca	ccctggagaa	ctgtggcagg	ctggagggca	8820
aggtgtacaa	ggacaccacc	ctgtacacca	ccctgtcccc	ttgtgacatg	tgtaccggcg	8880
ctatcatcat	gtacggcatc	cctaggtgtg	tgatcggcga	gaacgtgaac	ttcaagtcca	8940
agggcgagaa	gtacctgcaa	accaggggcc	acgaggtggg	ggttggtgac	gatgagaggt	9000
gtaagaagct	gatgaagcag	ttcatcgacg	agaggcctca	ggactggttc	gaggatatcg	9060

ES 2 779 149 T3

gcgagtaatg aaaggtcggg caggaagagg gcctatttcc catgattcct tcatatttgc	9120
atatacgata caaggctgtt agagagataa ttagaattaa tttgactgta aacacaaaga	9180
tattagtaca aaatacgtga cgtagaaagt aataatttct tgggtagttt gcagttttta	9240
aaattatggt ttaaaatgga ctatcatatg cttaccgtaa cttgaaagta tttcgatttc	9300
ttggctttat atatcttggt gaaaggacga aacaccggat cctgctcgct tcggcagcac	9360
atatactagt cgactaggga taacagggtta attgtttgaa tgaggcttca gtactttaca	9420
gaatcgttgc ctgcacatct tggaacact tgctgggatt acttcttcag gtaacccaa	9480
cagaaggctc gagaaggtat attgctgttg acagtgagcg acacgatcat gtgaacccaa	9540
atagtgaagc cacagatgta tttgggttca catgatcgtg gtgcctactg cctcggaatt	9600
caaggggcta ctttaggagc aattatcttg tttactaaaa ctgaatacct tgctatctct	9660
ttgatacatt tttacaaagc tgaattaaaa tgggtataaat taaatcactt ttttcaattg	9720
gaagactaat gcggcggccg cagataaaat aaaagatttt atttagtctc cagaaaaagg	9780
ggggaatgaa agacccccacc tgtaggtttg gcaagctagc ttaagtaacg ccattttgca	9840
aggcatggaa aaatacataa ctgagaatag agaagttcag atcaagggtca ggaacagatg	9900
gaacagctga atatgggcca aacaggatat ctgtggttaag cagttcctgc cccggctcag	9960
ggccaagaac agatggaaca gctgaatatg ggccaaacag gatatctgtg gtaagcagtt	10020
cctgccccgg ctcaggggcca agaacagatg gtccccagat gcggtccagc cctcagcagt	10080
ttctagagaa ccatcagatg tttccagggt gcccgaagga cctgaaatga ccctgtgcct	10140
tatttgaact aaccaatcag ttcgcttctc gcttctgttc gcgcgcttct gctccccgag	10200
ctcaataaaa gagcccacaa cccctcactc ggggcgccag tcctccgatt gactgagtcg	10260
cccggttacc cgtgtatcca ataaacctc ttgcagttgc atccgacttg tggctctcgt	10320
gttccttggg agggctctct ctgagtgatt gactaccgt cagcgggggt ctttcattac	10380
atgtgagcaa aaggccagca aaaggccagg aaccgtaaaa aggcgcgctt gctggcgttt	10440
ttccataggc tccgcccccc tgacgagcat cacaaaaatc gacgctcaag tcagaggtgg	10500
cgaaaaccga caggactata aagataccag gcgtttcccc ctggaagctc cctcgtgcgc	10560
tctcctgttc cgaccctgcc gcttaccgga tacctgtccg cctttctccc ttcgggaagc	10620
gtggcgcttt ctcatagctc acgctgtagg tatctcagtt cgggtgtaggt cgttcgctcc	10680
aagctgggct gtgtgcacga accccccgtt cagcccgacc gctgcgcctt atccgtaac	10740
tatcgtcttg agtccaaccc ggtaagacac gacttatcgc cactggcagc agccactggt	10800
aacaggatta gcagagcgag gtatgtaggc ggtgctacag agttcttgaa gtggtggcct	10860
aactacggct aactagaag gacagtattt ggtatctgcg ctctgctgaa gccagttacc	10920

ES 2 779 149 T3

```

ttcggaaaaa gagttggtag ctcttgatcc ggcaaaaaaa ccaccgctgg tagcggtggt 10980
ttttttgttt gcaagcagca gattacgcgc agaaaaaaag gatctcaaga agatcctttg 11040
atcttttcta cggggtctga cgctcagtgg aacgaaaact cacgttaagg gatttttggtc 11100
atgagattat caaaaaggat cttcacctag atccttttaa attaaaaatg aagttttaaa 11160
tcaatctaaa gtatatatga gtaaacctgg tctgacagtt accaatgctt aatcagtgag 11220
gcacctatct cagcgatctg tctatttcgt tcatccatag ttgcctgact ccccgctcgtg 11280
tagataacta cgatacggga gggcttacca tctggcccca gtgctgcaat gataccgcga 11340
gaccacgct caccggctcc agatttatca gcaataaacc agccagccgg aagggccgag 11400
cgcagaagtg gtcctgcaac tttatccgcc tccatccagt ctattaattg ttgccgggaa 11460
gctagagtaa gtagttcgcc agttaatagt ttgcgcaacg ttgttgccat tgctgcaggc 11520
atcgtggtgt cacgctcgtc gtttggtatg gcttcattca gctccggttc ccaacgatca 11580
aggcgagtta catgatcccc catgttggtgc aaaaaagcgg ttagctcctt cggtcctccg 11640
atcgttgta caagtaagtt ggccgcagtg ttatcaactca tggttatggc agcactgcat 11700
aattctctta ctgtcatgcc atccgtaaga tgcttttctg tgactgggtga gtactcaacc 11760
aagtcattct gagaatagt tatgcggcga ccgagttgct cttgcccggc gtcaacacgg 11820
gataataccg cgccacatag cagaacttta aaagtgctca tcattggaaa acgttcttgc 11880
gggcgaaaaa tctcaaggat cttaccgctg ttgagatcca gttcgatgta acccactcgt 11940
gcacccaact gatcttcagc atcttttact ttcaccagcg tttctgggtg agcaaaaaca 12000
ggaaggcaaa atgccgcaaa aaagggaata agggcgacac ggaaatgttg aatactcata 12060
ctcttccttt ttcaatatta ttgaagcatt tatcagggtt attgtctcat gagcggatac 12120
atatttgaat gtatttagaa aaataaaca ataggggttc cgcgcacatt tccccgaaa 12180
gtgccacctg acgtctaaga aaccattatt atcatgacat taacctataa aaataggcgt 12240
atcacgaggc cctttcgtct tcaagaattc cat 12273

```

<210> 12

<211> 11489

5 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Vector pAC3-H1-PDL1miR30shRN4

10

<400> 12

```

tagttattaa tagtaatcaa ttacgggggc attagttcat agcccatata tggagttccg 60
cgttacataa cttacggtaa atggcccgcc tggctgaccg cccaacgacc cccgcccatt 120
gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagt aacgccaata gggactttcc attgacgtca 180
atgggtggag tatttacggt aaactgccca cttggcagta catcaagtgt atcatatgcc 240

```

ES 2 779 149 T3

aagtacgccc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt atgccagta	300
catgacctta tgggactttc ctacttggca gtacatctac gtattagtca tcgctattac	360
catggtgatg cgggttttggc agtacatcaa tgggcgtgga tagcggtttg actcacgggg	420
atttccaagt ctccacccca ttgacgtcaa tgggagtttg ttttggcacc aaaatcaacg	480
ggactttcca aaatgtcgta acaactccgc cccattgacg caaatgggcg gtaggcgtgt	540
acggtgggag gtctatataa gcagagctgg tttagtgaac cggcgccagt cctccgattg	600
actgagtcgc ccgggtaccc gtgtatccaa taaaccctct tgcagttgca tccgacttgt	660
ggtctcgctg ttccttggga gggctcctc tgagtgattg actaccgctc agcgggggtc	720
tttcatttgg gggctcgtcc gggatcggga gaccctgcc cagggaccac cgaccacca	780
ccgggaggtg agctggccag caacttatct gtgtctgtcc gattgtctag tgtctatgac	840
tgattttatg cgctgcgtc ggtactagtt agctaactag ctctgtatct ggcggaccgg	900
tgggtggaact gacgagttcg gaacaccggc ccgcaaccct gggagacgtc ccagggactt	960
cggggggcgt ttttgtggcc cgacctgagt ccaaaaaatcc cgatcgtttt ggactctttg	1020
gtgcaccccc cttagaggag ggatatgtgg ttctggtagg agacgagaac ctaaaacagt	1080
tcccgcctcc gtctgaattt ttgctttcgg tttgggaccg aagccgcgcc gcgcgtcttg	1140
tctgctgcag catcgttctg tgttgtctct gtctgactgt gtttctgtat ttgtctgaaa	1200
atatgggcca gactgttacc actcccttaa gtttgacctt aggtcactgg aaagatgtcg	1260
agcggatcgc tcacaaccag tcggtagatg tcaagaagag acgttgggtt accttctgct	1320
ctgcagaatg gccaaccttt aacgtcggat ggccgcgaga cggcaccttt aaccgagacc	1380
tcatcaccca ggttaagatc aaggtctttt cacctggccc gcatggacac ccagaccagg	1440
tccctacatc cgtgacctgg gaagccttgg cttttgaccc ccctccctgg gtcaagccct	1500
ttgtacaccc taagcctccg cctcctcttc ctccatccgc cccgtctctc ccccttgaac	1560
ctcctcgttc gaccccgct cgatcctccc tttatccagc cctcaactct tctctaggcg	1620
ccaaacctaa acctcaagtt ctttctgaca gtggggggcc gctcatcgac ctacttacag	1680
aagaccccc gccttatagg gacccaagac caccctctc cgacagggac ggaaatggtg	1740
gagaagcgac ccctgcggga gaggcaccgg acccctcccc aatggcatct cgcctacgtg	1800
ggagacggga gccccctgtg gccgactcca ctacctgca ggcatcccc ctccgcgcag	1860
gaggaacgg acagcttcaa tactggcgt tctcctcttc tgacctttac aactggaaaa	1920
ataataaccc ttctttttct gaagatccag gtaaaactgac agctctgatc gagtctgtcc	1980
tcatcaccca tcagcccacc tgggacgact gtcagcagct gttggggact ctgctgaccg	2040
gagaagaaaa acaacgggtg ctcttagagg ctagaaaggc ggtgcggggc gatgatgggc	2100

ES 2 779 149 T3

gccccactca actgccaat gaagtcgatg ccgcttttcc cctcgagcgc ccagactggg	2160
attacaccac ccaggcaggt aggaaccacc tagtccacta tcgccagtig ctccatagcgg	2220
gtctccaaaa cgcgggcaga agccccacca atttgcccaa ggtaaaagga ataacacaag	2280
ggccaatga gtctccctcg gccttcctag agagacttaa ggaagcctat cgcaggtaca	2340
ctccttatga ccctgaggac ccagggcaag aaactaatgt gtctatgtct ttcatttggc	2400
agtctgcccc agacattggg agaaagttag agaggtaga agatttaaaa aacaagacgc	2460
ttggagattt ggtagagag gcagaaaaga tctttaataa acgagaaacc ccggaagaaa	2520
gagaggaacg tatcaggaga gaaacagagg aaaaagaaga acgccgtagg acagaggatg	2580
agcagaaaaga gaaagaaaga gatcgtagga gacatagaga gatgagcaag ctattggcca	2640
ctgtcgttag tggacagaaa caggatagac agggaggaga acgaaggagg tcccaactcg	2700
atcgcgacca gtgtgcctac tgcaaagaaa aggggcactg ggctaaagat tgtccaaga	2760
aaccacgagg acctcgggga ccaagacccc agacctccct cctgacccta gatgactagg	2820
gaggtcaggg tcaggagccc cccctgaac ccaggataac cctcaaagtc ggggggcaac	2880
ccgtcacctt cctggtagat actggggccc aacactccgt gctgacccaa aatcctggac	2940
ccctaagtga taagtctgcc tgggtccaag gggctactgg aggaaagcgg tatcgctgga	3000
ccacggatcg caaagtacat ctagctaccg gtaaggcac ccactcttcc ctccatgtac	3060
cagactgtcc ctatcctctg ttaggaagag atttgctgac taaactaaaa gcccaatcc	3120
actttgaggg atcaggagcc caggttatgg gaccaatggg gcagcccctg caagtgttga	3180
ccctaaatat agaagatgag tatcggtac atgagacctc aaaagagcca gatgtttctc	3240
taggggtcac atggctgtct gattttcctc aggcctgggc ggaaaccggg ggcatgggac	3300
tggcagttcg ccaagctcct ctgatcatac ctctgaaagc aacctctacc cccgtgtcca	3360
taaaacaata ccccatgtca caagaagcca gactggggat caagccccac atacagagac	3420
tgttggaaca gggaatactg gtaccctgcc agtccccctg gaacacgccc ctgctaccgg	3480
ttaagaaacc agggactaat gattataggc ctgtccagga tctgagagaa gtcaacaagc	3540
gggtggaaga catccacccc accgtgcccc acccttacia cctcttgagc gggctccac	3600
cgtcccacca gtggtacact gtgcttgatt taaaggatgc ctttttctgc ctgagactcc	3660
accccaccag tcagcctctc ttcgcctttg agtggagaga tccagagatg ggaatctcag	3720
gacaattgac ctggaccaga ctcccacagg gtttcaaaaa cagtcccacc ctgtttgatg	3780
aggcactgca cagagacctc gcagacttcc ggatccagca ccagacttg atcctgctac	3840
agtacgtgga tgacttactg ctggccgcca cttctgagct agactgcaa caaggactc	3900
gggccctgtt acaaaccta gggaacctcg ggtatcgggc ctggccaag aaagcccaaa	3960
tttgccagaa acaggtcaag tatctggggt atcttctaaa agagggtcag agatggctga	4020

ctgaggccag	aaaagagact	gtgatggggc	agcctactcc	gaagaccct	cgacaactaa	4080
gggagttcct	agggacggca	ggcttctgtc	gcctctggat	ccctgggttt	gcagaaatgg	4140
cagccccctt	gtaccctctc	accaaaacgg	ggactctgtt	taattggggc	ccagaccaac	4200
aaaaggccta	tcaagaaatc	aagcaagctc	ttctaactgc	cccagccctg	gggttgccag	4260
at ttgactaa	gccctttgaa	ctctttgtcg	acgagaagca	gggctacgcc	aaaggtgtcc	4320
taacgcaaaa	actgggacct	tggcgtcggc	cggtggccta	cctgtccaaa	aagctagacc	4380
cagtagcagc	tgggtggccc	ccttgccctac	ggatggtagc	agccattgcc	gtactgacaa	4440
aggatgcagg	caagctaacc	atgggacagc	cactagtcat	tctggccccc	catgcagtag	4500
aggcactagt	caaacaaccc	cccgaaccgt	ggctttccaa	cggccggatg	actcactatc	4560
aggccttgct	tttggaacag	gaccgggtcc	agttcggacc	ggtggtagcc	ctgaacccgg	4620
ctacgctgct	cccactgcct	gaggaagggc	tgcaacacaa	ctgccttgat	atcctggccg	4680
aagcccacgg	aacccgaccc	gacctaacgg	accagccgct	cccagacgcc	gaccacacct	4740
ggtacacgga	tggaagcagt	ctcttacaag	agggacagcg	taaggcggga	gctgcggtga	4800
ccaccgagac	cgaggtaatc	tgggctaag	ccctgccagc	cgggacatcc	gctcagcggg	4860
ctgaactgat	agcactcacc	caggccctaa	agatggcaga	aggtaagaag	ctaaatgttt	4920
atactgatag	ccgttatgct	tttgctactg	cccatatcca	tggagaaata	tacagaaggc	4980
gtgggttgct	cacatcagaa	ggcaaagaga	tcaaaaataa	agacgagatc	ttggccctac	5040
taaaagccct	ctttctgccc	aaaagactta	gcataatcca	ttgtccagga	catcaaaagg	5100
gacacagcgc	cgaggctaga	ggcaaccgga	tggctgacca	agcggcccca	aaggcagcca	5160
tcacagagac	tccagacacc	tctaccctcc	tcatagaaaa	ttcatcacc	tacacctcag	5220
aacattttca	ttacacagt	actgatataa	aggacctaac	caagttgggg	gccatttatg	5280
ataaaacaaa	gaagtattgg	gtctaccaag	gaaaacctgt	gatgcctgac	cagtttactt	5340
ttgaattatt	agactttctt	catcagctga	ctcacctcag	cttctcaaaa	atgaaggctc	5400
tcctagagag	aagccacagt	ccctactaca	tgctgaaccg	ggatcgaaca	ctcaaaaata	5460
tcactgagac	ctgcaaagct	tgtgcacaag	tcaacgccag	caagtctgcc	gttaaacagg	5520
gaactagggg	ccgcgggcat	cggcccgga	ctcattggga	gatcgatttc	accgagataa	5580
agcccggtt	gtatggctat	aaatatcttc	tagtttttat	agataccttt	tctggctgga	5640
tagaagcctt	cccaaccaag	aaagaaaccg	ccaaggtcgt	aaccaagaag	ctactagagg	5700
agatcttccc	caggttcggc	atgcctcagg	tattgggaac	tgacaatggg	cctgccttcg	5760
tctccaaggt	gagtcagaca	gtggccgatc	tgttggggat	tgattggaaa	ttacattgtg	5820
catacagacc	ccaaagctca	ggccaggtag	aaagaatgaa	tagaaccatc	aaggagactt	5880

ES 2 779 149 T3

taactaaatt	aacgcttgca	actggctcta	gagactgggt	gtcctactc	cccttagccc	5940
tgtaccgagc	ccgcaacacg	ccgggcccc	atggcctcac	cccatatgag	atcttatatg	6000
gggcaccccc	gccccttgta	aacttccctg	accctgacat	gacaagagtt	actaacagcc	6060
cctctctcca	agctcactta	caggctctct	acttagtcca	gcacgaagtc	tggagacctc	6120
tggcggcagc	ctaccaagaa	caactggacc	gaccggtggt	acctcaccct	taccgagtcg	6180
gcgacacagt	gtgggtccgc	cgacaccaga	ctaagaacct	agaacctcgc	tggaaaggac	6240
cttacacagt	cctgctgacc	acccccaccg	ccctcaaagt	agacggcatc	gcagcttgga	6300
tacacgccgc	ccacgtgaag	gctgccgacc	ccgggggtgg	accatcctct	agactgacat	6360
ggcgcggtta	acgctctcaa	aacccccctc	agataagatt	aaccctgga	agcccttaat	6420
agtcatggga	gtcctgttag	gagtagggat	ggcagagagc	cccatcagg	tctttaatgt	6480
aacctggaga	gtcaccaacc	tgatgactgg	gcgtaccgcc	aatgccacct	ccctcctggg	6540
aactgtacaa	gatgccttcc	caaaattata	ttttgatcta	tgtgatctgg	tgggagagga	6600
gtgggaccct	tcaagaccag	aaccgtatgt	cggtatggc	tgcaagtacc	ccgcagggag	6660
acagcggacc	cggacttttg	acttttacgt	gtgccctggg	cataccgtaa	agtcggggtg	6720
tgggggacca	ggagagggct	actgtggtaa	atgggggtgt	gaaaccaccg	gacaggctta	6780
ctggaagccc	acatcatcgt	gggacctaat	ctcccttaag	cgcggtaaca	ccccctggga	6840
cacgggatgc	tctaaagttg	cctgtggccc	ctgctacgac	ctctccaaag	tatccaattc	6900
cttccaaggg	gctactcgag	ggggcagatg	caaccctcta	gtcctagaat	tactgatgc	6960
aggaaaaaag	gctaactggg	acggggccaa	atcgtgggga	ctgagactgt	accggacag	7020
aacagatcct	attaccatgt	tctccctgac	ccggcaggtc	cttaatgtgg	gaccccgagt	7080
ccccataggg	cccaaccacg	tattaccoga	ccaaagactc	ccttcctcac	caatagagat	7140
tgtaccggct	ccacagccac	ctagccccct	caataccagt	tacccccctt	ccactaccag	7200
tacaccctca	acctcccta	caagtccaag	tgtccacag	ccacccccag	gaactggaga	7260
tagactacta	gtctagtca	aaggagccta	tcaggcgctt	aacctcacca	atcccgacaa	7320
gacccaagaa	tggtggctgt	gcttagtgtc	gggacctcct	tattacgaag	gagtagcgg	7380
cgtgggcact	tataccaatc	attccaccgc	tccggccaac	tgtacggcca	cttcccaaca	7440
taagettacc	ctatctgaag	tgacaggaca	gggcctatgc	atgggggcag	tacctaaaac	7500
tcaccaggcc	ttatgtaaca	ccacccaaag	cgccggtca	ggatcctact	accttgacgc	7560
acccgccgga	acaatgtggg	cttgacgac	tggattgact	ccctgcttgt	ccaccacggt	7620
gctcaatcta	accacagatt	attgtgtatt	agttgaactc	tggcccagag	taatttacca	7680
ctccccgat	tatatgtatg	gtcagcttga	acagcgtacc	aaatataaaa	gagagccagt	7740
atcattgacc	ctggcccttc	tactaggagg	attaaccatg	ggagggattg	cagctggaat	7800

ES 2 779 149 T3

agggacgggg accactgcct taattaaaac ccagcagttt gagcagcttc atgccgctat	7860
ccagacagac ctcaacgaag tcgaaaagtc aattaccaac ctagaaaagt cactgacctc	7920
gttgtctgaa gtagtcctac agaaccgcag aggcctagat ttgctattcc taaaggaggg	7980
aggtctctgc gcagccctaa aagaagaatg ttgtttttat gcagaccaca cggggctagt	8040
gagagacagc atggccaaat taagagaaag gcttaatcag agacaaaaac tatttgagac	8100
aggccaagga tggttcgaag ggctgtttaa tagatcccc tggtttacca ccttaatctc	8160
caccatcatg ggacctctaa tagtactctt actgatctta ctctttggac cttgcattct	8220
caatcgattg gtccaatttg ttaaagacag gatctcagtg gtccaggctc tggttttgac	8280
tcagcaatat caccagctaa aaccataga gtacgagcca tgaacgcgtg aacgctgacg	8340
tcatcaaccc gctccaagga atcgcgggcc cagtgtcact aggcgggaac acccagcgcg	8400
cgtgcgccct ggcaggaaga tggctgtgag ggacagggga gtggcgccct gcaatatttg	8460
catgtcgcta tgtgttctgg gaaatcacca taaacgtgaa atgtcttttg atttggaat	8520
cttataagtt ctgtatgaga ccactctttc ccggatcctg ctcgcttcgg cagcacatat	8580
actagtcgac tagggataac agggtaattg tttgaatgag gcttcagtac tttacagaat	8640
cgttgctctgc acatcttggg aacacttgct gggattactt cttcagggtta acccaacaga	8700
aggctcgaga aggtatattg ctgttgacag tgagcgcggt agcaatatga caattgatag	8760
tgaagccaca gatgtatcaa ttgtcatatt gctaccatgc ctactgcctc ggaattcaag	8820
gggctacttt aggagcaatt atcttgttta ctaaaactga ataccttgct atctctttga	8880
tacattttta caaagctgaa ttaaaatggg ataaattaaa tcaacttttt caattggaag	8940
actaatgagg cggccgcaga taaaataaaa gattttattt agtctccaga aaaagggggg	9000
aatgaaagac ccacactgta ggtttggcaa gctagcttaa gtaacgccat tttgcaaggc	9060
atggaaaaat acataactga gaatagagaa gttcagatca aggtcaggaa cagatggaac	9120
agctgaatat gggccaaaca ggatatctgt ggtaagcagt tcctgccccg gctcagggcc	9180
aagaacagat ggaacagctg aatatgggcc aaacaggata tctgtggtaa gcagttcctg	9240
ccccggctca gggccaagaa cagatgggcc ccagatgcgg tccagccctc agcagtttct	9300
agagaaccat cagatgtttc cagggtgccc caaggacctg aaatgaccct gtgccttatt	9360
tgaactaacc aatcagttcg cttctcgctt ctgttcgctc gcttctgctc cccgagctca	9420
ataaaagagc ccacaacccc tcactcgggg cgccagtcct ccgattgact gagtgcgccg	9480
ggtacccgtg tatccaataa accctcttgc agttgcatcc gacttgtggg ctcgctgttc	9540
cttgggaggg tctcctctga gtgattgact acccgctcagc ggggggtctt cattacatgt	9600
gagcaaaagg ccagcaaaag gccaggaacc gtaaaaaggc cgcgttgctg gcgtttttcc	9660

ES 2 779 149 T3

```

ataggctccg cccccctgac gagcatcaca aaaatcgacg ctcaagtcag aggtggcgaa 9720
acccgacagg actataaaga taccaggcgt ttccccctgg aagctccctc gtgcgctctc 9780
ctgttccgac cctgccgctt accggatacc tgtccgcctt tctcccttcg ggaagcgtgg 9840
cgctttctca tagctcacgc tgtaggatc tcagttcggg gtaggtcgtt cgctccaagc 9900
tgggctgtgt gcacgaaccc cccgttcagc ccgaccgctg cgccttatcc ggtaactatc 9960
gtcttgagtc caaccggta agacacgact tatcgccact ggcagcagcc actggtaca 10020
ggattagcag agcgaggat gtaggcgggt ctacagagtt cttgaagtgg tggcctaact 10080
acggctacac tagaaggaca gtatttggtt tctgcgctct gctgaagcca gttaccttcg 10140
gaaaaagagt tggtagctct tgatccggca aacaaaccac cgctggtagc ggtggttttt 10200
ttgtttgcaa gcagcagatt acgcgcagaa aaaaaggatc tcaagaagat cctttgatct 10260
tttctacggg gtctgacgct cagtggaaacg aaaactcacg ttaagggatt ttggtcatga 10320
gattatcaaa aaggatcttc acctagatcc ttttaaatta aaaatgaagt tttaaatcaa 10380
tctaaagtat atatgagtaa acttggtctg acagttacca atgcttaatc agtgaggcac 10440
ctatctcagc gatctgtcta tttcgttcat ccatagttgc ctgactcccc gtcgtgtaga 10500
taactacgat acgggagggc ttaccatctg gcccagtg gcgaatgata ccgcgagacc 10560
cacgctcacc ggctccagat ttatcagcaa taaaccagcc agccggaagg gccgagcgca 10620
gaagtgttcc tgcaacttta tccgcctcca tccagtctat taattgttgc cgggaagcta 10680
gagtaagtag ttccgcagtt aatagtttgc gcaacgttgt tgccattgct gcaggcatcg 10740
tgggtgtcacg ctgcgtcttt ggtatggctt cattcagctc cggttcccaa cgatcaaggc 10800
gagttacatg atcccccatg ttgtgcaaaa aagcggttag ctccctcggg cctccgatcg 10860
ttgtcagaag taagttggcc gcagtgttat cactcatggt tatggcagca ctgcataatt 10920
ctcttactgt catgccatcc gtaagatgct tttctgtgac tggtagtac tcaaccaagt 10980
cattctgaga atagtgtatg cggcgaccga gttgctcttg cccggcgta acacgggata 11040
ataccgcgcc acatagcaga actttaaaag tgctcatcat tggaaaacgt tcttcggggc 11100
gaaaactctc aaggatctta ccgctgttga gatccagttc gatgtaacct actcgtgcac 11160
ccaactgatc ttcagcatct tttactttca ccagcgttcc tgggtgagca aaaacaggaa 11220
ggcaaaatgc cgcaaaaaag ggaataaggg cgacacggaa atgttgaata ctcatactct 11280
tcctttttca atattattga agcatttatc agggttattg tctcatgagc ggatacatat 11340
ttgaatgtat ttagaaaaat aaacaaatag gggttccgcg cacatttccc cgaaaagtgc 11400
cacctgacgt ctaagaaacc attattatca tgacattaac ctataaaaat aggcgtatca 11460
cgaggccctt tcgtcttcaa gaattccat 11489

```

<210> 13

<211> 11526

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Vector pAC3-U6-PDL1-miR30ARNsh4

<400> 13

ES 2 779 149 T3

tagttattaa tagtaatcaa ttacggggtc attagttcat agcccatata tggagttccg	60
cgttacataa cttacggtaa atggcccgcc tggctgaccg cccaacgacc ccgcccatt	120
gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagt aacgccaata gggactttcc attgacgtca	180
atgggtggag tatttacggt aaactgccc cttggcagta catcaagtgt atcatatgcc	240
aagtacgccc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt atgccagta	300
catgacctta tgggactttc ctacttggca gtacatctac gtattagtca tcgctattac	360
catggtgatg cggttttggc agtacatcaa tgggcgtgga tagcggtttg actcacggg	420
atttccaagt ctccacccca ttgacgtcaa tgggagtttg ttttggcacc aaaatcaacg	480
ggactttcca aaatgtcgta acaactccgc ccattgacg caaatgggcg gtaggcgtgt	540
acggtgggag gtctatataa gcagagctgg tttagtgaac cggcgccagt cctccgattg	600
actgagtcgc ccgggtaccc gtgtatccaa taaaccctct tgcagttgca tccgacttgt	660
ggtctcgctg ttccttggga gggctcctc tgagtgattg actaccgctc agcgggggtc	720
tttcatttgg gggctcgcc gggatcggga gacccctgcc cagggaccac cgaccacca	780
ccgggaggta agctggccag caacttatct gtgtctgtcc gattgtctag tgtctatgac	840
tgattttatg cgcctgcgtc ggtactagtt agctaactag ctctgtatct ggcggaccgc	900
tgggtggaact gacgagttcg gaacacccgg ccgcaaccct gggagacgtc ccagggactt	960
cgggggccgt ttttgtggcc cgacctgagt ccaaaaatcc cgatcgtttt ggactctttg	1020
gtgcaccccc cttagaggag ggatatgtgg ttctggtagg agacgagaac ctaaaacagt	1080
tcccgccctc gtctgaattt ttgctttcgg tttgggaccg aagccgcgcc gcgcgtcttg	1140
tctgctgcag catcgttctg tgttgtctct gtctgactgt gtttctgtat ttgtctgaaa	1200
atatgggcca gactgttacc actcccttaa gtttgacctt aggtcactgg aaagatgtcg	1260
agcggatcgc tcacaaccag tcggtagatg tcaagaagag acgttgggtt accttctgct	1320
ctgcagaatg gccaaccttt aacgtcggat ggccgcgaga cggcaccttt aaccgagacc	1380
tcatcaccca ggttaagatc aaggtctttt cacctggccc gcatggacac ccagaccagg	1440
tcccctacat cgtgacctgg gaagccttgg cttttgaccc ccctccctgg gtcaagccct	1500
ttgtacaccc taagcctccg cctcctcttc ctccatccgc cccgtctctc ccccttgaac	1560
ctcctcgttc gaccccgcc ctgacctccc tttatccagc cctcactcct tctctaggcg	1620

ES 2 779 149 T3

cctaaaccta	acctcaagtt	ctttctgaca	gtggggggcc	gctcatcgac	ctacttacag	1680
aagaccccc	gccttatagg	gacccaagac	caccccttc	cgacagggac	ggaaatggtg	1740
gagaagcgac	ccctgcggga	gaggcaccgg	acccctcccc	aatggcatct	cgctacgtg	1800
ggagacggga	gccccctgtg	gccgactcca	ctacctcgca	ggcattcccc	ctccgcgcag	1860
gaggaaacgg	acagcttcaa	tactggccgt	tctcctcttc	tgacctttac	aactggaaaa	1920
ataataaccc	ttctttttct	gaagatccag	gtaaactgac	agctctgato	gagtctgtcc	1980
tcatacccca	tcagcccacc	tgggacgact	gtcagcagct	gttggggact	ctgctgaccg	2040
gagaagaaaa	acaacgggtg	ctcttagagg	ctagaaaggc	ggtgcggggc	gatgatgggc	2100
gccccactca	actgcccaat	gaagtcgatg	ccgcttttcc	cctcgagcgc	ccagactggg	2160
attacaccac	ccaggcaggt	aggaaccacc	tagtccacta	tcgccagttg	ctcctagcgg	2220
gtctccaaaa	cgcgggcaga	agccccacca	atttgcccaa	ggtaaaagga	ataacacaag	2280
ggcccaatga	gtctccctcg	gccttcctag	agagacttaa	ggaagcctat	cgcaggtaca	2340
ctccttatga	ccctgaggac	ccagggcaag	aaactaatgt	gtctatgtct	ttcatttggc	2400
agtctgcccc	agacattggg	agaaagttag	agaggttaga	agatttaaaa	aacaagacgc	2460
ttggagattt	ggttagagag	gcagaaaaga	tctttaataa	acgagaaaac	ccggaagaaa	2520
gagaggaacg	tatcaggaga	gaaacagagg	aaaaagaaga	acgccgtagg	acagaggatg	2580
agcagaaaaga	gaaagaaaga	gatcgtagga	gacatagaga	gatgagcaag	ctattggcca	2640
ctgtcgttag	tggaacagaa	caggatagac	agggaggaga	acgaaggagg	tcccaactcg	2700
atcgcgacca	gtgtgcctac	tgcaaaagaa	aggggcactg	ggctaaagat	tgtccaaga	2760
aaccacgagg	acctcgggga	ccaagacccc	agacctccct	cctgacccta	gatgactagg	2820
gaggtcaggg	tcaggagccc	ccccctgaac	ccaggataac	cctcaaagtc	ggggggcaac	2880
ccgtcacctt	cctggtagat	actggggccc	aacactccgt	gctgacccaa	aatcctggac	2940
ccctaagtga	taagtctgcc	tgggtccaag	gggctactgg	aggaaagcgg	tatcgctgga	3000
ccacggatcg	caaagtacat	ctagctaccg	gtaaggtcac	ccactcttct	ctccatgtac	3060
cagactgtcc	ctatcctctg	ttaggaagag	atttgctgac	taaactaaaa	gccc aaatcc	3120
actttgaggg	atcaggagcc	caggttatgg	gaccaatggg	gcagcccctg	caagtgttga	3180
ccctaaatat	agaagatgag	tatcggtac	atgagacctc	aaaagagcca	gatgtttctc	3240
taggggtccac	atggctgtct	gattttcctc	aggcctgggc	ggaaaccggg	ggcatgggac	3300
tggcagttcg	ccaagctcct	ctgatcatac	ctctgaaagc	aacctctacc	cccgtgtcca	3360
taaaaacaata	ccccatgtca	caagaagcca	gactggggat	caagccccac	atacagagac	3420
tgttggacca	gggaataactg	gtacctgccc	agtcacctcg	gaacacgccc	ctgctacccg	3480
ttaagaaacc	agggactaat	gattataggg	ctgtccagga	tctgagagaa	gtcaacaagc	3540

gggtggaaga catccacccc accgtgccca acccttacaa cctcttgagc gggctccac	3600
cgtcccacca gtggtacact gtgcttgatt taaaggatgc ctttttctgc ctgagactcc	3660
accccaccag tcagcctctc ttcgcctttg agtggagaga tccagagatg ggaatctcag	3720
gacaattgac ctggaccaga ctcccacagg gtttcaaaaa cagtcccacc ctgtttgatg	3780
aggcactgca cagagaccta gcagacttcc ggatccagca cccagacttg atcctgctac	3840
agtacgtgga tgacttactg ctggccgcca cttctgagct agactgcaa caaggtactc	3900
gggccctgtt acaaacccta gggaacctcg ggtatcgggc ctcgccaag aaagcccaa	3960
tttgccagaa acaggtcaag tatctggggt atcttctaaa agagggtcag agatggctga	4020
ctgaggccag aaaagagact gtgatggggc agcctactcc gaagaccct cgacaactaa	4080
gggagttcct agggacggca ggcttctgtc gcctctggat ccctgggttt gcagaaatgg	4140
cagccccctt gtaccctctc accaaaacgg ggactctgtt taattggggc ccagaccaac	4200
aaaaggccta tcaagaaatc aagcaagctc ttctaactgc cccagccctg gggttgccag	4260
at ttgactaa gccctttgaa ctctttgtcg acgagaagca gggctacgcc aaaggtgtcc	4320
taacgcaaaa actgggacct tggcgtcggc cgggtggccta cctgtccaaa aagctagacc	4380
cagtagcagc tgggtggccc ccttgccctac ggatggtagc agccattgcc gtactgacaa	4440
aggatgcagg caagctaacc atgggacagc cactagtcat tctggccccc catgcagtag	4500
aggcactagt caaacaaccc cccgaccgct ggctttccaa cgcccgatg actcactatc	4560
aggccttgct tttggacacg gaccgggtcc agttcggacc ggtggtagcc ctgaaccgg	4620
ctacgtgct cccactgcct gaggaagggc tgcaacacaa ctgccttgat atcctggccg	4680
aagcccacgg aacccgaccc gacctaacgg accagccgct cccagacgcc gaccacacct	4740
ggtacacgga tggaagcagt ctcttacaag agggacagcg taaggcggga gctgcggtga	4800
ccaccgagac cgaggtaatc tgggctaaag ccctgccagc cgggacatcc gctcagcggg	4860
ctgaactgat agcactcacc caggccctaa agatggcaga aggtaagaag ctaaatgttt	4920
atactgatag ccgttatgct tttgctactg cccatatcca tggagaaata tacagaaggc	4980
gtgggttgct cacatcagaa ggcaaagaga tcaaaaataa agacgagatc ttggccctac	5040
taaaagccct ctttctgccc aaaagactta gcataatcca ttgtccagga catcaaaagg	5100
gacacagcgc cgaggctaga ggcaaccgga tggctgacca agcggcccgga aaggcagcca	5160
tcacagagac tccagacacc tctaccctcc tcatagaaaa ttcacacccc tacacctcag	5220
aacattttca ttacacagt actgatataa aggacctaac caagttgggg gccatttatg	5280
ataaaacaaa gaagtattgg gtctaccaag gaaaacctgt gatgcctgac cagtttactt	5340
ttgaattatt agactttctt catcagctga ctcacctcag cttctcaaaa atgaaggctc	5400

ES 2 779 149 T3

tcctagagag	aagccacagt	ccctactaca	tgctgaaccg	ggatcgaaca	ctcaaaaata	5460
tcactgagac	ctgcaaagct	tgtgcacaag	tcaacgccag	caagtctgcc	gttaaacagg	5520
gaactagggg	ccgcgggcat	cggcccggca	ctcattggga	gatcgatttc	accgagataa	5580
agcccggatt	gtatggctat	aaatatcttc	tagtttttat	agataccttt	tctggctgga	5640
tagaagcctt	cccaaccaag	aaagaaaccg	ccaaggtcgt	aaccaagaag	ctactagagg	5700
agatcttccc	caggttcggc	atgcctcagg	tattgggaac	tgacaatggg	cctgccttcg	5760
tctccaaggt	gagtcagaca	gtggccgcat	tgttggggat	tgattggaaa	ttacattgtg	5820
catacagacc	ccaaagctca	ggccaggtag	aaagaatgaa	tagaaccatc	aaggagactt	5880
taactaaatt	aacgcttgca	actggctcta	gagactgggt	gctcctactc	cccttagccc	5940
tgtaccgagc	ccgcaacacg	ccgggcccc	atggcctcac	cccatatgag	atcttatatg	6000
gggcaccccc	gccccttgta	aacttccctg	accctgacat	gacaagagtt	actaacagcc	6060
cctctctcca	agctcactta	caggctctct	acttagtcca	gcacgaagtc	tggagacctc	6120
tggcggcagc	ctaccaagaa	caactggacc	gaccggtggt	acctcaccct	taccgagtcg	6180
gcgacacagt	gtgggtccgc	cgacaccaga	ctaagaacct	agaacctcgc	tggaaaggac	6240
cttacacagt	cctgctgacc	acccccaccg	ccctcaaagt	agacggcatc	gcagcttgga	6300
tacacgccgc	ccacgtgaag	gctgccgacc	ccgggggttg	accatcctct	agactgacat	6360
ggcgcggtta	acgctctcaa	aacccccctc	agataagatt	aacctgtgga	agcccttaat	6420
agtcatggga	gtcctgttag	gagtagggat	ggcagagagc	ccccatcagg	tctttaatgt	6480
aacctggaga	gtcaccaacc	tgatgactgg	gcgtaccgcc	aatgccacct	ccctcctggg	6540
aactgtacaa	gatgccttcc	caaaattata	ttttgatcta	tgtgatctgg	tcggagagga	6600
gtggggacct	tcagaccagg	aaccgtatgt	cgggtatggc	tgcaagtacc	ccgcaggagg	6660
acagcggacc	cggacttttg	acttttacgt	gtgccctggg	cataccgtaa	agtcgggggtg	6720
tgggggacca	ggagagggct	actgtggtaa	atgggggtgt	gaaaccaccg	gacaggctta	6780
ctggaagccc	acatcatcgt	gggacctaat	ctcccttaag	cgcggtaaca	ccccctggga	6840
cacgggatgc	tctaaagttg	cctgtggccc	ctgctacgac	ctctccaaag	tatccaattc	6900
cttccaaggg	gctactcgag	ggggcagatg	caaccctcta	gtcctagaat	tcactgatgc	6960
aggaaaaaag	gctaactggg	acgggcccac	atcgtgggga	ctgagactgt	accggacagg	7020
aacagatcct	attaccatgt	tctccctgac	ccggcaggtc	cttaatgtgg	gaccccgagt	7080
ccccataggg	cccaaccacg	tattaccoga	ccaaagactc	ccttcctcac	caatagagat	7140
tgtaccggct	ccacagccac	ctagccccct	caataccagt	tacccccctt	ccactaccag	7200
tacaccctca	acctccccta	caagtccaag	tgtcccacag	ccacccccag	gaactggaga	7260
tagactacta	gctctagtca	aaggagccta	tcaggcgctt	aacctcacca	atcccgacaa	7320

ES 2 779 149 T3

gaccaagaa tggtggctgt gcttagtgtc gggacctcct tattacgaag gagtagcgg	7380
cgtgggcact tataccaatc attccaccgc tccggccaac tgtacggcca cttcccaaca	7440
taagcttacc ctatctgaag tgacaggaca gggcctatgc atgggggcag tacctaaaac	7500
tcaccaggcc ttatgtaaca ccacccaaag cgccggctca ggatcctact accttgcagc	7560
acccgccgga acaatgtggg cttgcagcac tggattgact ccctgcttgt ccaccacgg	7620
gctcaatcta accacagatt attgtgtatt agttgaactc tggcccagag taatttacca	7680
ctccccgat tatatgtatg gtcagcttga acagcgtacc aaatataaaa gagagccagt	7740
atcattgacc ctggcccttc tactaggagg attaaccatg ggagggattg cagctggaat	7800
agggacgggg accactgcct taattaaaac ccagcagttt gagcagcttc atgccgctat	7860
ccagacagac ctcaacgaag tcgaaaagtc aattaccaac ctagaaaagt cactgacctc	7920
gttgtctgaa gtagtcctac agaaccgcag aggcctagat ttgctattcc taaaggagg	7980
aggtctctgc gcagccctaa aagaagaatg ttgtttttat gcagaccaca cggggctagt	8040
gagagacagc atggccaaat taagagaaag gcttaatcag agacaaaaac tatttgagac	8100
aggccaagga tggttcgaag ggctgtttaa tagatcccc tggtttacca ccttaatctc	8160
caccatcatg ggcactctaa tagtactctt actgatctta ctctttggac cttgcattct	8220
caatcgattg gtccaatttg ttaaagacag gatctcagtg gtccaggctc tggttttgac	8280
tcagacaatat caccagctaa aacctataga gtacgagcca tgaacgcgta aggtcgggca	8340
ggaagagggc ctatttccca tgattccttc atatttgcat atacgataca aggctgttag	8400
agagataatt agaattaatt tgactgtaaa cacaagata ttagtacaaa atacgtgacg	8460
tagaaagtaa taatttcttg ggtagtttgc agttttttaa attatgtttt aaaatggact	8520
atcatatgct taccgtaact tgaaagtatt tcgatttctt ggctttatat atcttgtgga	8580
aaggacgaaa caccgtgctc gcttcggcag cacatatact agtcgactag ggataacagg	8640
gtaattgttt gaatgaggct tcagtacttt acagaatcgt tgcctgcaca tcttggaac	8700
acttgctggg attacttctt caggttaacc caacagaagg ctcgagaagg tatattgctg	8760
ttgacagtga gcgcggtagc aatatgacaa ttgatagtga agccacagat gtatcaattg	8820
tcatatgtgt accatgccta ctgcctcgga attcaagggg ctactttagg agcaattatc	8880
ttgtttacta aaactgaata ctttgcctatc tctttgatac atttttaca agctgaatta	8940
aatgggtata aattaaatca cttttttcaa ttggaagact aatgcggcgg ccgcagataa	9000
aataaaagat tttatttagt ctccagaaaa aggggggaat gaaagacccc acctgtaggt	9060
ttggcaagct agcttaagta acgccatttt gcaaggcatg gaaaaatata taactgagaa	9120
tagagaagtt cagatcaagg tcaggaacag atggaacagc tgaatatggg ccaaacagga	9180

ES 2 779 149 T3

tatctgtggt aagcagttcc tgccccggct cagggccaag aacagatgga acagctgaat	9240
atgggccaaa caggatatct gtggttaagca gttcctgccc cggctcaggg ccaagaacag	9300
atggtcccca gatgcggtcc agccctcagc agtttctaga gaaccatcag atgtttccag	9360
ggtgccccaa ggacctgaaa tgacctgtg ccttatttga actaaccaat cagttcgctt	9420
ctcgcttctg ttcgcgcgct tctgctccc gagctcaata aaagagcca caaccctca	9480
ctcggggcgc cagtctccg attgactgag tcgcccgggt acccgtgtat ccaataaacc	9540
ctcttgagcgt tgcacccgac ttgtgtctc gctgttctt gggagggctt cctctgagt	9600
attgactacc cgtcagcggg ggtctttcat tacatgtgag caaaaggcca gcaaaaggcc	9660
aggaaccgta aaaaggccgc gttgctggcg tttttccata ggctccgccc ccctgacgag	9720
catcacaaaa atcgacgctc aagtcagagg tggcgaaacc cgacaggact ataaagatac	9780
caggcgtttc cccctggaag ctccctcgtg cgctctcctg ttccgaccct gccgcttacc	9840
ggatacctgt ccgcctttct cccttcggga agcgtggcgc tttctcatag ctacgctgt	9900
aggtatctca gttcgtgtga ggtcgttcgc tccaagctgg gctgtgtgca cgaaccccc	9960
gttcagcccg accgctgccc cttatccggt aactatcgtc ttgagtccaa cccggtaga	10020
cacgacttat cgccactggc agcagccact ggtaacagga ttagcagagc gaggtatgta	10080
ggcgtgtcta cagagttctt gaagtgggtg cctaactacg gctacactag aaggacagta	10140
tttggtatct gcgctctgct gaagccagtt accttcggaa aaagagttgg tagctcttga	10200
tccggcaaac aaaccaccgc tggtagcggg ggtttttttg tttgcaagca gcagattacg	10260
cgcagaaaaa aaggatctca agaagatcct ttgatctttt ctacggggtc tgacgctcag	10320
tggaaacgaaa actcacgtta agggattttg gtcatgagat tatcaaaaag gatcttcacc	10380
tagatccttt taaattaaaa atgaagtttt aaatcaatct aaagtatata tgagtaaact	10440
tggctctgaca gttaccaatg cttaatcagt gaggcaccta tctcagcgat ctgtctattt	10500
cgttcatcca tagttgcctg actcccgcgt gtgtagataa ctacgatacg ggagggctta	10560
ccatctggcc ccagtgtctc aatgataccg cgagaccac gctcaccggc tccagattta	10620
tcagcaataa accagccagc cggaagggcc gagcgagaa gtggtcctgc aactttatcc	10680
gcctccatcc agtctattaa ttgttgccgg gaagctagag taagtagttc gccagttaat	10740
agtttgcgca acgttggtgc cattgctgca ggcacgtgg tgtcacgctc gtcgtttggt	10800
atggttcat tcagctccg ttcccaacga tcaaggcgag ttacatgac ccccatgttg	10860
tgcaaaaaag cggttagctc cttcggctct ccgatcgttg tcagaagtaa gttggccgca	10920
gtgttatcac tcatggttat ggcagcactg cataattctc ttactgtcat gccatccgta	10980
agatgctttt ctgtgactgg tgagtactca accaagtcac tctgagaata gtgtatgcgg	11040
cgaccgagtt gctcttgccc ggcgtcaaca cgggataata ccgcgccaca tagcagaact	11100

ES 2 779 149 T3

```

ttaaagtg tcatcattgg aaacggtct tcggggcgaa aactctcaag gatcttaccg 11160
ctgttgagat ccagttcgat gtaaccact cgtgcacca actgatcttc agcatctttt 11220
actttacca gcgtttctgg gtgagcaaaa acaggaaggc aaaatgccgc aaaaaaggga 11280
ataagggcga cacggaaatg ttgaatactc atactcttcc tttttcaata ttattgaagc 11340
atztatcagg gttattgtct catgagcgga tacatatattg aatgtattta gaaaaataaa 11400
caaatagggg ttccgcgcac atttccccga aaagtgccac ctgacgtcta agaaaccatt 11460
attatcatga cattaaccta taaaaatagg cgtatcacga ggccctttcg tcttcaagaa 11520
ttccat 11526

```

<210> 14
 <211> 11528
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Vector pAC3-RSV-PDL1miR30ARNsh4

```

<400> 14
tagttattaa tagtaatcaa ttacggggtc attagttcat agcccatata tggagttccg 60
cgttacataa cttacggtaa atggcccgcc tggctgaccg cccaacgacc ccgcccatt 120
gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagt aacgccaata gggactttcc attgacgtca 180
atgggtggag tatttacggt aaactgccca cttggcagta catcaagtgt atcatatgcc 240
aagtagccc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt atgccagta 300
catgacctta tgggactttc ctacttgga gtacatctac gtattagtca tcgctattac 360
catggtgatg cgtttttggc agtacatcaa tgggcgtgga tagcggtttg actcacgggg 420
atttccaagt ctccacccca ttgacgtcaa tgggagtttg ttttggcacc aaaatcaacg 480
ggactttcca aaatgtcgta acaactccgc ccattgacg caaatgggcg gtaggcgtgt 540
acggtgggag gtctatataa gcagagctgg tttagtgaac cggcgccagt cctccgattg 600
actgagtcgc ccgggtaccc gtgtatcaa taaacctctc tgcagttgca tccgacttgt 660
ggtctcgctg ttccttggga ggtctcctc tgagtgattg actaccgctc agcgggggtc 720
tttcatttgg gggctcgtcc gggatcgga gaccctgcc cagggaccac cgaccacca 780
ccgggaggtg agctggccag caacttatct gtgtctgtcc gattgtctag tgtctatgac 840
tgattttatg cgctgcgtc ggtactagtt agctaactag ctctgtatct ggcggaaccg 900
tgggtggaact gacgagttcg gaacaccggc ccgcaaccct gggagacgtc ccagggactt 960
cgggggcccgt ttttgtggcc cgacctgagt ccaaaaatcc cgatcgtttt ggactctttg 1020
gtgcaccccc cttagaggag ggatatgtgg ttctggtagg agacgagaac ctaaacagt 1080

```

tcccgcctcc	gtctgaatth	ttgctttcgg	tttgggaccg	aagccgcgcc	gcgcgtcttg	1140
tctgctgcag	catcgthctg	tgthgtctct	gtctgactgt	gtthctgtat	ttgtctgaaa	1200
atatggggcca	gactgttacc	actcccttaa	gtttgacctt	aggtcactgg	aaagatgtcg	1260
agcggatcgc	tcacaaccag	tcggtagatg	tcaagaagag	acgttgggtt	accttctgct	1320
ctgcagaatg	gccaacctth	aacgtcggat	ggccgcgaga	cggcacctth	aaccgagacc	1380
tcatcaccca	ggttaagatc	aaggtcttht	cacctggccc	gcatggacac	ccagaccagg	1440
tcccctacat	cgtgacctgg	gaagccttgg	ctthtgacct	ccctccctgg	gtcaagccct	1500
ttgtacacct	taagcctccg	cctcctcttc	ctccatccgc	ccgtctcttc	ccccttgaac	1560
ctcctcgttc	gaccccgctt	cgtcctcttc	tttatccagc	cctcactcct	tctctaggcg	1620
ccaaacctaa	acctcaagtt	ctthctgaca	gtggggggcc	gctcatcgac	ctacttacag	1680
aagaccccc	gccttatagg	gacccaagac	caccccttcc	cgacagggac	ggaaatggtg	1740
gagaagcgac	ccctgcggga	gaggcacccg	acccctcccc	aatggcatct	cgcctacgtg	1800
ggagacggga	gccccctgtg	gccgactcca	ctacctcgca	ggcattcccc	ctccgcgcag	1860
gaggaaacgg	acagcttcaa	tactggccgt	tctcctcttc	tgacctttac	aactggaaaa	1920
ataataacct	ttctthttct	gaagatccag	gtaaactgac	agctctgata	gagtctgtcc	1980
tcatcaccca	tcagcccacc	tgggacgact	gtcagcagct	gttggggact	ctgctgaccg	2040
gagaagaaaa	acaacgggtg	ctcttagagg	ctagaaaggc	ggtgcggggc	gatgatgggc	2100
gccccactca	actgccaat	gaagtcgatg	ccgctthtcc	cctcgagcgc	ccagactggg	2160
attacaccac	ccaggcaggt	aggaaccacc	tagtccacta	tcgccagttg	ctcctagcgg	2220
gtctccaaaa	cgcgggcaga	agccccacca	atttgcccaa	ggtaaaagga	ataacacaag	2280
ggcccaatga	gtctccctcg	gccttcctag	agagacttaa	ggaagcctat	cgcagggtaca	2340
ctccttatga	ccctgaggac	ccagggcaag	aaactaatgt	gtctatgtct	ttcatttggc	2400
agtctgcccc	agacattggg	agaaagttag	agaggttaga	agatttaaaa	aacaagacgc	2460
ttggagatth	ggttagagag	gcagaaaaga	tctttaataa	acgagaaaac	ccggaagaaa	2520
gagaggaacg	tatcaggaga	gaaacagagg	aaaaagaaga	acgccgtagg	acagaggatg	2580
agcagaaaaga	gaaagaaaaga	gatcgtagga	gacatagaga	gatgagcaag	ctattggcca	2640
ctgtcgttag	tggacagaaa	caggatagac	agggaggaga	acgaaggagg	tcccaactcg	2700
atcgcgacca	gtgtgcctac	tgcaaaagaa	aggggcaactg	ggctaaagat	tgtcccaaga	2760
aaccacgagg	acctcgggga	ccaagacccc	agacctccct	cctgacccta	gatgactagg	2820
gaggtcaggg	tcaggagccc	ccccctgaac	ccaggataac	cctcaaagtc	ggggggcaac	2880
ccgtcacctt	cctggttagat	actggggccc	aacactccgt	gctgacccaa	aatcctggac	2940
ccctaagtga	taagtctgcc	tgggtccaag	gggctactgg	aggaaagcgg	tatcgctgga	3000

ccacggatcg caaagtacat ctagctaccg gtaaggtcac ccactctttc ctccatgtac	3060
cagactgtcc ctatcctctg ttaggaagag atttgtctgac taaactaaaa gcccaaatcc	3120
actttgaggg atcaggagcc caggttatgg gaccaatggg gcagcccctg caagtgttga	3180
ccctaaatat agaagatgag tatcggctac atgagacctc aaaagagcca gatgtttctc	3240
tagggctccac atggctgtct gattttctctc aggcctgggc ggaaaccggg ggcattgggac	3300
tggcagttcg ccaagctcct ctgatcatac ctctgaaagc aacctctacc cccgtgtcca	3360
taaaacaata ccccatgtca caagaagcca gactggggat caagccccac atacagagac	3420
tgttggaaca gggaatactg gtaccctgcc agtccccctg gaacacgccc ctgctaccog	3480
ttaagaaacc agggactaat gattataggc ctgtccagga tctgagagaa gtcaacaagc	3540
gggtggaaga catccacccc accgtgccca acccttaca cctcttgagc gggctccccac	3600
cgtcccacca gtggtacact gtgcttgatt taaaggatgc ctttttctgc ctgagactcc	3660
accccaccag tcagcctctc ttgccttttg agtggagaga tccagagatg ggaatctcag	3720
gacaattgac ctggaccaga ctcccacagg gtttcaaaaa cagtcccacc ctgtttgatg	3780
aggcactgca cagagaccta gcagacttcc ggatccagca cccagacttg atcctgctac	3840
agtacgtgga tgacttactg ctggccgcca cttctgagct agactgcaa caaggtactc	3900
gggccctgtt acaaacccta gggaacctcg ggtatcgggc ctcgccaag aaagcccaaa	3960
tttgccagaa acaggtcaag tatctggggt atcttctaaa agagggtcag agatggctga	4020
ctgaggccag aaaagagact gtgatggggc agcctactcc gaagaccctc cgacaactaa	4080
gggagttcct agggacggca ggcttctgtc gcctctggat ccctgggttt gcagaaatgg	4140
cagccccctt gtaccctctc accaaaacgg ggactctgtt taattggggc ccagaccaac	4200
aaaaggccta tcaagaaatc aagcaagctc ttctaactgc cccagccctg gggttgccag	4260
at ttgactaa gccctttgaa ctctttgtcg acgagaagca gggctacgcc aaaggtgtcc	4320
taacgcaaaa actgggacct tggcgtcggc cgggtggccta cctgtccaaa aagctagacc	4380
cagtagcagc tgggtggccc cttgcctac ggatggtagc agccattgcc gtactgacaa	4440
aggatgcagg caagctaacc atgggacagc cactagtcat tctggcccc catgcagtag	4500
aggcactagt caaacaaccc cccgaccgct ggctttccaa cgcccgatg actcactatc	4560
aggccttgct tttggacagc gaccgggtcc agttcggacc ggtggtagcc ctgaaccgg	4620
ctacgtgct cccactgcct gaggaagggc tgcaacacaa ctgccttgat atcctggcgg	4680
aagcccacgg aaccgcaccc gacctaacgg accagccgct cccagacgcc gaccacacct	4740
ggtacacgga tggaagcagt ctcttacaag agggacagcg taaggcggga gctgcggtga	4800
ccaccgagac cgaggtaatc tgggctaaag ccctgccagc cgggacatcc gctcagcggg	4860

ES 2 779 149 T3

ctgaactgat	agcactcacc	caggccctaa	agatggcaga	aggtaagaag	ctaaatgttt	4920
atactgatag	ccgttatgct	tttgctactg	cccataatcca	tggagaaata	tacagaaggc	4980
gtgggttgct	cacatcagaa	ggcaaagaga	tcaaaaataa	agacgagatc	ttggccctac	5040
taaaagccct	ctttctgccc	aaaagactta	gcataatcca	ttgtccagga	catcaaaagg	5100
gacacagcgc	cgaggctaga	ggcaaccgga	tggctgacca	agcggcccga	aaggcagcca	5160
tcacagagac	tccagacacc	tctaccctcc	tcatagaaaa	ttcatcacco	tacacctcag	5220
aacattttca	ttacacagt	actgatataa	aggacctaac	caagttgggg	gccatttatg	5280
ataaaacaaa	gaagtattgg	gtctaccaag	gaaaacctgt	gatgcctgac	cagtttactt	5340
ttgaattatt	agactttctt	catcagctga	ctcacctcag	cttctcaaaa	atgaaggctc	5400
tcctagagag	aagccacagt	ccctactaca	tgctgaaccg	ggatcgaaca	ctcaaaaata	5460
tcactgagac	ctgcaaagct	tgtgcacaag	tcaacgccag	caagtctgcc	gttaaacagg	5520
gaactaggg	ccgcgggcat	cggcccgga	ctcattggga	gatcgatttc	accgagataa	5580
agcccggtt	gtatggctat	aaatatcttc	tagtttttat	agataccttt	tctggctgga	5640
tagaagcctt	cccaaccaag	aaagaaaccg	ccaaggtcgt	aaccaagaag	ctactagagg	5700
agatcttccc	caggttcggc	atgcctcagg	tattgggaac	tgacaatggg	cctgccttcg	5760
tctccaaggt	gagtcagaca	gtggccgatc	tgttggggat	tgattgaaa	ttacattgtg	5820
catacagacc	ccaaagctca	ggccaggtag	aaagaatgaa	tagaaccatc	aaggagactt	5880
taactaaatt	aacgcttgca	actggctcta	gagactgggt	gctcctactc	cccttagccc	5940
tgtaccgagc	ccgcaacacg	ccgggcccc	atggcctcac	cccatatgag	atcttatatg	6000
gggcaccccc	gccccttgta	aacttccctg	accctgacat	gacaagagtt	actaacagcc	6060
cctctctcca	agctcactta	caggctctct	acttagtcca	gcacgaagtc	tggagacctc	6120
tggcggcagc	ctaccaagaa	caactggacc	gaccggtggt	acctcaccct	taccgagtcg	6180
gcgacacagt	gtgggtccgc	cgacaccaga	ctaagaacct	agaacctcgc	tggaaaggac	6240
cttacacagt	cctgctgacc	acccccaccg	ccctcaaagt	agacggcatc	gcagcttga	6300
tacacgccgc	ccacgtgaag	gctgccgacc	ccgggggtgg	accatcctct	agactgacat	6360
ggcgcgttca	acgctctcaa	aacccctca	agataagatt	aacccgtgga	agcccttaat	6420
agtcattggga	gtcctgttag	gagtagggat	ggcagagagc	ccccatcagg	tctttaatgt	6480
aacctggaga	gtcaccaacc	tgatgactgg	gcgtaccgcc	aatgccacct	ccctcctggg	6540
aactgtacaa	gatgccttcc	caaaattata	ttttgatcta	tgtgatctgg	tcggagagga	6600
gtgggaccct	tcagaccagg	aaccgtatgt	cgggtatggc	tgcaagtacc	ccgcagggag	6660
acagcggacc	cggacttttg	acttttacgt	gtgccctggg	cataccgtaa	agtcgggggtg	6720
tgggggacca	ggagagggct	actgtggtaa	atgggggtgt	gaaaccaccg	gacaggctta	6780

ES 2 779 149 T3

ctggaagccc acatcatcgt gggacctaata ctcccttaag cgcggttaaca ccccttgga	6840
cacgggatgc tctaaagttg cctgtggccc ctgctacgac ctctccaaag tatccaattc	6900
cttccaaggg gctactcgag ggggcagatg caaccctcta gtcctagaat tcaactgatgc	6960
aggaaaaaag gctaactggg acgggcccaa atcgtgggga ctgagactgt accggacagg	7020
aacagatcct attaccatgt tctccctgac cgggcaggtc cttaaatgtgg gaccccgagt	7080
ccccataggg cccaaccag tattaccga ccaaagactc ccttcctcac caatagagat	7140
tgtaccggct ccacagccac ctagcccct caataccagt taccctcctt ccactaccag	7200
tacacctca acctccccta caagtccaag tgtcccacag ccacccccag gaactggaga	7260
tagactacta gctctagtca aaggagccta tcaggcgctt aacctacca atcccgacaa	7320
gaccaagaag tggtggctgt gcttagtgtc gggacctcct tattacgaag gagtagcgg	7380
cgtgggcact tataccaatc attccaccgc tccggccaac tgtacggcca cttcccaaca	7440
taagcttacc ctatctgaag tgacaggaca gggcctatgc atgggggcag tacctaaaac	7500
tcaccaggcc ttatgtaaca ccacccaaag cgccggctca ggatcctact accttgacgc	7560
accgcgcgga acaatgtggg cttgcagcac tggattgact ccctgcttgt ccaccacgg	7620
gctcaatcta accacagatt attgtgtatt agttgaactc tggcccagag taatttacca	7680
ctccccgat tatatgtatg gtcagcttga acagcgtacc aaatataaaa gagagccagt	7740
atcattgacc ctggcccttc tactaggagg attaaccatg ggagggattg cagctggaat	7800
agggacgggg accactgcct taattaaaac ccagcagttt gagcagcttc atgccgctat	7860
ccagacagac ctcaacgaag tcgaaaagtc aattaccaac ctagaaaagt cactgacctc	7920
gttgtctgaa gtagtcctac agaaccgcag aggcctagat ttgctattcc taaaggagg	7980
aggtctctgc gcagccctaa aagaagaatg ttgtttttat gcagaccaca cggggctagt	8040
gagagacagc atggccaaat taagagaaag gcttaatcag agacaaaaac tatttgagac	8100
aggccaagga tgggtcgaag ggctgtttaa tagatcccc tggtttacca ccttaatctc	8160
caccatcatg ggacctctaa tagtactctt actgatctta ctctttggac cttgcattct	8220
caatcgattg gtccaatttg ttaaagacag gatctcagtg gtccaggctc tggttttgac	8280
tcagcaatat caccagctaa aaccataga gtacgagcca tgaacgcgta atgtagtctt	8340
atgcaatact cttgtagtct tgcaacatgg taacgatgag ttagcaacat gccttacaag	8400
gagagaaaaa gcaccgtgca tgccgattgg tggaagtaag gtggtacgat cgtgccttat	8460
taggaaggca acagacgggt ctgacatgga ttggacgaac cactgaattc cgcattgcag	8520
agatattgta ttttaagtgc tagctcgata caataaacgc catttgacca ttcaccacat	8580
tgggtgtgcac cggatcctgc tcgcttcggc agcacatata ctagtcgact agggataaca	8640

ES 2 779 149 T3

gggtaattgt ttgaatgagg cttcagtact ttacagaatc gttgcctgca catcttgaa	8700
acacttgctg ggattacttc ttcaggttaa cccaacagaa ggctcgagaa ggtatattgc	8760
tgttgacagt gagcgcggtta gcaatatgac aattgatagt gaagccacag atgtatcaat	8820
tgtcatattg ctaccatgcc tactgcctcg gaattcaagg ggctacttta ggagcaatta	8880
tcttgtttac taaaactgaa taccttgcta tctctttgat acatttttac aaagctgaat	8940
taaaatggta taaattaaat cacttttttc aattggaaga ctaatgcggc ggccgcagat	9000
aaaataaaag attttattta gtctccagaa aaagggggga atgaaagacc ccacctgtag	9060
gtttggcaag ctagcttaag taacgccatt ttgcaaggca tggaaaaata cataactgag	9120
aatagagaag ttcagatcaa ggtcaggaac agatggaaca gctgaatatg ggccaaacag	9180
gatatctgtg gtaagcagtt cctgccccgg ctcagggccca agaacagatg gaacagctga	9240
atatgggccca aacaggatat ctgtggttaag cagttcctgc ccgggctcag ggccaagaac	9300
agatgggtccc cagatgcggg ccagccctca gcagtttcta gagaaccatc agatgtttcc	9360
aggggtgcccc aaggacctga aatgacctg tgccttattt gaactaacca atcagttcgc	9420
ttctcgcttc tgttcgcgcg cttctgctcc ccgagctcaa taaaagagcc cacaaccct	9480
cactcggggc gccagtcctc cgattgactg agtcgccccg gtaccctgt atccaataaa	9540
ccctcttgca gttgcatccg acttggtggtc tcgctgttcc ttgggagggg ctccctctgag	9600
tgattgacta ccgctcagcg ggggtctttc attacatgtg agcaaaaggc cagcaaaagg	9660
ccaggaaccg taaaaaggcc gcgttgctgg cgtttttcca taggctccgc cccctgacg	9720
agcatcacia aaatcgacgc tcaagtcaga ggtggcgaaa ccgacagga ctataaagat	9780
accaggcggt tccccctgga agctccctcg tgcgctctcc tgttccgacc ctgccgctta	9840
ccggatacct gtccgccttt ctccttcgg gaagcggtgc gctttctcat agctcacgct	9900
gtaggtatct cagttcggtg taggtcggtc gctccaagct gggctgtgtg cacgaacccc	9960
ccgttcagcc cgaccgctgc gccttatccg gtaactatcg tcttgagtcc aaccggtaa	10020
gacacgactt atcgccactg gcagcagcca ctggtaacag gattagcaga gcgaggtatg	10080
taggcggtgc tacagagttc ttgaagtggg ggcctaacta cggctacact agaaggacag	10140
tatttggtat ctgcgctctg ctgaagccag ttaccttcgg aaaaagagtt ggtagctctt	10200
gatccggcaa acaaaccacc gctggtagcg tggtttttt tgtttgcaag cagcagatta	10260
cgcgcagaaa aaaaggatct caagaagatc ctttgatctt ttctacggg tctgacgctc	10320
agtggaacga aaactcacgt taagggatct tggtcatgag attatcaaaa aggatcttca	10380
cctagatcct tttaaattaa aaatgaagtt ttaaataaat cttaaagtata tatgagtaaa	10440
cttggtctga cagttaccaa tgcttaatca gtgaggcacc tatctcagcg atctgtctat	10500
ttcgttcatc catagttgcc tgactccccg tcgtgtagat aactacgata cgggagggct	10560

ES 2 779 149 T3

taccatctgg	ccccagtgct	gcaatgatac	cgcgagaccc	acgctcaccg	gctccagatt	10620
tatcagcaat	aaaccagcca	gccggaagg	ccgagcgag	aagtggcct	gcaactttat	10680
ccgcctccat	ccagtctatt	aattgttgcc	gggaagctag	agtaagtagt	tcgccagtta	10740
atagtttgcg	caacgttggt	gccattgtg	caggcatcgt	ggtgtcacgc	tcgtcgtttg	10800
gtatggcttc	attcagctcc	ggttcccaac	gatcaaggcg	agttacatga	tccccatgt	10860
tgtgcaaaaa	agcggttagc	tccttcggtc	ctccgatcgt	tgtcagaagt	aagttggccg	10920
cagtgttatc	actcatgggt	atggcagcac	tgcataattc	tcttactgtc	atgccatccg	10980
taagatgctt	ttctgtgact	ggtgagtact	caaccaagtc	attctgagaa	tagtgtatgc	11040
ggcgaccgag	ttgctcttgc	ccggcgtaa	cacgggataa	taccgcgcca	catagcagaa	11100
ctttaaaagt	gctcatcatt	ggaaaacgtt	cttcggggcg	aaaactctca	aggatcttac	11160
cgctgttgag	atccagttcg	atgtaaccca	ctcgtgcacc	caactgatct	tcagcatctt	11220
ttactttcac	cagcgtttct	gggtgagcaa	aaacaggaag	gcaaaatgcc	gcaaaaaagg	11280
gaataagggc	gacacggaaa	tgttgaatac	tcatactctt	cctttttcaa	tattattgaa	11340
gcatttatca	gggttattgt	ctcatgagcg	gatacatatt	tgaatgtatt	tagaaaaata	11400
aacaaatagg	ggttccgcgc	acatttcccc	gaaaagtgcc	acctgacgtc	taagaaacca	11460
ttattatcat	gacattaacc	tataaaaata	ggcgtatcac	gaggcccttt	cgtcttcaag	11520
aattccat						11528

<210> 15
 <211> 12008
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Vector pAC3-RSV-yCD2-PDL1miR30ARNsh4

<400> 15						
tagttattaa	tagtaatcaa	ttacggggtc	attagttcat	agcccatata	tggagttccg	60
cgttacataa	cttacggtaa	atggcccgcc	tggctgaccg	cccaacgacc	ccgcccatt	120
gacgtcaata	atgacgtatg	ttcccatagt	aacgccaata	gggactttcc	attgacgtca	180
atgggtggag	tatttacggt	aaactgccca	cttggcagta	catcaagtgt	atcatatgcc	240
aagtacgccc	cctattgacg	tcaatgacgg	taaatggccc	gcctggcatt	atgccagta	300
catgacctta	tgggactttc	ctacttgga	gtacatctac	gtattagtca	tcgctattac	360
catggtgatg	cggttttggc	agtacatcaa	tgggcgtgga	tagcggtttg	actcacgggg	420
atttccaagt	ctccacccca	ttgacgtcaa	tgggagtttg	ttttggcacc	aaaatcaacg	480
ggactttcca	aaatgtcgta	acaactccgc	cccattgacg	caaatgggcg	gtaggcgtgt	540

ES 2 779 149 T3

acggtgggag gtctatataa gcagagctgg tttagtgaac cggcgccagt cctccgattg	600
actgagtcgc ccgggtaccc gtgtatccaa taaacctct tgcagttgca tccgacttgt	660
gggtctcgctg ttccttggga ggggtctctc tgagtgattg actaccgctc agcgggggtc	720
tttcatttgg gggctcgtcc gggatcggga gacctctgcc cagggaccac cgaccacca	780
ccgggaggta agctggccag caacttatct gtgtctgtcc gattgtctag tgtctatgac	840
tgattttatg cgctcgctc ggtactagtt agctaactag ctctgtatct ggcggaccgc	900
tggtggaact gacgagttcg gaacacccgg ccgcaacctc gggagacgtc ccagggaactt	960
cggggggcgt ttttgtggcc cgacctgagt ccaaaaatcc cgatcgtttt ggactctttg	1020
gtgcaccccc cttagaggag ggatagtggg ttctggtagg agacgagaac ctaaaacagt	1080
tccgcctcc gtctgaattt ttgcttctgg tttgggaccg aagccgcgcc gcgcgtcttg	1140
tctgtcgcag catcgttctg tgttgtctct gtctgactgt gtttctgtat ttgtctgaaa	1200
atatgggcca gactgttacc actcccttaa gtttgacctt aggtcactgg aaagatgtcg	1260
agcggatcgc tcacaaccag tcggtagatg tcaagaagag acgttgggtt accttctgct	1320
ctgcagaatg gccaaccttt aacgtcggat ggccgcgaga cggcaccttt aaccgagacc	1380
tcatacccca ggttaagatc aaggtctttt cacctggccc gcatggacac ccagaccagg	1440
tccctacat cgtgacctgg gaagccttgg cttttgacct ccctccctgg gtcaagccct	1500
ttgtacacct taagcctccg cctcctcttc ctccatccgc ccctctctc ccccttgaa	1560
ctcctcgttc gaccccgct cgatcctccc tttatccagc cctcactcct tctctaggcg	1620
ccaaacctaa acctcaagtt ctttctgaca gtggggggcc gctcatcgac ctacttacag	1680
aagaccccc gccttatagg gacccaagac caccctctc cgacagggac ggaaatggtg	1740
gagaagcgac ccctcgggga gaggcaccgg acccctcccc aatggcatct cgcctacgtg	1800
ggagacggga gcccctgtg gccgactcca ctacctcgca ggcattcccc ctccgcgcag	1860
gaggaaacgg acagcttcaa tactggccgt tctcctcttc tgacctttac aactggaaaa	1920
ataataacct ttctttttct gaagatccag gtaaaactgac agctctgac gagtctgtcc	1980
tcatacccca tcagcccacc tgggacgact gtcagcagct gttggggact ctgctgaccg	2040
gagaagaaaa acaacgggtg ctcttagagg ctagaaaggc ggtgcggggc gatgatgggc	2100
gccccactca actgccaat gaagtcgatg ccgcttttcc cctcgagcgc ccagactggg	2160
attacaccac ccaggcagggt aggaaccacc tagtccacta tcgccagttg ctccctagcg	2220
gtctccaaaa cgcgggcaga agccccacca atttgccaa ggtaaaagga ataacacaag	2280
ggcccaatga gtctccctcg gccttcctag agagacttaa ggaagcctat cgcagggtaca	2340
ctccttatga ccctgaggac ccagggaag aaactaatgt gtctatgtct ttcatttggc	2400
agtctgcccc agacattggg agaaagttag agaggtaga agatttaaaa aacaagacgc	2460

ES 2 779 149 T3

ttggagattt ggtagagag gcagaaaaga tctttaataa acgagaaacc ccggaagaaa	2520
gagaggaacg tatcaggaga gaaacagagg aaaaagaaga acgccgtagg acagaggatg	2580
agcagaaaga gaaagaaaaga gatcgtagga gacatagaga gatgagcaag ctattggcca	2640
ctgtcgttag tggacagaaa caggatagac agggaggaga acgaaggagg tcccaactcg	2700
atcgcgacca gtgtgcctac tgcaaagaaa aggggcactg ggctaaagat tgtccaaga	2760
aaccacgagg acctcgggga ccaagacccc agacctccct cctgacccta gatgactagg	2820
gaggtcaggg tcaggagccc cccctgaac ccaggataac cctcaaagtc ggggggcaac	2880
ccgtcacctt cctggtagat actggggccc aacctccgt gctgacccaa aatcctggac	2940
ccctaagtga taagtctgcc tgggtccaag gggctactgg aggaaagcgg tatcgctgga	3000
ccacggatcg caaagtacat ctagctaccg gtaaggtcac ccactcttct ctccatgtac	3060
cagactgtcc ctatcctctg ttaggaagag atttgtgac taaactaaaa gcccaatcc	3120
actttgaggg atcaggagcc caggttatgg gaccaatggg gcagcccctg caagtgttga	3180
ccctaaatat agaagatgag tatcggctac atgagacctc aaaagagcca gatgtttctc	3240
tagggtcac atggctgtct gattttctct aggcctgggc ggaaccggg ggcatgggac	3300
tggcagttcg ccaagctcct ctgatcatac ctctgaaagc aacctctacc cccgtgtcca	3360
taaaacaata ccccatgtca caagaagcca gactggggat caagccccac atacagagac	3420
tgttggaacca gggaatactg gtaccctgcc agtccccctg gaacacgccc ctgctaccgg	3480
ttaagaaacc agggactaat gattataggc ctgtccagga tctgagagaa gtcaacaagc	3540
gggtggaaga catccacccc accgtgccca acccttataa cctcttgagc gggctccac	3600
cgtcccacca gtggtacact gtgcttgatt taaaggatgc ctttttctgc ctgagactcc	3660
accccaccag tcagcctctc ttgcctttg agtgagagaga tccagagatg ggaatctcag	3720
gacaattgac ctggaccaga ctcccacagg gtttcaaaaa cagtcccacc ctgtttgatg	3780
aggcactgca cagagaccta gcagacttcc ggatccagca cccagacttg atcctgctac	3840
agtacgtgga tgacttactg ctggccgcca cttctgagct agactgcca caaggtactc	3900
gggccctggt acaaacccta gggaacctcg ggtatcgggc ctcgccaag aaagcccaa	3960
tttgccagaa acaggtcaag tatctggggt atcttctaaa agagggtcag agatggctga	4020
ctgaggccag aaaagagact gtgatggggc agcctactcc gaagaccct cgacaactaa	4080
gggagttcct agggacggca ggctctgtc gcctctggat ccctgggttt gcagaaatgg	4140
cagccccctt gtaccctctc accaaaacgg ggactctgtt taattggggc ccagaccaac	4200
aaaaggccta tcaagaaatc aagcaagctc ttctaactgc cccagccctg gggttgccag	4260
atgtgactaa gccctttgaa ctctttgtcg acgagaagca gggctacgcc aaaggtgtcc	4320

ES 2 779 149 T3

taacgcaaaa actgggacct tggcgtcggc cggtaggccta cctgtccaaa aagctagacc	4380
cagtagcagc tgggtggccc ccttgccctac ggatggtagc agccattgcc gtactgacaa	4440
aggatgcagg caagctaacc atgggacagc cactagtcat tctggccccc catgcagtag	4500
aggcactagt caaacaaccc cccgaccgct ggctttccaa cgcccggatg actcactatc	4560
aggccttgct tttggacacg gaccgggtcc agttcggacc ggtggtagcc ctgaaccggg	4620
ctacgctgct cccactgcct gaggaagggc tgcaacacaa ctgccttgat atcctggccg	4680
aagcccacgg aaccggaccc gacctaacgg accagccgct cccagacgcc gaccacacct	4740
ggtacacgga tggaagcagt ctcttacaag agggacagcg taaggcggga gctgcgggtga	4800
ccaccgagac cgaggtaatc tgggctaaag ccctgccagc cgggacatcc gctcagcggg	4860
ctgaactgat agcactcacc caggccctaa agatggcaga aggtagaag ctaaagtgtt	4920
atactgatag ccgttatgct tttgctactg cccatatcca tggagaaata tacagaaggc	4980
gtgggttgct cacatcagaa ggcaagaga tcaaaaataa agacgagatc ttggccctac	5040
taaaagccct ctttctgccc aaaagactta gcataatcca ttgtccagga catcaaaagg	5100
gacacagcgc cgaggctaga ggcaaccgga tggctgacca agcggcccgga aaggcagcca	5160
tcacagagac tccagacacc tctaccctcc tcatagaaaa ttcatcaccc tacacctcag	5220
aacattttca ttacacagtg actgatataa aggacctaac caagttgggg gccatttatg	5280
ataaaacaaa gaagtattgg gtctaccaag gaaaacctgt gatgcctgac cagtttactt	5340
ttgaattatt agactttctt catcagctga ctcacctcag cttctcaaaa atgaaggctc	5400
tcctagagag aagccacagt ccctactaca tgctgaaccg ggatcgaaca ctcaaaaata	5460
tcactgagac ctgcaaagct tgtgcacaag tcaacgccag caagtctgcc gttaaacagg	5520
gaactagggg ccgcgggcat cggcccgga ctcatggga gatcgatttc accgagataa	5580
agcccggatt gtatggctat aaatatcttc tagtttttat agataccttt tctggctgga	5640
tagaagcctt cccaaccaag aaagaaaccg ccaaggtcgt aaccaagaag ctactagagg	5700
agatcttccc caggttcggc atgcctcagg tattgggaac tgacaatggg cctgccttcg	5760
tctccaaggt gagtcagaca gtggccgac tgttggggat tgattggaaa ttacattgtg	5820
catacagacc ccaaagctca ggccaggtag aaagaatgaa tagaaccatc aaggagactt	5880
taactaaatt aacgcttgca actggctcta gagactgggt gctcctactc cccttagccc	5940
tgtaccgagc ccgcaacacg ccgggcccc atggcctcac cccatatgag atcttatatg	6000
gggcaccccc gcccttgta aacttcctg accctgacat gacaagagtt actaacagcc	6060
cctctctcca agctcactta caggctctct acttagtcca gcacgaagtc tggagacctc	6120
tggcggcagc ctaccaagaa caactggacc gaccgggtgt acctcaccct taccgagtcg	6180
gcgacacagt gtgggtccgc cgacaccaga ctaagaacct agaacctcgc tggaaaggac	6240

ES 2 779 149 T3

cttacacagt cctgctgacc acccccaccg ccctcaaagt agacggcatc gcagcttgga	6300
tacacgccgc ccacgtgaag gctgccgacc cgggggtgg accatcctct agactgacat	6360
ggcgcgttca acgctctcaa aaccacctca agataagatt aaccctgga agcccttaat	6420
agtcattgga gtcctgttag gactagggat ggcagagagc ccccatcagg tctttaatgt	6480
aacctggaga gtcaccaacc tgatgactgg gcgtaccgcc aatgccacct ccctcctggg	6540
aactgtacaa gatgccttcc caaaattata ttttgatcta tgtgatctgg tcggagagga	6600
gtgggacctt tcagaccagg aaccgtatgt cgggtatggc tgcaagtacc ccgcaggag	6660
acagcggacc cggacttttg acttttacgt gtgccctggg cataccgtaa agtcgggggtg	6720
tgggggacca ggagagggt actgtggtaa atgggggtgt gaaaccaccg gacaggctta	6780
ctggaagccc acatcatcgt gggacctaat ctcccttaag cgcggtaaca cccctgga	6840
cacgggatgc tctaaagttg cctgtggccc ctgctacgac ctctccaaag tatccaattc	6900
cttccaaggg gctactcgag ggggcagatg caaccctcta gtcctagaat tcaactgatgc	6960
aggaaaaaag gctaactggg acgggcccac atcgtgggga ctgagactgt accggacagg	7020
aacagatcct attaccatgt tctccctgac ccggcaggtc cttaatgtgg gaccccgagt	7080
ccccataggg cccaaccag tattaccga ccaaagactc ccttcctcac caatagagat	7140
tgtaccggct ccacagccac ctagcccct caataccagt tacccccctt ccactaccag	7200
tacacctca acctccccta caagtccaag tgtcccacag ccaccccag gaactggaga	7260
tagactacta gctctagtca aaggagccta tcaggcgctt aacctacca atcccgacaa	7320
gacccaagaa tggttggtgt gcttagtgtc gggacctcct tattacgaag gactagcgg	7380
cgtgggcact tataccaatc attccaccgc tccggccaac tgtacggcca cttcccaaca	7440
taagcttacc ctatctgaag tgacaggaca gggcctatgc atgggggcag tacctaaaac	7500
tcaccaggcc ttatgtaaca ccacccaaag cgcgggtca ggatcctact accttgacgc	7560
acccgccgga acaatgtggg cttgcagcac tggattgact ccctgcttgt ccaccacgg	7620
gctcaatcta accacagatt attgtgtatt agttgaactc tggcccagag taatttacca	7680
ctccccgat tatatgtatg gtcagcttga acagcgacc aaatataaaa gagagccagt	7740
atcattgacc ctggcccttc tactaggagg attaaccatg ggagggattg cagctggaat	7800
agggacggg accactgcct taattaaaac ccagcagttt gagcagcttc atgccgctat	7860
ccagacagac ctcaacgaag tcgaaaagtc aattaccaac ctagaaaagt cactgacctc	7920
gttgtctgaa gtagtcctac agaaccgcag aggcctagat ttgctattcc taaaggagg	7980
aggtctctgc gcagccctaa aagaagaatg ttgtttttat gcagaccaca cggggctagt	8040
gagagacagc atggccaaat taagagaaag gcttaatcag agacaaaaac tatttgagac	8100

ES 2 779 149 T3

aggccaagga	tggttcgaag	ggctgtttaa	tagatcccc	tggtttacca	ccttaatctc	8160
caccatcatg	ggacctctaa	tagtactctt	actgatctta	ctctttggac	cttgcatctt	8220
caatcgattg	gtccaatttg	ttaaagacag	gatctcagtg	gtccaggctc	tggttttgac	8280
tcagcaatat	caccagctaa	aacccataga	gtacgagcca	tgaacgcgta	atgtagtctt	8340
atgcaatact	cttgtagtct	tgcaacatgg	taacgatgag	ttagcaacat	gccttacaag	8400
gagagaaaa	gcaccgtgca	tgccgattgg	tggaagtaag	gtggtacgat	cgtgccttat	8460
taggaaggca	acagacgggt	ctgacatgga	ttggacgaac	cactgaattc	cgcattgcag	8520
agatattgta	tttaagtgcc	tagctcgata	caataaacgc	catttgacca	ttcaccacat	8580
tggtgtgcac	catggtgacc	ggcggcatgg	cctccaagtg	ggatcaaaag	ggcatggata	8640
tcgcttacga	ggaggccctg	ctgggctaca	aggagggcgg	cgtgcctatc	ggcggctgtc	8700
tgatcaacaa	caaggacggc	agtgtgctgg	gcaggggcca	caacatgagg	ttccagaagg	8760
gctccgccac	cctgcacggc	gagatctcca	ccctggagaa	ctgtggcagg	ctggagggca	8820
aggtgtacaa	ggacaccacc	ctgtacacca	ccctgtcccc	ttgtgacatg	tgtaccggcg	8880
ctatcatcat	gtacggcatc	cctaggtgtg	tgatcggcga	gaacgtgaac	ttcaagtcca	8940
agggcgagaa	gtacctgcaa	accaggggcc	acgaggtggt	ggttgttgac	gatgagaggt	9000
gtaagaagct	gatgaagcag	ttcatcgacg	agaggcctca	ggactggttc	gaggatatcg	9060
gcgagtaatg	aggatcctgc	tcgcttcggc	agcacatata	ctagtgcact	agggataaca	9120
gggtaattgt	ttgaatgagg	cttcagtact	ttacagaatc	gttgccctgca	catcttgga	9180
acacttgctg	ggattacttc	ttcaggttaa	cccaacagaa	ggctcgagaa	ggtatattgc	9240
tgttgacagt	gagcgcggta	gcaatatgac	aattgatagt	gaagccacag	atgtatcaat	9300
tgtcatattg	ctaccatgcc	tactgcctcg	gaattcaagg	ggctacttta	ggagcaatta	9360
tcttgtttac	taaaactgaa	taccttgcta	tctctttgat	acatttttac	aaagctgaat	9420
taaaatggta	taaattaaat	cacttttttc	aattggaaga	ctaatacggc	ggccgcagat	9480
aaaataaaag	atthttattta	gtctccagaa	aaagggggga	atgaaagacc	ccacctgtag	9540
gtttggcaag	ctagcttaag	taacgccatt	ttgcaaggca	tgaaaaata	cataactgag	9600
aatagagaag	ttcagatcaa	ggtcagggaac	agatggaaca	gctgaatatg	ggccaaacag	9660
gatatctgtg	gtaagcagtt	cctgccccgg	ctcagggcca	agaacagatg	gaacagctga	9720
atatgggcca	aacaggatat	ctgtggttaag	cagttcctgc	cccggctcag	ggccaagaac	9780
agatggtccc	cagatgcggg	ccagccctca	gcagtttcta	gagaaccatc	agatgtttcc	9840
agggtgcccc	aaggacctga	aatgaccctg	tgcccttattt	gaactaacca	atcagttcgc	9900
ttctcgcttc	tggtcgcgcg	cttctgctcc	ccgagctcaa	taaaagagcc	cacaaccctt	9960
cactcggggc	gccagtcctc	cgattgactg	agtcgcccgg	gtaccctgtg	atccaataaa	10020

ES 2 779 149 T3

ccctcttgca gttgcatccg acttgtggtc tcgctgttcc ttgggagggg ctcctctgag	10080
tgattgacta cccgtcagcg ggggtctttc attacatgtg agcaaaaggc cagcaaaagg	10140
ccaggaaccg taaaaaggcc gcgttgctgg cgtttttcca taggctccgc ccccctgacg	10200
agcatcacia aaatcgacgc tcaagtcaga ggtggcgaaa cccgacagga ctataaagat	10260
accaggcggt tccccctgga agctccctcg tgcgctctcc tgttccgacc ctgccgctta	10320
ccggatacct gtccgccttt ctcccttcgg gaagcgtggc gctttctcat agctcacgct	10380
gtaggtatct cagttcggtg taggtcggtc gctccaagct gggctgtgtg cacgaacccc	10440
ccgttcagcc cgaccgctgc gccttatccg gtaactatcg tcttgagtcc aaccggtaa	10500
gacacgactt atcgccactg gcagcagcca ctggtaacag gattagcaga gcgaggtatg	10560
taggcggtgc tacagagttc ttgaagtggg ggcctaacta cggctacact agaaggacag	10620
tatttggtat ctgcgctctg ctgaagccag ttaccttcgg aaaaagagtt ggtagctctt	10680
gatccggcaa acaaacaccg gctggtagcg gtgggttttt tgtttgcaag cagcagatta	10740
cgcgagaaa aaaaggatct caagaagatc ctttgatctt ttctacgggg tctgacgctc	10800
agtggaacga aaactcacgt taagggattt tggctcatgag attatcaaaa aggatcttca	10860
cctagatcct tttaaattaa aaatgaagtt ttaaataaat ctaaagtata tatgagtaaa	10920
cttggctctga cagttaccaa tgcttaatca gtgaggcacc tatctcagcg atctgtctat	10980
ttcgctcatc catagttgcc tgactccccg tcgtgtagat aactacgata cgggagggct	11040
taccatctgg cccagtgct gcaatgatac cgcgagaccc acgctcaccg gctccagatt	11100
tatcagcaat aaaccagcca gccggaaggg ccgagcgagc aagtgggcct gcaactttat	11160
ccgcctccat ccagtctatt aattgttgcc gggaagctag agtaagtagt tcgccagtta	11220
atagtttgcg caacgttgtt gccattgctg caggcatcgt ggtgtcacgc tcgtcgtttg	11280
gtatggcttc attcagctcc ggttcccaac gatcaaggcg agttacatga tccccatgt	11340
tgtgcaaaaa agcgggttagc tccttcggtc ctccgatcgt tgtcagaagt aagttggccg	11400
cagtgttatc actcatggtt atggcagcac tgcataatc tcttactgtc atgccatccg	11460
taagatgctt ttctgtgact ggtgagtact caaccaagtc attctgagaa tagtgtatgc	11520
ggcgaccgag ttgctcttgc ccggcgtaa cacgggataa taccgcgcca catagcagaa	11580
ctttaaaagt gctcatcatt ggaaaacgtt cttcggggcg aaaactctca aggatcttac	11640
cgctgttgag atccagttcg atgtaacca ctctgcacc caactgatct tcagcatctt	11700
ttactttcac cagcgtttct gggtaggcaa aaacaggaag gcaaaatgcc gcaaaaaagg	11760
gaataagggc gacacggaaa tgttgaatac tcatactctt cttttttcaa tattattgaa	11820
gcatttatca gggttattgt ctcatgagcg gatacatatt tgaatgtatt tagaaaaata	11880
aacaaatagg ggttccgcgc acatttcccc gaaaagtgcc acctgacgtc taagaaacca	11940
ttattatcat gacattaacc tataaaaaata ggcgtatcac gagggccttt cgtcttcaag	12000
aattccat	12008

- 5 <210> 16
 <211> 12273
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Vector pAC3-RSV-yCD2-U6-PDL1miR30ARNsh4

5 <400> 16
tagttattaa tagtaatcaa ttacgggggc attagttcat agcccatata tggagttccg 60
cgttacataa cttacggtaa atggcccgcg tggctgaccg cccaacgacc cccgcccatt 120
gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagt aacgccaata gggactttcc attgacgtca 180
atgggtggag tatttacggt aaactgcca cttggcagta catcaagtgt atcatatgcc 240
aagtagcccc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt atgcccagta 300
catgacctta tgggactttc ctacttggca gtacatctac gtattagtca tcgctattac 360
catggtgatg cgggttttgc agtacatcaa tgggcgtgga tagcggtttg actcacgggg 420
atttccaagt ctccacccca ttgacgtcaa tgggagtttg ttttggcacc aaaatcaacg 480
ggactttcca aaatgtcgta acaactccgc ccattgacg caaatgggcg gtaggcgtgt 540
acggtgggag gtctatataa gcagagctgg tttagtgaac cggcgccagt cctccgattg 600
actgagtgcg ccgggtaccc gtgtatccaa taaaccctct tgcagttgca tccgacttgt 660
gggtctcgctg ttccttggga gggctctctc tgagtgattg actaccgctc agcggggggtc 720
tttcatattg gggctcgctc gggatcggga gaccctgccc caggggaccac cgaccacca 780
ccgggaggta agctggccag caacttatct gtgtctgtcc gattgtctag tgtctatgac 840
tgattttatg cgcctgctc ggtactagtt agctaactag ctctgtatct ggcggaacccg 900
tgggtggaact gacgagttcg gaacacccgg ccgcaaccct gggagacgtc ccagggaactt 960
cggggggccgt ttttgtggcc cgacctgagt ccaaaaatcc cgatcgtttt ggactctttg 1020
gtgcaccccc cttagaggag ggatatgtgg ttctggtagg agacgagaac ctaaaacagt 1080
tcccgcctcc gtctgaattt ttgctttcgg tttgggaccg aagccgcgcc gcgcgtcttg 1140
tctgctgcag catcgttctg tgttgtctct gtctgactgt gtttctgtat ttgtctgaaa 1200
atatgggcca gactgttacc actcccttaa gtttgacctt aggtcactgg aaagatgtcg 1260
agcggatcgc tcacaaccag tcggtagatg tcaagaagag acgttgggtt accttctgct 1320
ctgcagaatg gccaaccttt aacgtcggat ggccgcgaga cggcaccttt aaccgagacc 1380
tcatcaccca ggttaagatc aaggtctttt cacctggccc gcatggacac ccagaccagg 1440

ES 2 779 149 T3

tcccctacat cgtgacctgg gaagccttgg cttttgaccc ccctccctgg gtcaagccct	1500
ttgtacaccc taagcctccg cctcctcttc ctccatccgc cccgtctctc ccccttgaac	1560
ctcctcgttc gaccccgctt cgatcctccc tttatccagc cctcactcct tctctaggcg	1620
ccaaacctaa acctcaagtt ctttctgaca gtggggggcc gctcatcgac ctacttacag	1680
aagaccccc gccttatagg gacccaagac caccctcttc cgacagggac ggaaatggtg	1740
gagaagcgac ccctgcggga gaggcaccgg acccctcccc aatggcatct cgcctacgtg	1800
ggagacggga gccccctgtg gccgactcca ctacctcgca ggcatctccc ctccgcgcag	1860
gaggaacggg acagcttcaa tactggccgt tctcctcttc tgacctttac aactggaaaa	1920
ataataaccc ttctttttct gaagatccag gtaaacctgac agctctgac gagtctgtcc	1980
tcacacacca tcagcccacc tgggacgact gtcagcagct gttggggact ctgctgaccg	2040
gagaagaaaa acaacgggtg ctcttagagg ctagaaaggc ggtgcggggc gatgatgggc	2100
gccccactca actgcccaat gaagtccgat cgccttttcc cctcgagcgc ccagactggg	2160
attacaccac ccaggcaggt aggaaccacc tagtccacta tcgccagttg ctccctagcgg	2220
gtctccaaaa cgcgggcaga agccccacca atttggccaa ggtaaaagga ataacacaag	2280
ggcccaatga gtctccctcg gccttcctag agagacttaa ggaagcctat cgcaggtaga	2340
ctccttatga ccctgaggac ccagggcaag aaactaatgt gtctatgtct ttcatttggc	2400
agtctgcccc agacattggg agaaagttag agaggtaga agatttaaaa aacaagacgc	2460
ttggagattt ggtagagag gcagaaaaga tctttaataa acgagaaacc ccggaagaaa	2520
gagaggaacg tatcaggaga gaaacagagg aaaaagaaga acgccgtagg acagaggatg	2580
agcagaaaga gaaagaaaga gatcgtagga gacatagaga gatgagcaag ctattggcca	2640
ctgtcgttag tggacagaaa caggatagac agggaggaga acgaaggagg tcccaactcg	2700
atcgcgacca gtgtgcctac tgcaaagaaa aggggcactg ggctaaagat tgtccaaga	2760
aaccacgagg acctcgggga ccaagacccc agacctccct cctgacccta gatgactagg	2820
gaggtcaggg tcaggagccc cccctgaac ccaggataac cctcaaagtc ggggggcaac	2880
ccgtcacctt cctggtagat actggggccc aacactccgt gctgacccta aatcctggac	2940
ccctaagtga taagtctgcc tgggtccaag gggctactgg aggaaagcgg tatcgctgga	3000
ccacggatcg caaagtacat ctagctaccg gtaaggtcac ccactcttct ctccatgtac	3060
cagactgtcc ctatcctctg ttaggaagag atttctgtac taaactaaaa gcccaaatcc	3120
actttgaggg atcaggagcc caggttatgg gaccaatggg gcagcccctg caagtgttga	3180
ccctaaatat agaagatgag tatcggtac atgagacctc aaaagagcca gatgtttctc	3240
taggggccac atggctgtct gattttctct aggcctgggc ggaaaccggg ggcctgggac	3300

ES 2 779 149 T3

tggcagttcg	ccaagctcct	ctgatcatat	ctctgaaagc	aacctctacc	cccgtgtcca	3360
taaaaacaata	ccccatgtca	caagaagcca	gactggggat	caagccccac	atacagagac	3420
tgttggaacca	gggaataactg	gtaccctgcc	agtccccctg	gaacacgccc	ctgctaccgg	3480
ttaagaaacc	agggaactaat	gattataggg	ctgtccagga	tctgagagaa	gtcaacaagc	3540
gggtggaaga	catccacccc	accgtgcccc	acccttaca	cctcttgagc	gggctccac	3600
cgtcccacca	gtggtacact	gtgcttgatt	taaaggatgc	ctttttctgc	ctgagactcc	3660
accccaccag	tacgctctc	ttgcctttg	agtggagaga	tccagagatg	ggaatctcag	3720
gacaattgac	ctggaccaga	ctcccacagg	gtttcaaaaa	cagtcccacc	ctgtttgatg	3780
aggcactgca	cagagaccta	gcagacttcc	ggatccagca	cccagacttg	atcctgctac	3840
agtacgtgga	tgacttactg	ctggccgcca	cttctgagct	agactgcca	caaggctactc	3900
gggccctggt	acaaacccta	gggaacctcg	ggtatcgggc	ctcggccaa	aaagcccaaa	3960
tttgccagaa	acaggtcaag	tatctggggg	atcttctaaa	agaggggtcag	agatggctga	4020
ctgaggccag	aaaagagact	gtgatggggc	agcctactcc	gaagaccctc	cgacaactaa	4080
gggagttcct	agggacggca	ggcttctgtc	gcctctggat	ccctgggttt	gcagaaatgg	4140
cagccccctt	gtaccctctc	acaaaaacgg	ggactctggt	taattggggc	ccagaccaac	4200
aaaaggccta	tcaagaaatc	aagcaagctc	ttctaactgc	cccagccctg	gggttgccag	4260
atttgactaa	gccctttgaa	ctctttgtcg	acgagaagca	gggctacgcc	aaagggtgtcc	4320
taacgcaaaa	actgggacct	tggcgctggc	cggtggccta	cctgtccaaa	aagctagacc	4380
cagtagcagc	tgggtggccc	ccttgctctc	ggatggtagc	agccattgcc	gtactgacaa	4440
aggatgcagg	caagctaacc	atgggacagc	cactagtcat	tctggccccc	catgcagtag	4500
aggcactagt	caaacaaccc	cccagccgct	ggctttccaa	cgcccgatg	actcactatc	4560
aggccttgct	tttggaacag	gaccgggtcc	agttcggaac	ggtggtagcc	ctgaaccggg	4620
ctacgctgct	cccactgctc	gaggaagggc	tgcaacacaa	ctgccttgat	atcctggccg	4680
aagcccacgg	aaccgaccc	gacctaacgg	accagccgct	cccagacgcc	gaccacacct	4740
ggtacacgga	tgggaagcagt	ctcttacaag	agggacagcg	taaggcgggg	gctgcggtga	4800
ccaccgagac	cgaggtaatc	tgggctaaag	ccctgccagc	cgggacatcc	gctcagcggg	4860
ctgaactgat	agcactcacc	caggccctaa	agatggcaga	aggtaagaag	ctaaatgttt	4920
atactgatag	ccgttatgct	tttgctactg	cccataatcca	tggagaaata	tacagaaggc	4980
gtgggttgct	cacatcagaa	ggcaaagaga	tcaaaaataa	agacgagatc	ttggccctac	5040
taaaagccct	ctttctgccc	aaaagactta	gcataatcca	ttgtccagga	catcaaaagg	5100
gacacagcgc	cgaggctaga	ggcaaccgga	tggctgacca	agcggcccg	aaggcagcca	5160
tcacagagac	tccagacacc	tctaccctcc	tcatagaaaa	ttcatcacc	tacacctcag	5220

aacatthttca ttacacagtg actgatataa aggacctaac caagttgggg gccatthtatg	5280
ataaaacaaa gaagtattgg gtctaccaag gaaaacctgt gatgcctgac cagthttactt	5340
ttgaattatt agactthttctt catcagctga ctcacctcag cttctcaaaa atgaaggctc	5400
tcctagagag aagccacagt ccctactaca tgctgaaccg ggatcgaaca ctcaaaaata	5460
tcactgagac ctgcaaagct tgtgcacaag tcaacgccag caagtctgcc gttaaacagg	5520
gaactagggt ccgcgggcat cggcccgga ctcatthggga gatcgatthc accgagataa	5580
agcccggtt gtatggctat aaatatcttc tagththttat agatacctth tctggctgga	5640
tagaagcctt cccaaccaag aaagaaaccg ccaaggtcgt aaccaagaag ctactagagg	5700
agatctthcc caggttcggc atgcctcagg tathgggaac tgacaatggg cctgccttcg	5760
tctccaaggt gagtcagaca gtggccgac tgthggggat tgattggaaa ttacattgtg	5820
catacagacc ccaaagctca ggccaggtag aaagaatgaa tagaaccatc aaggagactt	5880
taactaaatt aacgcttgca actggctcta gagactgggt gctcctactc cccttagccc	5940
tgtaccgagc ccgcaacacg ccggggccccc atggcctcac cccatatgag atcttatatg	6000
gggcaccccc gcccttgta aacttccctg accctgacat gacaagagtt actaacagcc	6060
cctctctcca agctcactta caggctctct acttagtcca gcacgaagtc tggagacctc	6120
tggcggcagc ctaccaagaa caactggacc gaccggtggt acctcaccct taccgagtcg	6180
gcgacacagt gtgggtccgc cgacaccaga ctaagaacct agaacctcgc tggaaaggac	6240
cttacacagt cctgctgacc accccaccg ccctcaaagt agacggcatc gcagcttgga	6300
tacacgccgc ccacgtgaag gctgccgacc ccgggggtgg accatcctct agactgacat	6360
ggcgcgthca acgctctcaa accccctca agataagatt aacctgthga agcccttaat	6420
agtcatggga gtccgtgthtag gagtagggat ggcagagagc ccccatcagg tctthtaatgt	6480
aacctggaga gtcaccaacc tgatgactgg gcgtaccgcc aatgccacct ccctcctggg	6540
aactgtacaa gatgcctthc caaaattata thttgatcta tgtgatctgg tccgagagga	6600
gtgggaccct tcagaccagg aaccgtatgt cgggtatggc tgcaagtacc ccgagggag	6660
acagcggacc cggactthtg actthttacgt gtgccctggg cataccgtaa agtcggggthg	6720
tgggggacca ggagagggct actgtggtaa atgggggtgt gaaaccaccg gacaggctta	6780
ctggaagccc acatcatcgt gggacctaat ctcccttaag cgcggtacaa cccctggga	6840
cacgggatgc tctaaagthg cctgtggccc ctgctacgac ctctccaaag tatccaathc	6900
ctthcaaggg gctactcgag ggggcagatg caacctcta gthcctagaat tctatgatgc	6960
aggaaaaaag gctaactggg acgggcccac atcgtgggga ctgagactgt accggacagg	7020
aacagatcct attaccatgt tctccctgac ccggcaggtc cttaatgtgg gaccccgagt	7080

ES 2 779 149 T3

ccccataggg	cccaaccag	tattaccga	ccaaagactc	ccttcctcac	caatagagat	7140
tgtaccggct	ccacagccac	ctagccccct	caataccagt	tacccccctt	ccactaccag	7200
tacaccctca	acctccccta	caagtccaag	tgtcccacag	ccacccccag	gaactggaga	7260
tagactacta	gctctagtca	aaggagccta	tcaggcgctt	aacctcacca	atcccgacaa	7320
gacccaagaa	tggtggctgt	gcttagtgtc	gggacctcct	tattacgaag	gagtagcggt	7380
cgtgggcact	tataccaatc	attccaccgc	tccggccaac	tgtacggcca	cttcccaaca	7440
taagcttacc	ctatctgaag	tgacaggaca	gggcctatgc	atgggggcag	tacctaaaac	7500
tcaccaggcc	ttatgtaaca	ccaccaaaag	cgccggctca	ggatcctact	accttgacgc	7560
acccgccgga	acaatgtggg	cttgacgac	tggattgact	ccctgcttgt	ccaccacggt	7620
gctcaatcta	accacagatt	attgtgtatt	agttgaactc	tggcccagag	taatttacca	7680
ctccccgat	tatatgtatg	gtcagcttga	acagcgtacc	aaatataaaa	gagagccagt	7740
atcattgacc	ctggcccttc	tactaggagg	attaacctag	ggagggattg	cagctggaat	7800
agggacgggg	accactgcct	taattaaaac	ccagcagttt	gagcagcttc	atgccgctat	7860
ccagacagac	ctcaacgaag	tcgaaaagtc	aattaccaac	ctagaaaagt	cactgacctc	7920
gttgtctgaa	gtagtccctac	agaaccgcag	aggcctagat	ttgctattcc	taaaggaggg	7980
aggtctctgc	gcagccctaa	aagaagaatg	ttgtttttat	gcagaccaca	cggggctagt	8040
gagagacagc	atggccaaat	taagagaaag	gcttaatcag	agacaaaaac	tatttgagac	8100
aggccaagga	tggttcgaag	ggctgtttta	tagatcccc	tggtttacca	ccttaatctc	8160
caccatcatg	ggacctctaa	tagtactctt	actgatctta	ctctttggac	cttgcatctt	8220
caatcgattg	gtccaatttg	ttaaagacag	gatctcagtg	gtccaggctc	tggttttgac	8280
tcagcaatat	caccagctaa	aaccataga	gtacgagcca	tgaacgcgta	atgtagtctt	8340
atgcaatact	cttgtagtct	tgcaacatgg	taacgatgag	ttagcaacat	gccttacaag	8400
gagagaaaaa	gcaccgtgca	tgccgattgg	tggaaagtaag	gtggtacgat	cgtgccttat	8460
taggaaggca	acagacgggt	ctgacatgga	ttggacgaac	cactgaattc	cgcattgcag	8520
agatattgta	tttaagtgcc	tagctcgata	caataaacgc	catttgacca	ttcaccacat	8580
tggtgtgcac	catggtgacc	ggcggcatgg	cctccaagtg	ggatcaaaaag	ggcatggata	8640
tcgcttacga	ggaggccctg	ctgggctaca	aggagggcgg	cgtgcctatc	ggcggctgtc	8700
tgatcaacaa	caaggacggc	agtgtgctgg	gcaggggcca	caacatgagg	ttccagaagg	8760
gctccgccac	cctgcacggc	gagatctcca	ccctggagaa	ctgtggcagg	ctggagggca	8820
aggtgtacaa	ggacaccacc	ctgtacacca	ccctgtcccc	ttgtgacatg	tgtaccggcg	8880
ctatcatcat	gtacggcatc	cctaggtgtg	tgatcggcga	gaacgtgaac	ttcaagtcca	8940
agggcgagaa	gtacctgcaa	accaggggcc	acgaggtggt	ggttggtgac	gatgagaggt	9000

ES 2 779 149 T3

gtaagaagct gatgaagcag ttcacgcgacg agaggcctca ggactgggttc gaggatatcg	9060
gcgagtaatg aaaggctcggg caggaagagg gcctatttcc catgattcct tcatatttgc	9120
atatacgata caaggctggt agagagataa ttagaattaa tttgactgta aacacaaaga	9180
tattagtaca aaatacgtga cgtagaaagt aataatttct tgggtagttt gcagttttta	9240
aaattatggt ttaaaatgga ctatcatatg cttaccgtaa cttgaaagta tttcgatttc	9300
ttggctttat atatcttggtg gaaaggacga aacaccggat cctgctcgct tcggcagcac	9360
atatactagt cgactagga taacagggtta attgtttgaa tgaggcttca gtactttaca	9420
gaatcggttc ctgcacatct tggaacact tgctgggatt acttcttcag gttaacccaa	9480
cagaaggctc gagaaggtat attgctgttg acagtgagcg cggtagcaat atgacaattg	9540
atagtgaagc cacagatgta tcaattgtca tattgtctacc atgcctactg cctcggaatt	9600
caaggggcta ctttaggagc aattatcttg tttactaaa ctgaatacct tgctatctct	9660
ttgatacatt tttacaaagc tgaattaaaa tgggtataaat taaatcactt ttttcaattg	9720
gaagactaat gcggcgggcg cagataaaat aaaagatttt atttagtctc cagaaaaagg	9780
ggggaatgaa agacccacc tgtaggtttg gcaagctagc ttaagtaacg ccattttgca	9840
aggcatggaa aaatacataa ctgagaatag agaagttcag atcaaggta ggaacagatg	9900
gaacagctga atatgggcca aacaggatat ctgtggttaag cagttcctgc cccggctcag	9960
ggccaagaac agatggaaca gctgaatatg ggccaaacag gatctctgtg gtaagcagtt	10020
cctgccccgg ctcaggggcca agaacagatg gtccccagat gcggtccagc cctcagcagt	10080
ttctagagaa ccatcagatg tttccagggt gccccaaagga cctgaaatga ccctgtgcct	10140
tatttgaact aaccaatcag ttctgttctc gcttctgttc gcgcgcttct gctccccgag	10200
ctcaataaaa gagccacaa cccctcactc ggggcgccag tcctccgatt gactgagtcg	10260
cccgggtacc cgtgtatcca ataaacctc ttgcagttgc atccgacttg tggctctcgt	10320
gttccttggg agggctctct ctgagtgatt gactaccgt cagcgggggt ctttcattac	10380
atgtgagcaa aaggccagca aaaggccagg aaccgtaaaa aggcgcgctt gctggcggtt	10440
ttccataggc tccgcccccc tgacgagcat cacaaaaatc gacgctcaag tcagaggtgg	10500
cgaacccga caggactata aagataccag gcgtttcccc ctggaagtc cctcgtgcgc	10560
tctcctgttc cgaccctgcc gcttaccgga tacctgtccg cctttctccc ttcgggaagc	10620
gtggcgcttt ctcatagtc acgctgtagg tatctcagtt cggtgtaggc cgttcgctcc	10680
aagctgggct gtgtgcacga accccccgtt cagcccgacc gctgcgcctt atccggtaac	10740
tatcgtcttg agtccaaccc ggtaagacac gacttatcgc cactggcagc agccactgg	10800
aacaggatta gcagagcgag gtatgtaggc ggtgctacag agttcttgaa gtgggtgcct	10860

aactacggct acactagaag gacagtatctt ggtatctgctg ctctgctgaa gccagttacc 10920
 ttcggaaaaa gagttggtag ctcttgatcc ggcaaaaaa ccaccgctgg tagcgggtgg 10980
 ttttttggtt gcaagcagca gattacgcgc agaaaaaaag gatctcaaga agatcctttg 11040
 atcttttcta cggggtctga cgctcagtg aacgaaaact cacgttaagg gattttggtc 11100
 atgagattat caaaaaggat cttcacctag atccttttaa attaaaaatg aagtttttaa 11160
 tcaatctaaa gtatatatga gtaaaacttg tctgacagtt accaatgctt aatcagtgag 11220
 gcacctatct cagcgatctg tctatttcgt tcatccatag ttgcctgact ccccgctgctg 11280
 tagataacta cgatacggga gggcttacca tctggcccca gtgctgcaat gataccgcga 11340
 gacccacgct caccggctcc agatttatca gcaataaacc agccagccgg aagggccgag 11400
 cgcagaagtg gtcctgcaac tttatccgcc tccatccagt ctattaattg ttgccgggaa 11460
 gctagagtaa gtatgtcgcc agttaatagt ttgcgcaacg ttgttgccat tgctgcaggc 11520
 atcgtgggtg cacgctcgtc gtttggtatg gcttcattca gctccggttc ccaacgatca 11580
 aggcgagtta catgatcccc catgttggtc aaaaaagcgg ttagctcctt cggtcctccg 11640
 atcgttggtc gaagtaagtt ggccgcagtg ttatcactca tggttatggc agcactgcat 11700
 aattctctta ctgtcatgcc atccgtaaga tgcttttctg tgactggtga gtactcaacc 11760
 aagtcattct gagaatagtg tatgcggcga ccgagttgct cttgcccggc gtcaacacgg 11820
 gataataccg cgccacatag cagaacttta aaagtgtc tcatggaaa acgttcttcg 11880
 gggcgaaaaa tctcaaggat cttaccgctg ttgagatcca gttcgatgta acccactcgt 11940
 gcacccaact gatcttcagc atcttttact ttcaccagcg tttctgggtg agcaaaaaca 12000
 ggaagcgaat atgccgcaaa aaaggggaata agggcgacac ggaaatgttg aatactcata 12060
 ctcttccttt ttcaatatta ttgaagcatt tatcaggggtt attgtctcat gagcggatac 12120
 atatttgaat gtatttagaa aaataaaca ataggggttc cgcgcacatt tccccgaaa 12180
 gtgccacctg acgtctaaga aaccattatt atcatgacat taacctataa aaataggcgt 12240
 atcacgaggc cctttcgtct tcaagaattc cat 12273

<210> 17

<211> 31

5 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> Cebador directo SALI-IRES

<400> 17

gtacgtcgac tactggccga agccgcttg a 31

<210> 18

15 <211> 32

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

20 <223> Cebador inverso-Clal-yCD2

<400> 18

gtacatcgat ttactgccg atatcctcga ac 32

<210> 19
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> Cebador inverso-Clal-hIL-2
 <400> 19
 10 gtacatcgat tcaagtcagt gttgagatga tg 32
 <210> 20
 <211> 32
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Cebador inverso-Clal-mIL-2
 20 <400> 20
 gtacatcgat ttattgaggg ctgttgaga tg 32
 <210> 21
 <211> 33
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Cebador directo hU6-NotI
 30 <400> 21
 gatcgcgcc gcacgcgtaa ggtcgggcag gaa 33
 <210> 22
 <211> 22
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 40 <223> Cebador inverso-ARNsh-NotI
 <400> 22
 atctgcggcc gcctagaaaa aa 22
 45 <210> 23
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 50 <220>
 <223> Cebador inverso-miR30-NotI
 <400> 23
 gcggccgccg cattagtctt ccaattg 27
 55 <210> 24
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> secuencia IDO-1 ARNsi
 <400> 24
 65 tattctatag tcttacttg 19

<210> 25
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> secuencia IDO-1 ARNsi
 <400> 25
 10 tcaacttctt ctcgaagct 19
 <210> 26
 <211> 19
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> secuencia IDO-1 ARNsi
 20 <400> 26
 tgaaatgaca aactcacgg 19
 <210> 27
 <211> 19
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> secuencia PDL-1 ARNsi
 30 <400> 27
 tagttcatgc tcagaagtg 19
 <210> 28
 <211> 19
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 40 <223> secuencia PDL-1 ARNsi
 <400> 28
 aatgctagac aatgaactg 19
 45 <210> 29
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 50 <220>
 <223> secuencia PDL-1 ARNsi
 <400> 29
 tatgcagcag taaacgcct 19
 55 <210> 30
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> secuencia PDL-1 ARNsi
 <400> 30
 65 agtccgcacc accgtagct 19

<210> 31
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> secuencia TGFb2 ARNsi
 <400> 31
 10 ttgtggtgaa gccactcct 19
 <210> 32
 <211> 19
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> secuencia TGFb2 ARNsi
 20 <400> 32
 tctcctgcag taagtcct 19
 <210> 33
 <211> 19
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> secuencia TGFb2 ARNsi
 30 <400> 33
 aacaaacaga acacaagct 19

REIVINDICACIONES

1. Un vector retroviral gamma competente para la replicación recombinante que comprende:

una proteína retroviral GAG;

una proteína retroviral POL;

5 una cubierta retroviral;

un polinucleótido retroviral basado en pAC3 que comprende:

secuencias de repetición terminal larga (LTR) en el extremo 3' de la secuencia de polinucleótido retroviral,

una secuencia promotora en el extremo 5' del polinucleótido retroviral, siendo dicho promotor adecuado para la expresión en una célula de mamífero,

10 un dominio de ácido nucleico *gag*,

un dominio de ácido nucleico *pol*; y

un dominio de ácido nucleico *env*;

15 al menos un casete de expresión que comprende una secuencia de ácido nucleico heterólogo, en donde el casete se posiciona en 5' de la LTR en 3' y en 3' del dominio de ácido nucleico *env* que codifica la cubierta retroviral, y en donde el ácido nucleico heterólogo codifica una secuencia de ácido nucleico inhibidora incorporada en miR30ARNsh; y

secuencias que actúan en cis necesarias para la transcripción inversa, empaquetamiento e integración en una célula diana,

20 en donde la secuencia de ácido nucleico inhibidora regula a la baja un agente inhibidor inmune seleccionado de PD-L1, IDO-1, y TGFβ2 y

en donde las secuencias de LTR, la secuencia promotora, el dominio de ácido nucleico *gag*, el dominio de ácido nucleico *pol*, el dominio de ácido nucleico *env*, y las secuencias que actúan en cis son secuencias retrovirales de secuencias de ADN de pAC3 correspondientes presentadas en las SEQ ID NO: 1 y 7-16.

25 2. El vector retroviral gamma competente para la replicación recombinante de la reivindicación 1, en donde el vector comprende al menos dos casetes,

en donde un primer casete comprende un promotor polIII unido operativamente a una secuencia de ácido nucleico inhibidora; y un segundo casete comprende un mini-promotor unido operativamente a un polinucleótido que codifica un anticuerpo de cadena única; o

30 en donde un primer casete comprende un promotor polIII unido operativamente a una primera secuencia de ácido nucleico inhibidora; y un segundo casete comprende un mini-promotor unido operativamente a una segunda secuencia de ácido nucleico inhibidora.

3. El vector retroviral gamma competente para la replicación recombinante de la reivindicación 1, en donde el vector tiene la estructura general de 5' a 3' que comprende una repetición terminal larga (LTR)-secuencia *gag*-secuencia *pol*-secuencia *env*-(al menos un casete de expresión)-LTR.

35 4. El vector retroviral gamma competente para la replicación recombinante de la reivindicación 3, en donde el dominio de ácido nucleico *gag* tiene una secuencia retroviral que corresponde a la secuencia desde el número de nucleótido 1203 hasta el nucleótido 2819 de SEQ ID NO: 1 y 7-16; y/o

en donde el dominio *pol* tiene una secuencia retroviral que corresponde a la secuencia desde el número de nucleótido 2820 hasta el nucleótido 6358 de SEQ ID NO: 1 y 7-16; y/o

40 en donde el dominio *env* codifica una proteína *env* anfotrópica; y/o

en donde el dominio *env* tiene una secuencia retroviral que corresponde a la secuencia desde el número de nucleótido 6359 hasta el nucleótido 8323 de SEQ ID NO: 1 y 7-16.

5. El vector retroviral gamma competente para la replicación recombinante de la reivindicación 2,

- 5 en donde el al menos un casete comprende un promotor polIII unido operativamente a una secuencia de ácido nucleico inhibidora, de manera que se expresa la secuencia de ácido nucleico inhibidora, preferiblemente en donde el promotor polIII comprende un promotor H1 o un promotor U6, más preferiblemente en donde el promotor H1 tiene una secuencia retroviral que corresponde a la secuencia como se muestra en la SEQ ID NO: 7 o 12 desde 8330 a 8553 y comprende secuencias de terminación polIII que tienen secuencias retrovirales que corresponden a las secuencias como se muestra en la SEQ ID NO: 7 o 12 desde 8885 a 8889 y 8925 a 8930; o en donde el promotor U6 tiene una secuencia retroviral que corresponde a la secuencia como se muestra en la SEQ ID NO: 8 o 13 desde 8330-8595 y comprende secuencias de terminación polIII que tienen secuencias retrovirales que corresponden a las secuencias como se muestra en la SEQ ID NO: 7 o 12 desde 8922-8926 y 8962 a 8967.
- 10
6. El vector retroviral gamma competente para la replicación recombinante de la reivindicación 2, en donde el al menos un casete comprende un mini-promotor; preferiblemente
- 15 en donde el mini-promotor es un promotor de RSV; más preferiblemente, en donde el promotor de RSV tiene una secuencia retroviral que corresponde a la secuencia desde 8330 hasta aproximadamente 8591 de la SEQ ID NO: 9, 10, 14, 15, o 16.
7. El vector retroviral gamma competente para la replicación recombinante de la reivindicación 6, en donde el promotor de RSV está unido operativamente a una secuencia de ácido nucleico inhibidora o a un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene actividad citosina desaminasa; o
- 20 en donde el promotor de RSV está unido operativamente a un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene actividad citosina desaminasa seguido de y unido operativamente a una secuencia de ácido nucleico inhibidora.
8. El vector retroviral gamma competente para la replicación recombinante de cualquiera de las reivindicaciones 2-7, en donde el al menos un casete comprende dos casetes.
- 25 9. El vector retroviral gamma competente para la replicación recombinante de la reivindicación 8, en donde un primer casete comprende un promotor H1 o U6 unido a una secuencia de ácido nucleico inhibidora y el segundo casete comprende un promotor de RSV unido operativamente a un polinucleótido que codifica un polipéptido; opcionalmente, en donde el polipéptido está optimizado para codones humanos.
10. El vector retroviral gamma competente para la replicación recombinante de cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde la secuencia de ácido nucleico inhibidora inhibe PDL1.
- 30 11. Un vector retroviral gamma competente para la replicación recombinante de cualquiera de las reivindicaciones 1-10 para uso en el tratamiento de un cáncer o de un trastorno de la proliferación celular.

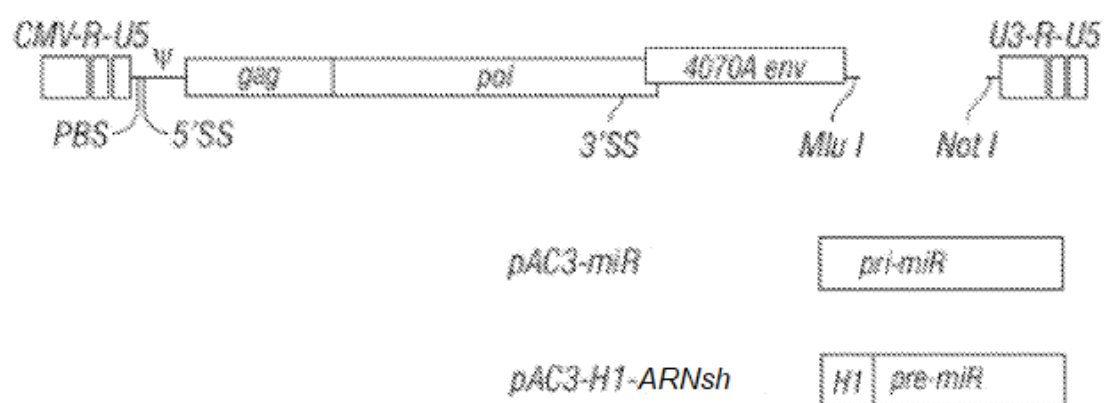


FIG. 1A

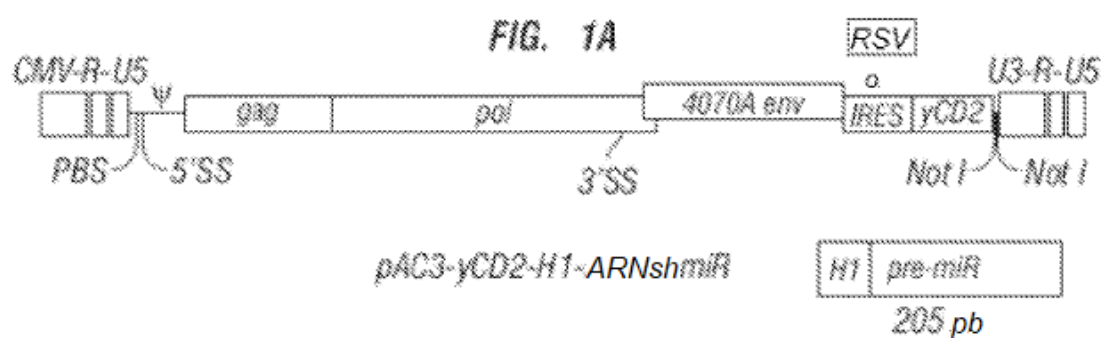


FIG. 1B

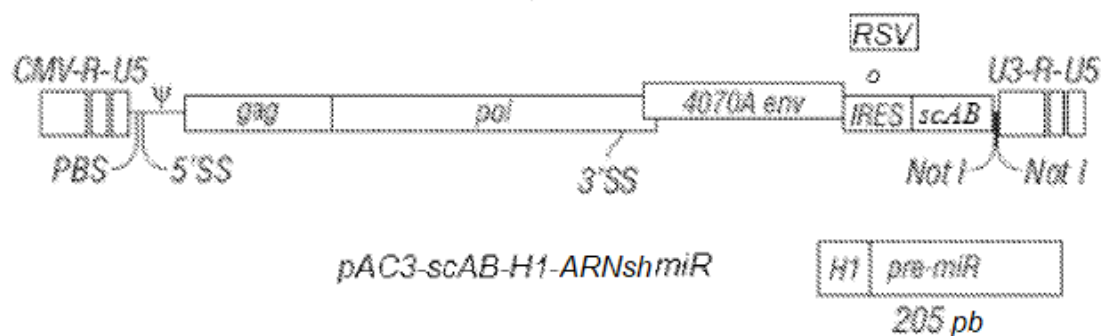


FIG. 1C

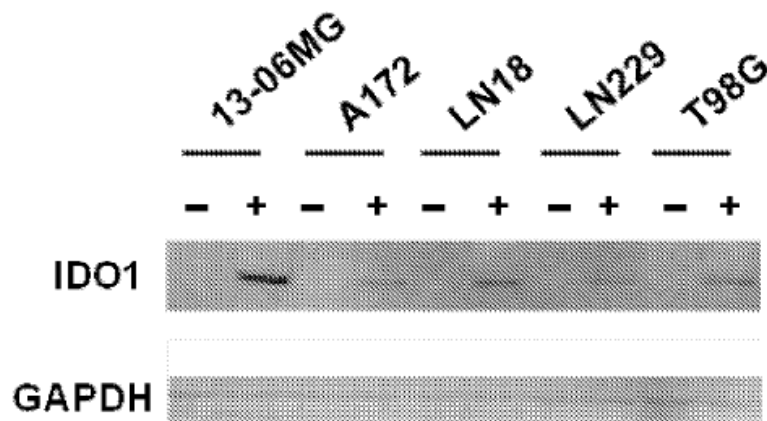


FIG. 2

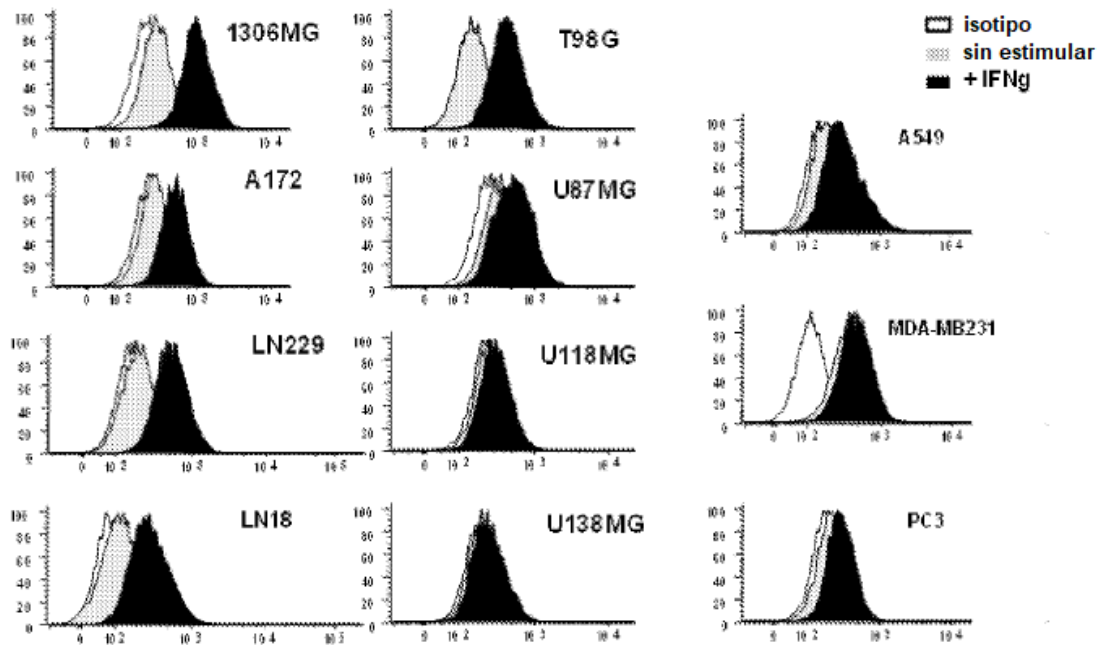


FIG. 3

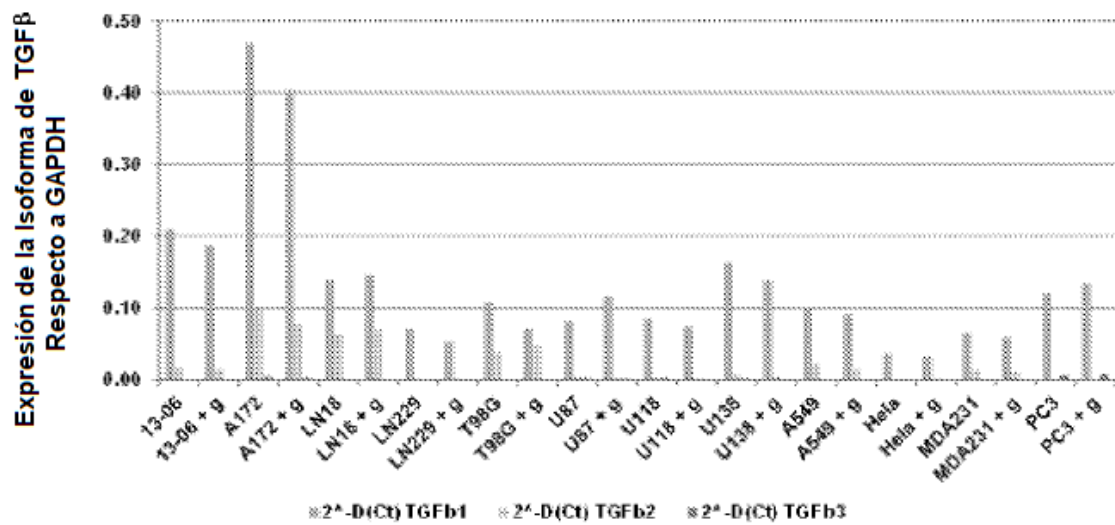


FIG. 4

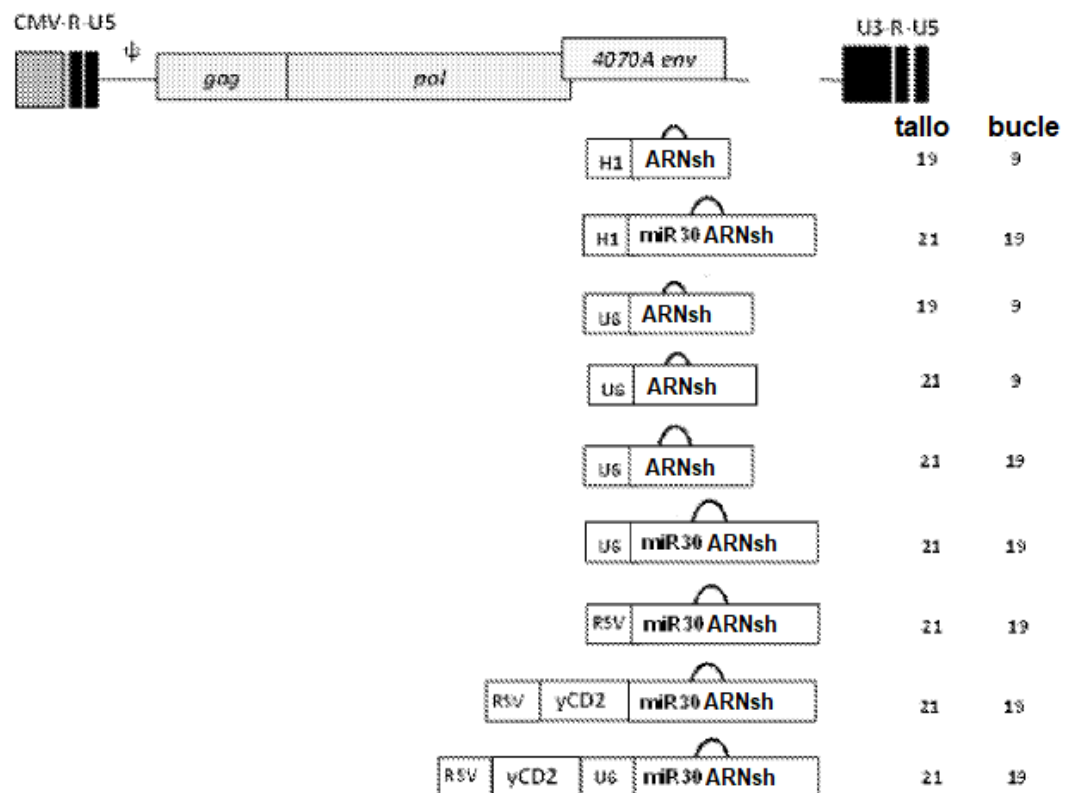


FIG. 5

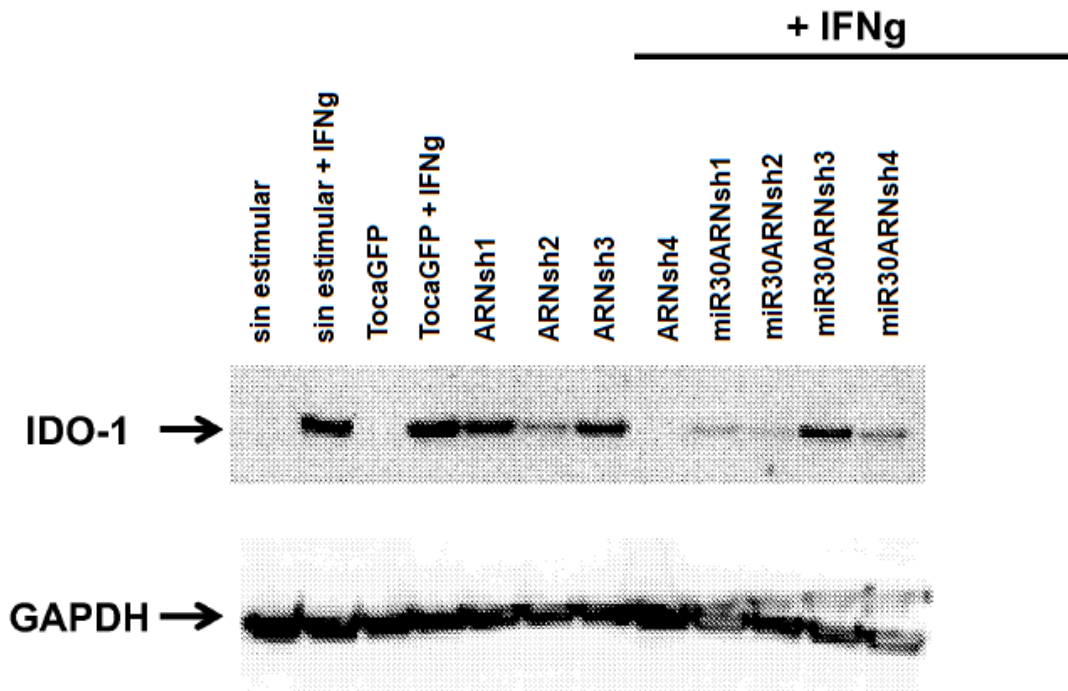


FIG. 6

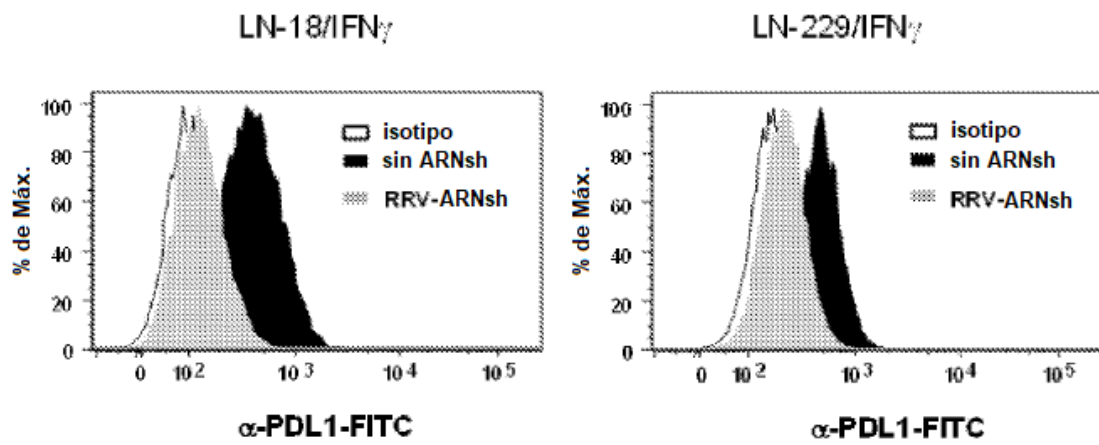


FIG. 7

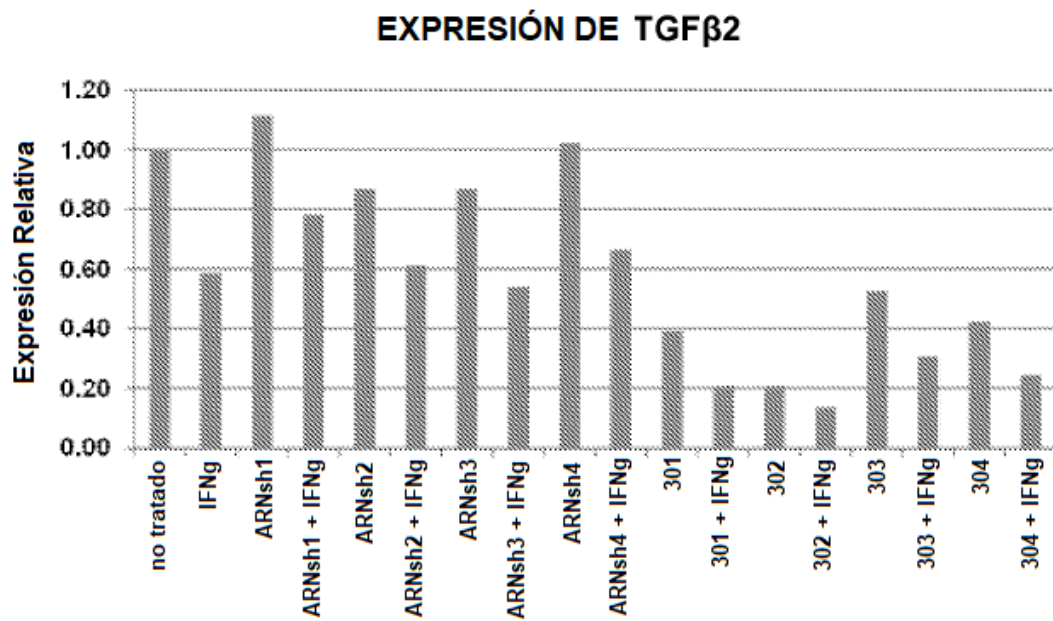


FIG. 8

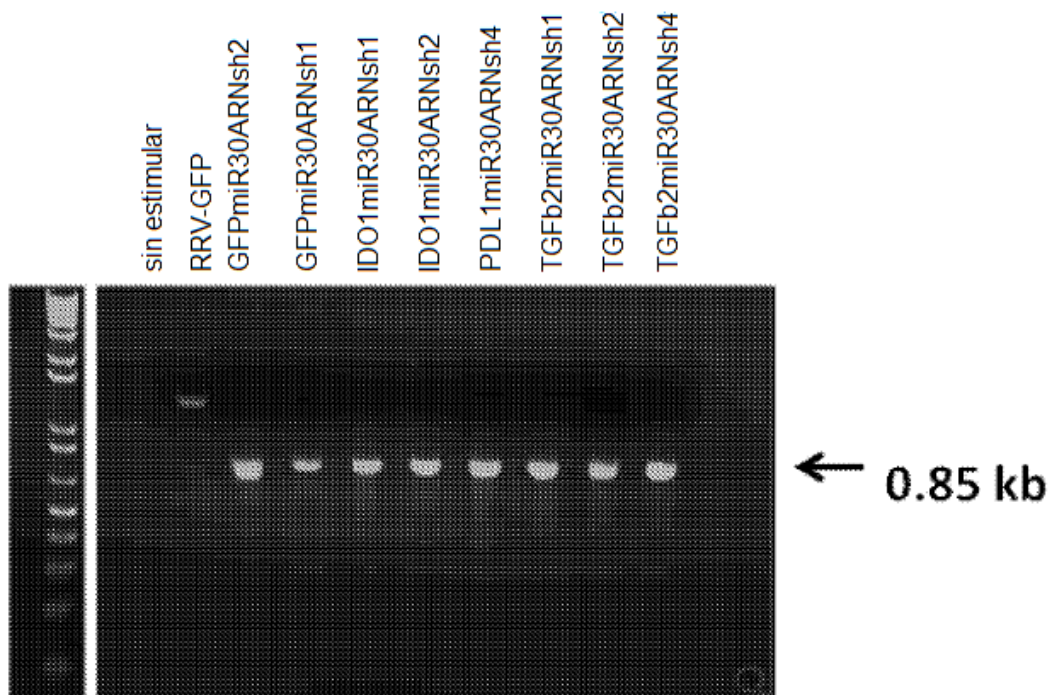


FIG. 9

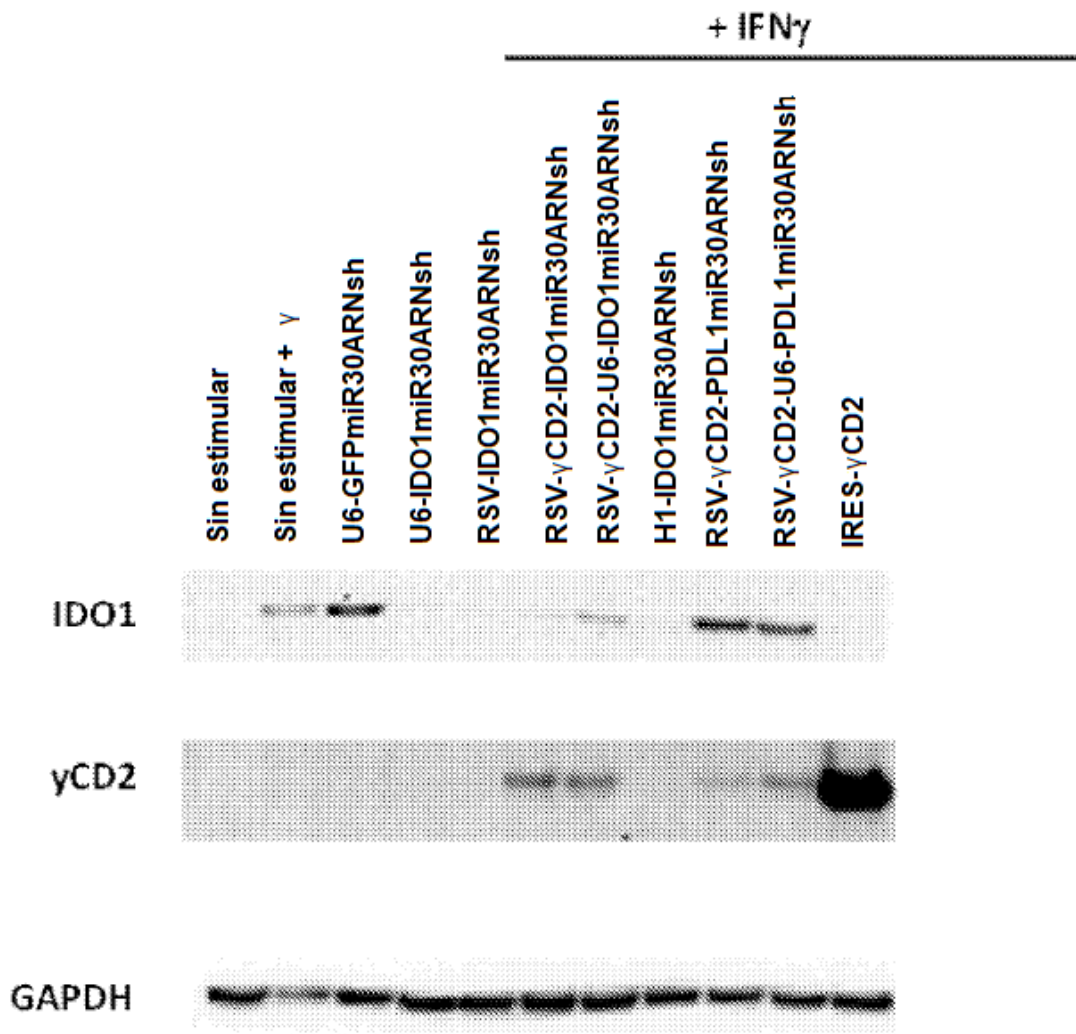


FIG. 10

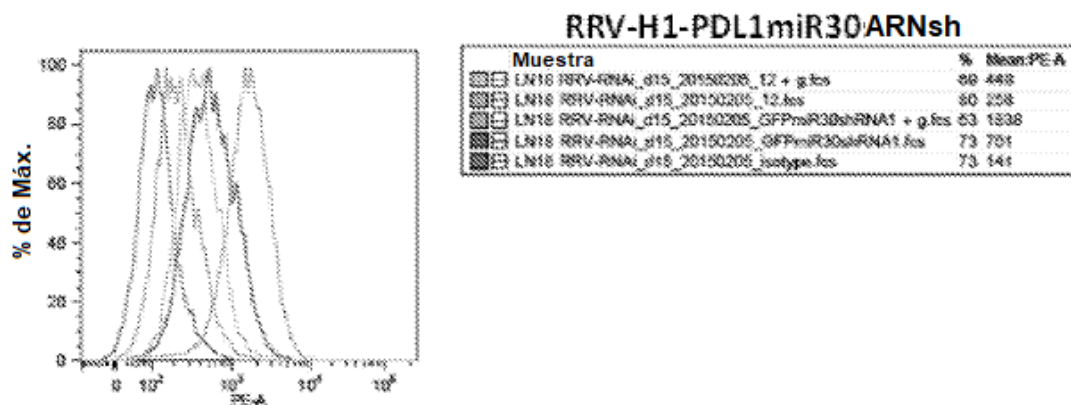
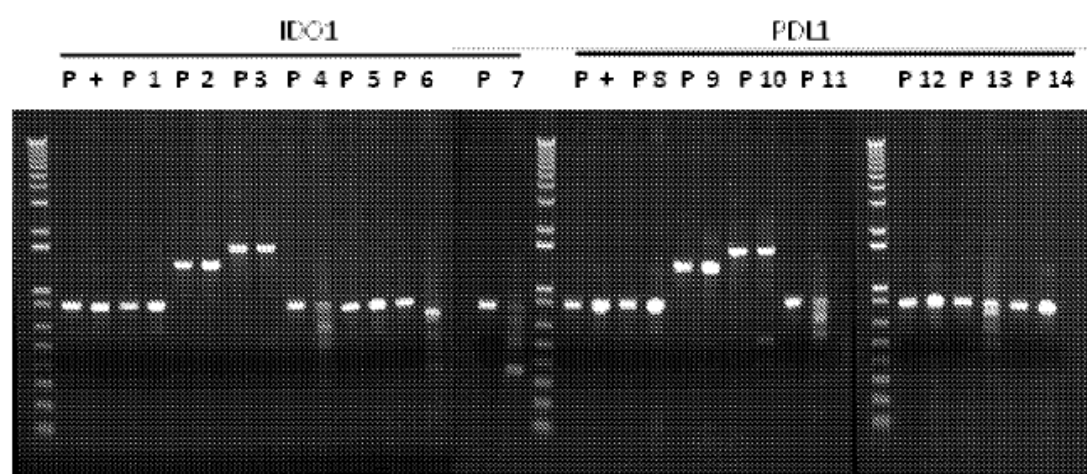


FIG. 11



P= ADN plasmídico de referencia para cada vector

- | | |
|--------------------------------|---------------------------------|
| 1. RSV- IDO1miR30ARNsh2 | 8. RSV- PDL1miR30ARNsh4 |
| 2. RSV-yCD2-IDO1miR30ARNsh2 | 9. RSV-yCD2-PDL1miR30ARNsh4 |
| 3. RSV-yCD2-U6-IDO1miR30ARNsh2 | 10. RSV-yCD2-U6-PDL1miR30ARNsh4 |
| 4. U6-IDO1miR30ARNsh2 | 11. U6-PDL1miR30ARNsh4 |
| 5. H1-IDO1miR30ARNsh2 | 12. H1-PDL1miR30ARNsh2 |
| 6. U6-IDO1miR21ARNsh2 | 13. U6-PDL1miR21ARNsh2 |
| 7. U6-IDO1miR155ARNsh2 | 14. U6-PDL1miR155ARNsh2 |

FIG. 12

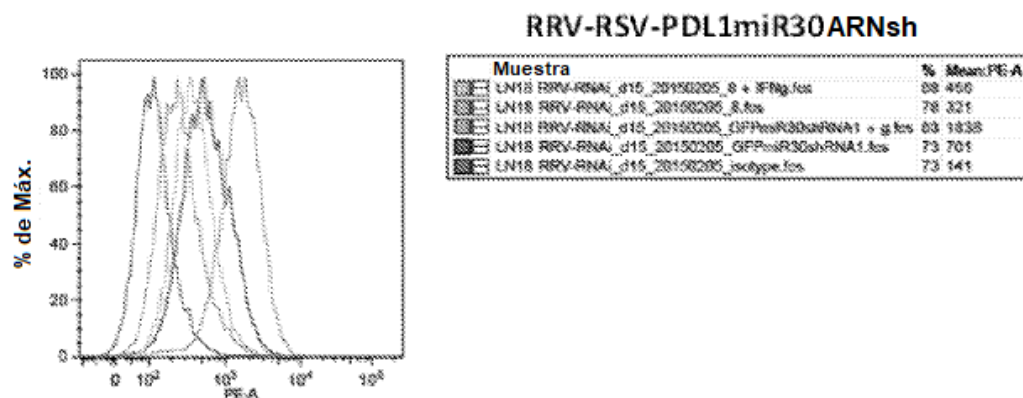
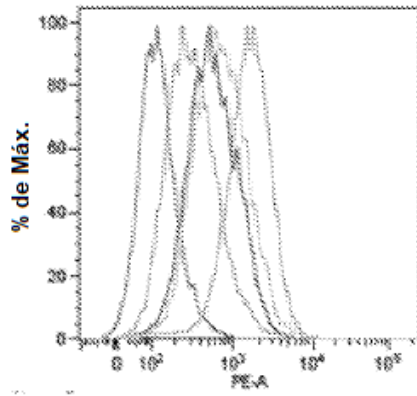
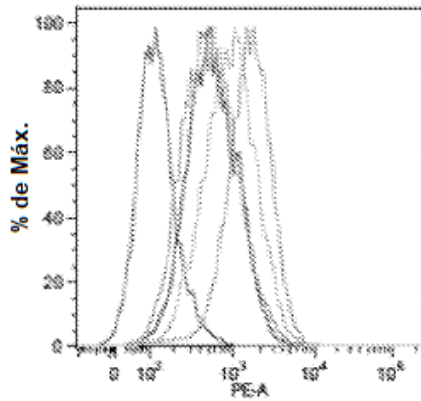


FIG. 13



Muestra	% Mean PE-A
LN18 RRV-RNAi_d15_20150205_3 + g.fos	73 910
LN18 RRV-RNAi_d15_20150205_9.fos	73 418
LN18 RRV-RNAi_d15_20150205_GFPmR30shRNA1 + g.fos	83 1838
LN18 RRV-RNAi_d15_20150205_GFPmR30shRNA1.fos	73 781
LN18 RRV-RNAi_d15_20150205_isotype.fos	73 141

FIG. 14



Muestra	% Mean PE-A
LN18 RRV-RNAi_d15_20150205_10 + g.fos	88 1142
LN18 RRV-RNAi_d15_20150205_10.fos	75 698
LN18 RRV-RNAi_d15_20150205_GFPmR30shRNA1 + g.fos	83 1838
LN18 RRV-RNAi_d15_20150205_GFPmR30shRNA1.fos	73 781
LN18 RRV-RNAi_d15_20150205_isotype.fos	73 141

FIG. 15

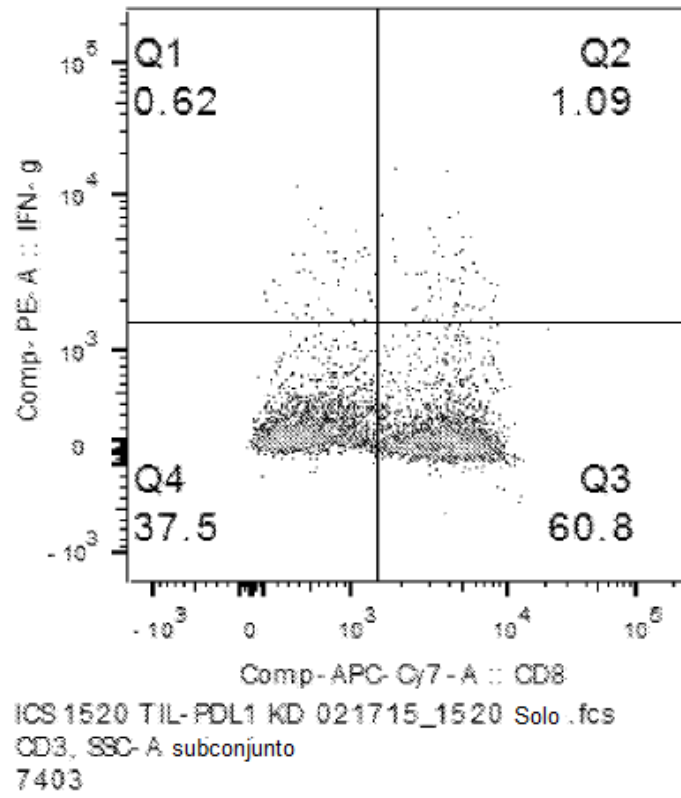


FIG. 16A

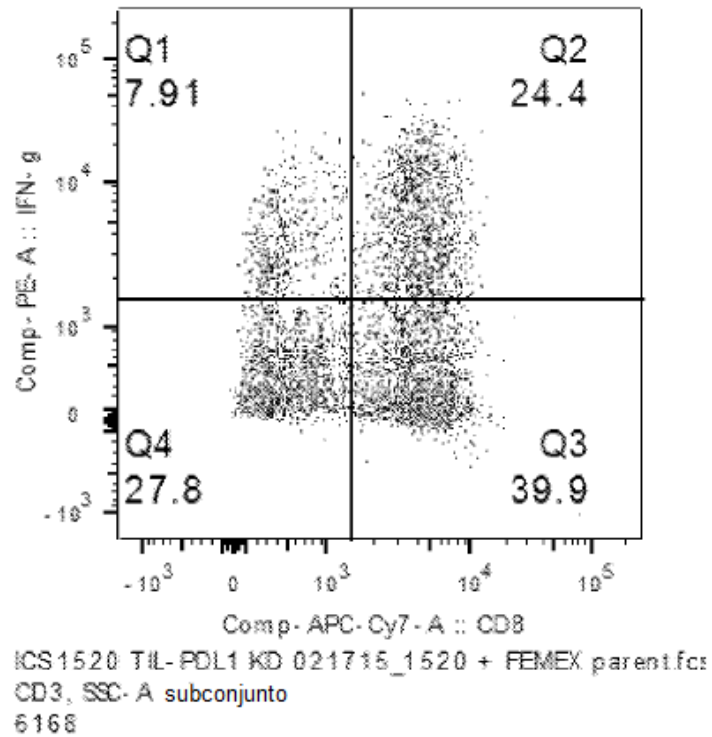
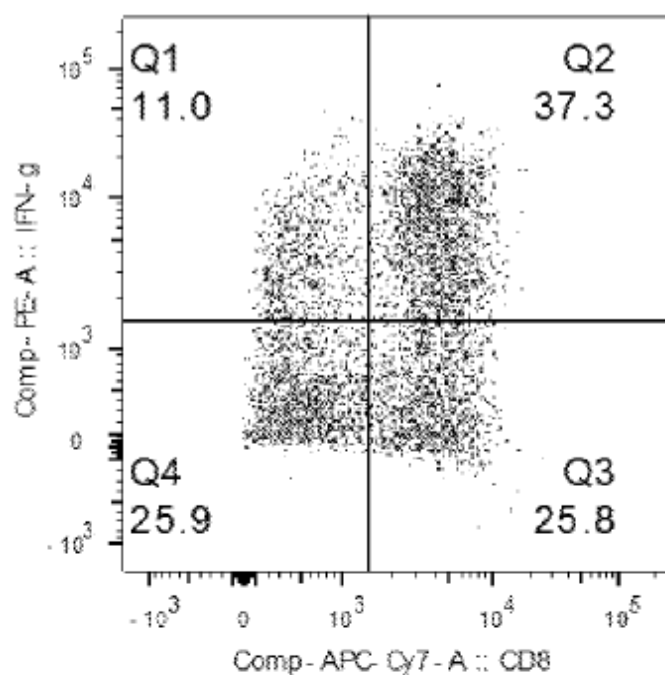


FIG 16B



ICS1520 TIL-FDL1 KD 021715_1520 + FEMEX parental + bloqueo
 CD3, SSC-A subconjunto
 7035

FIG. 16C

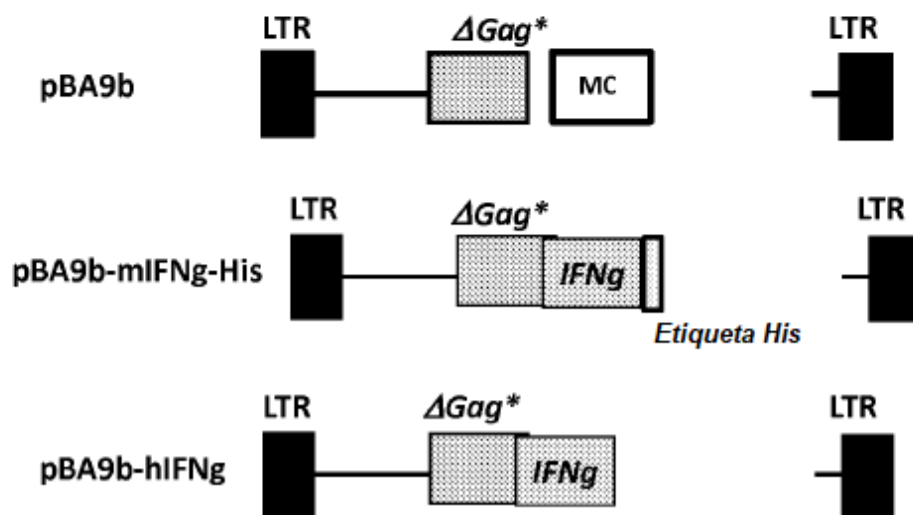


FIG. 17

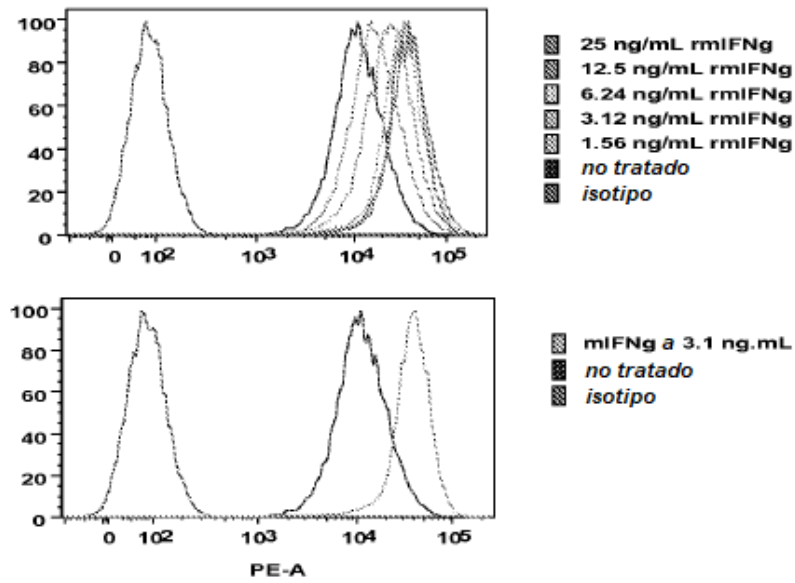


FIG. 18A

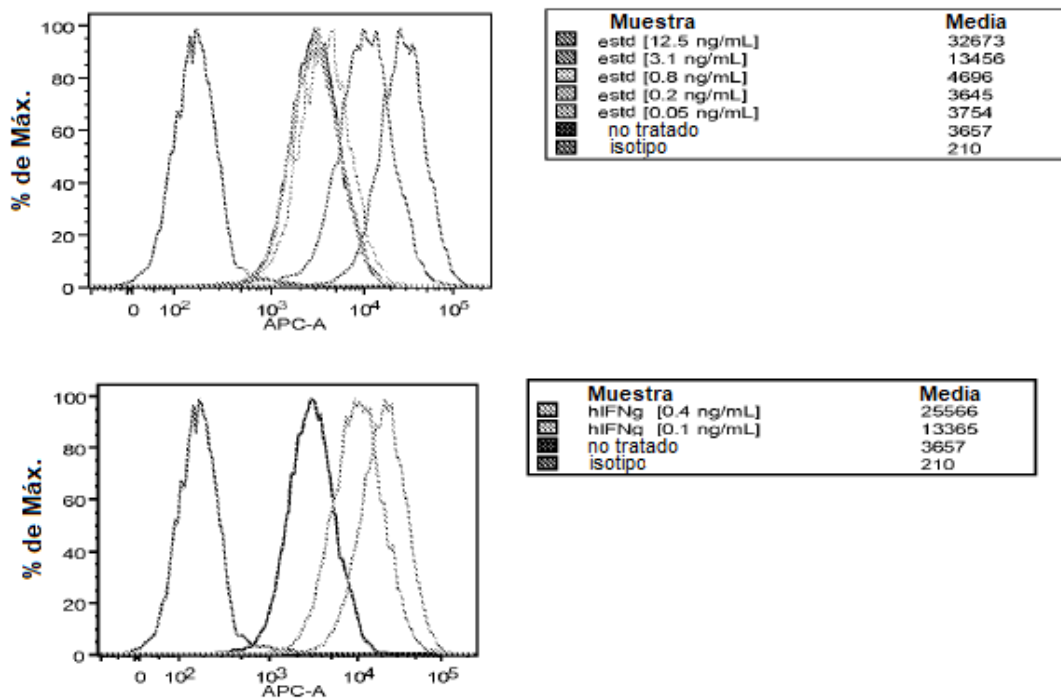


FIG. 18B

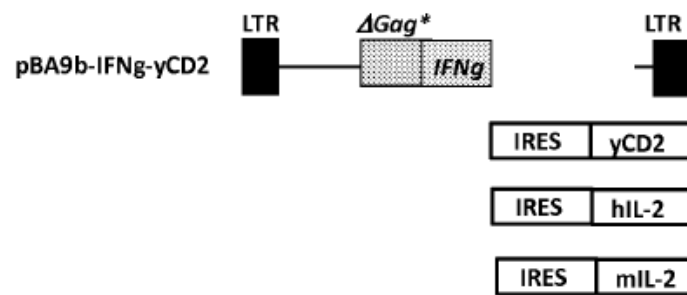


FIG. 19

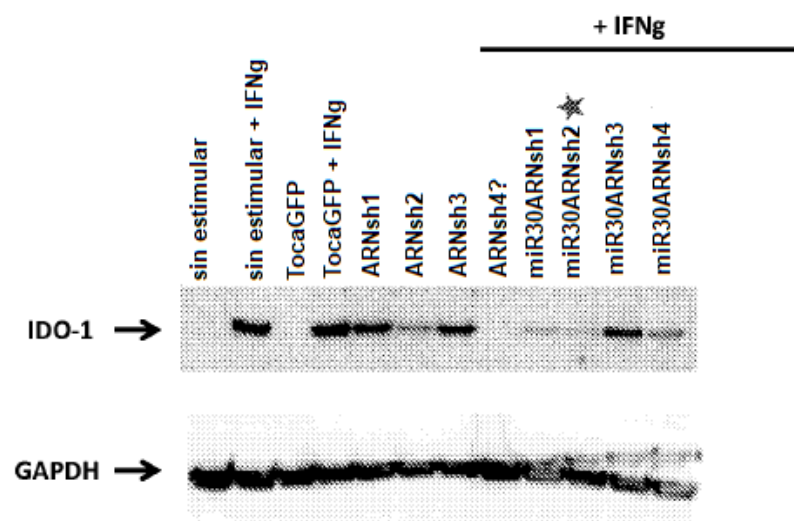


FIG. 20A

3/3

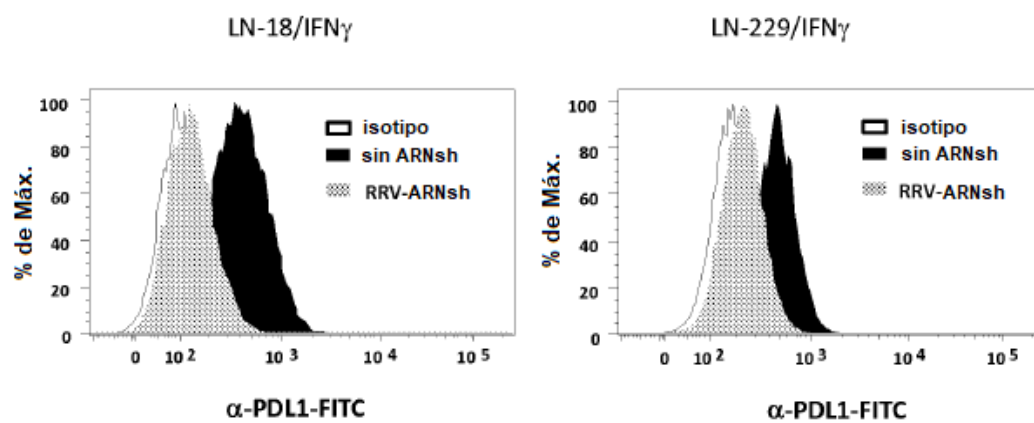


FIG. 20B

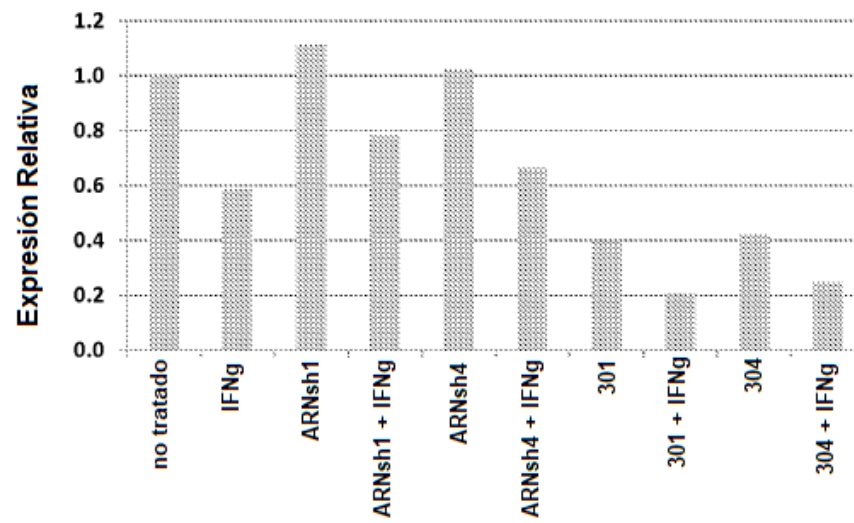


FIG. 20C

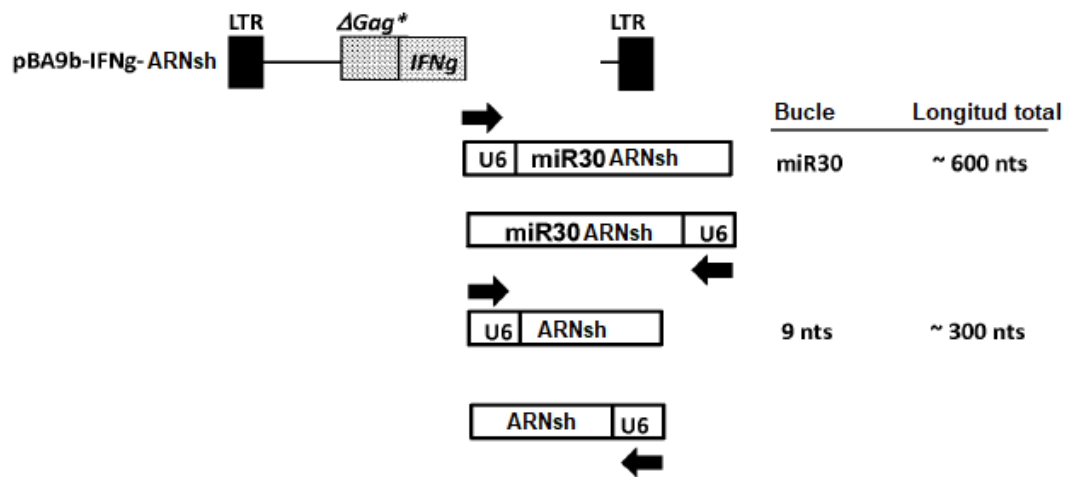


FIG. 21