

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 987 442**

51 Int. Cl.:

C07K 14/705 (2006.01)

C12N 7/00 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 39/235 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.05.2016 PCT/IB2016/052554**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.11.2016 WO16178167**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.05.2016 E 16722384 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.03.2024 EP 3292142**

54 Título: **Adenovirus oncolíticos con mutaciones en epítomos de adenovirus inmunodominantes y su uso en el tratamiento del cáncer**

30 Prioridad:

04.05.2015 US 201562156748 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
14.11.2024

73 Titular/es:

**THERIVA BIOLOGICS S.L. (100.0%)
Torrent de Can Ninou, naves 5-6
08150 Parets del Vallès, Barcelona, ES**

72 Inventor/es:

**ALEMANY, RAMON;
GIL, RAUL y
BAZÁN, MIRIAM**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 987 442 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

Adenovirus oncolíticos con mutaciones en epítomos de adenovirus inmunodominantes y su uso en el tratamiento del cáncer

Campo de la invención

El campo de esta invención en general se refiere a adenovirus oncolíticos con deleciones funcionales de epítomos de células T inmunodominantes de proteínas de adenovirus, así como a métodos de usar los adenovirus oncolíticos para el tratamiento de enfermedades, tal como cáncer.

Antecedentes de la invención

El tratamiento actual contra el cáncer se basa principalmente en quimioterapia, radioterapia, y cirugía. A pesar del alto índice de éxito cuando el tratamiento se aplica en fases tempranas, la mayoría de los casos de enfermedad avanzada no son curables porque los tumores no se pueden extirpar por cirugía o las dosis de radio y quimioterapia que se pueden administrar están limitadas por la toxicidad hacia células normales. Para aliviar este problema, se han desarrollado estrategias de biotecnología que buscan mayor selectividad y potencia. Entre ellas, la terapia génica y viroterapia usan virus con un fin terapéutico contra el cáncer. En terapia génica, el virus se modifica para evitar su replicación y para funcionar como un vehículo o vector de material genético terapéutico. En cambio, la viroterapia usa virus que se replican y propagan selectivamente en células tumorales. En viroterapia, la célula tumoral muere por el efecto citopático causado por la replicación del virus dentro de la célula más que por el efecto de un gen terapéutico. La replicación preferente en una célula tumoral se conoce como oncolisis. En un sentido estricto, los virus que se replican selectivamente en tumores se llaman oncolíticos, aunque en un sentido más amplio la palabra oncolítico se puede aplicar a cualquier virus competente en replicación capaz de lisar células tumorales, incluso sin selectividad. En esta descripción el término oncolítico se usa en ambos sentidos.

La inmunoterapia se basa en el uso del sistema inmunitario para eliminar un tumor. La principal idea de tratamiento es estimular o restablecer la capacidad del sistema inmunitario para reconocer células tumorales y activar células efectoras para destruirlas selectivamente. Las diferentes inmunoterapias se dividen en dos grupos: a) pasiva, que se dirige a mejorar la inmunidad antitumoral existente; y b) activa, que implica estimular directamente el sistema inmunitario de un paciente para desencadenar una respuesta antitumoral. Las inmunoterapias pasivas incluyen anticuerpos monoclonales que bloquean señales que suprimen el sistema inmunitario, tal como Ipilimumab (CTLA-4), Nivolumab (PD-1), o MDX-1105 (PD-L1) (Pardoll, D.M., Nat Rev Cancer. 22 Mar 2012;12(4):252-64). En este grupo, también encontramos la transferencia de células T autólogas. Hay varias técnicas que confieren capacidad antitumoral, pero todas implican algún grado de manipulación ex vivo de células. La manipulación ex vivo de células incluye: a) estimular células contra un antígeno tumoral y amplificar estas células específicamente, y b) introducir receptores específicos de tumor insertando un receptor de células T (TCR) de alta afinidad transgénico para un antígeno asociado a tumor o sustituir el TCR con un receptor de antígeno quimérico (CAR) (Kalos, M. y June, C.H., Immunity 25 Jul 2013;39(1):49-60). En el caso de terapias activas, un enfoque es reactivar o reestimar el sistema inmunitario de un paciente in vivo. Por ejemplo, el uso de la citoquina inmunoestimuladora IL-2 se ha usado durante más de una década para tratar melanoma y carcinoma renal (Amin, A. y White, R.L. Jr., Oncology (Williston Park). Jul 2013;27(7):680-91). Además, TNF- α (van Horssen, R., et al., Oncologist. Abr 2006;11(4):397-408) e IFN de tipo I y II (Kotredes, K.P. y Gamero, A.M., J Interferon Cytokine Res. Abr 2013;33(4):162-70) se han usado en el tratamiento del cáncer. Por último, uno de los campos con más desarrollo en los últimos años ha sido las vacunas terapéuticas (Myc, L.A., et al., Arch Immunol Ther Exp (Warsz). Ag 2011;59(4):249-59). Se ha usado una amplia gama de preparaciones para inmunizar, incluyendo vacunas basadas en ADN (Bei, R. y Scardino A., J Biomed Biotechnol. 2010;2010:102758), vacunas basadas en péptidos (Arens, R., et al., Semin Immunol. Abr 2013;25(2):182-90; Vacchelli, E., et al., Oncoimmunology. 1 Dic 2012;1(9):1557-1576), vacunas basadas en células dendríticas (Bonaccorsi, I., et al., Immunol Lett. Sep-Oct 2013;155(1-2):6-10; Palucka, K. y Banchereau, J., Immunity. 25 Jul 2013;39(1):38-48), y vacunas basadas en vectores víricos (Larocca, C. y Schlom, J., Cancer J. Sep-Oct 2011;17(5):359-71). A pesar de los grandes esfuerzos hechos hasta ahora, la eficacia de este tipo de terapia permanece limitada. Los principales obstáculos para superar son inmunosupresión tumoral y el poder y especificidad de la respuesta inducida.

La viroterapia contra el cáncer es más antigua que la terapia génica. Los primeros informes sobre curas de cáncer con virus datan del principio del siglo pasado. En 1912, De Pace obtuvo regresiones tumorales después de inoculación del virus de la rabia en carcinomas cervicales (De Pace N., Ginecología 1912:82-89). Desde De Pace 1912, muchos tipos de virus se han inyectado en tumores para tratarlos. Hay virus que presentan un oncotropismo natural tal como parvovirus autónomo, virus de la estomatitis vesicular, y reovirus. Otros virus se pueden manipular genéticamente para lograr la replicación selectiva en tumores. Por ejemplo, el virus del herpes simple (HSV) se ha hecho oncotrópico delecionando el gen de la ribonucleótido reductasa, una actividad enzimática no necesaria en células que experimentan proliferación activa tal como células tumorales. Sin embargo, adenovirus, debido a su baja patogenicidad y alta eficacia para infectar células tumorales, ha sido el virus más comúnmente usado en viroterapia y terapia génica del cáncer.

El uso de virus replicativo en viroterapia de cáncer se basa en la idea de que, como resultado de la replicación vírica, las células tumorales se destruyen y la progenie vírica liberada infecta las células circundantes. Después de múltiples rondas de replicación, se logra la destrucción total del tumor. En principio, solo unas pocas se infectan inicialmente, pero el efecto replicativo del virus genera una reacción en cadena de modo que el virus se expande a lo largo de la masa tumoral. Una vez el virus alcanza e infecta células normales en la periferia, el virus no es capaz de replicarse en ellas debido a su selectividad tumoral, y el tejido normal no sufre efectos patogénicos.

Hay diferentes aspectos a considerar cuando se elige una especie vírica para viroterapia de cáncer. Los adenovirus son virus sin envuelta de 70-90 nm de diámetro con una cápside icosaédrica. Su genoma es ADN bicatenario, lineal que varía entre 25-45 kilobases de tamaño con repeticiones terminales invertidas (ITR) en ambos extremos y una proteína terminal unida a los extremos 5' (Russell, W.C., J Gen Virol 2009 90:1-20). Los adenovirus tienen un ciclo replicativo lítico y por tanto destruyen las células en que se replican. Además, el extenso conocimiento de la biología de los adenovirus y la posibilidad de manipular el ADN de adenovirus hacen fácil conferir selectividad, mejorar otras características tal como infectividad de células tumorales, y aumentar la potencia oncolítica por varias estrategias. Además, es un virus que tiene una tasa de mutación muy baja y patología muy leve en pacientes inmunocompetentes. Además, la capacidad replicativa de adenovirus es alta, lo que permite que se produzca en cantidades muy concentradas (10^{12} - 10^{13} partículas de virus (pv)/ml).

La cápside icosaédrica está formada por tres proteínas principales, de las cuales los trímeros de hexón son las más abundantes (Nemerow, G.R., et al. Virology 2009 384:380-8). Cada uno de los doce vértices de la cápside también contiene una proteína pentamérica, una base pentón que está covalentemente unida a la fibra. La fibra es una proteína trimérica que sobresale de la base pentón y es una estructura de tipo varilla nudosa. Otras proteínas víricas IIIa, IVa2, VIII, y IX también se asocian con la cápside vírica. Las proteínas VII, péptido pequeño *mu*, y una proteína terminal (TP) se asocian con ADN. La proteína V proporciona un enlace estructural a la cápside a través de la proteína VI.

La proteína hexón es la proteína de la cápside más abundante y representa el 63% de la masa de proteína total del virus. La proteína tiene diferentes regiones estructurales bien definidas. Los dominios V1 y V2 forman la base de cada subunidad. Estos dominios adoptan una conformación de "doble barril" o "doble rollo de gelatina" y dan la forma homotrimérica pseudohexagonal, que permite mayor ensamblaje de las cubiertas víricas. Estas estructuras están separadas por la región VC en la base y el bucle DE2 en la mitad superior. Estas regiones están muy conservadas y por tanto desempeñan un papel importante en estabilizar V1 y V2. DE1, FG1 y FG2 forman la parte superior del trímero. Las zonas DE1 y FG1 contienen áreas muy variables y flexibles cuyas estructuras no se han determinado. Estas áreas se llaman regiones hipervariables (HVR). Se pueden hacer varias modificaciones en las HVR sin afectar el ensamblaje del virus (Roberts, D.M., et al., Nature. 11 May 2006;441(7090):239-43; Alba, R., et al., Blood. 30 Jul 2009;114(5):965-71; Matthews, Q.L., Mol Pharm. 7 Feb 2011;8(1):3-11).

Los adenovirus humanos se clasifican en la familia Adenoviridae. Se han identificado cincuenta y siete serotipos de adenovirus humanos y agrupado en seis grupos diferenciados, A a G. El adenovirus humano de tipo 5 (Ad5), que pertenece al grupo C, consiste en una cápside proteica icosaédrica que contiene un ADN lineal bicatenario de 36 kilobases (kb). Los adenovirus dependen de la maquinaria celular para replicar el genoma vírico. Pueden infectar células quiescentes e inducir las a un estado similar a la fase S del ciclo celular que permite la replicación del ADN vírico. El genoma de Ad5 tiene ocho unidades transcripcionales solapantes en ambas hebras del ADN. Las ocho unidades se agrupan según la cronología de los transcritos: genes inmediatos tempranos (E1A), tempranos (E1B, E2, E3, E4), intermedios (IX, IVa), y tardíos (L1-L5) (Russell, W.C., J Gen Virol 2009 90:120). En los extremos del genoma hay dos secuencias ITR que son idénticas entre sí y contienen los orígenes de replicación del ADN vírico. Una señal de empaquetamiento del virión formada por secuencias ricas en adenina y timina está presente en el extremo izquierdo del genoma.

En adultos, la infección por Ad5 con frecuencia es asintomática y produce resfriados y conjuntivitis en niños. En términos generales, Ad5 infecta células epiteliales, que en una infección natural son las células epiteliales bronquiales. Entra en la célula por medio de la interacción de la fibra, que se extiende como una antena desde los doce vértices de la cápside, con una proteína celular implicada en adhesión intercelular conocida como receptor de Coxsackie-adenovirus (CAR). Cuando el ADN del virus alcanza el núcleo, la transcripción de los genes tempranos (E1 a E4) empieza. Los primeros genes que se expresan son los de la región temprana 1A (E1A). E1A se une a la proteína celular pRb (proteína de retinoblastoma) para liberar el factor de transcripción E2F para activar la transcripción de otros genes víricos tal como E2, E3 y E4, y de genes celulares que activan el ciclo celular. Por otra parte, E1B se une al factor de transcripción p53 para activar el ciclo celular y para inhibir la apoptosis de la célula infectada. E2 codifica proteínas para la replicación del virus. E3 codifica proteínas que inhiben la respuesta inmunitaria antivírica. E4 codifica proteínas implicadas en el transporte de ARN vírico. La expresión de genes tempranos produce la replicación del genoma y, una vez replicado, la activación del principal promotor tardío. Este promotor dirige la expresión de un ARNm que se procesa por ajuste diferencial para dar todos los ARN que codifican las proteínas estructurales que forman la cápside.

Hay dos puntos importantes a considerar con respecto al diseño de adenovirus oncolíticos: selectividad y potencia. Para alcanzar selectividad hacia una célula tumoral, se han usado tres estrategias: la delección de funciones del virus requeridas para la replicación en células normales, pero que son dispensables para la replicación en células tumorales;

la sustitución de promotores víricos con promotores selectivos de tumores, por ejemplo, que dirigen la expresión de genes que inician la replicación vírica bajo promotores selectivos de tumores; y la modificación de las proteínas de la cápside del virus implicadas en la infección de la célula huésped. Con tales modificaciones genéticas, se ha obtenido un nivel considerable de selectividad, con una eficacia de replicación en una célula tumoral 10000 veces mayor que en una célula normal.

Los adenovirus requieren la maquinaria de la célula huésped para la replicación de su material genético. Por tanto, mutaciones o deleciones en los genes víricos implicados en la activación de la replicación celular o inhibición de apoptosis generan virus de replicación condicional. En contraste, las células tumorales tienen tanto rutas del ciclo celular activadas como apoptóticas inhibidas, que permiten que los adenovirus que portan mutaciones o deleciones en los genes víricos implicados en la activación de la replicación celular o inhibición de la apoptosis se repliquen. Por ejemplo, p53 se activa en una célula infectada y su efecto es normalmente bloqueado por E1b-55K. Dado que p53 está mutada en aproximadamente el 50% de los tumores, el virus dl1520 (ONYX-015) se usó como un virus oncolítico (Bischoff, J.R., et al., *Science*. 18 Oct 1996; 274(5286):373-6). Este virus tiene una deleción de 827 pb del gen E1b-55K. El mecanismo de selectividad se basa en el hecho de que una célula normal con p53 funcional entra en apoptosis antes de permitir que el ciclo replicativo del virus se complete. Sin embargo, las células tumorales con p53 no funcional (u otros trastornos que afectan la regulación) permiten al virus replicarse normalmente (Hall, A.R., et al., *Nat Med*. Sep 1998; 4(9):1068-72; Rothmann, T., et al., *J Virol*. Dic 1998;72(12):9470-8; Goodrum, F.D. y Ornelles, D.A., *J Virol*. Dic 1998;72(12):9479-90).

En otra estrategia para alcanzar selectividad, deleciones parciales de E1A producen replicación restringida en células normales, pero permiten la replicación en células diana, tal como células cancerosas. Se han creado virus de replicación condicional que presentan una deleción de 24 pares de bases en la CR2 (región constante 2) y se ha mostrado que son potentes y selectivos en el tratamiento de glioma y xenoinjertos de cáncer de mama (Fueyo, J., et al., *Oncogene* 2000 19:212; Heise, C., et al., *Nat Med* 2000 6(10):1139-9). Su especificidad de cáncer resulta de la incapacidad de E1A disfuncional de liberar el factor de transcripción E2F1, que produce el requisito de E2F1 libre. E2F1 es abundante en células cancerosas, donde la ruta de pRb está con la mayor frecuencia alterada (Hanahan, D. y Weinberg, R.A., *Cell*. 7 Ene 2000; 100(1):57-70).

Otra estrategia para conferir selectividad tumoral es el uso de adenovirus que portan deleciones de genes VA-RNA de adenovirus (Cascalló, M., et al., *Cancer Res*. 1 Sep 2003;63(17):5544-50; Cascalló, M., et al., *Hum Gene Ther*. Sep 2006;17(9):929-40) y que dependen de la activación de la ruta RAS o truncamiento de la ruta de interferón comúnmente presente en células tumorales.

Otra estrategia para conferir selectividad tumoral es limitar la expresión de genes de adenovirus esenciales para la replicación vírica usando promotores específicos para ciertos tipos de tumores. Se han generado adenovirus con varios promotores específicos, tal como el promotor de α -fetoproteína (Hallenbeck, P.L., et al., *Hum Gene Ther*. 1 Jul 1999; 10(10):1721-33). Este virus se replica selectivamente en células de hepatocarcinoma que sobreexpresan α -fetoproteína. Similarmente, se han construido virus que controlan la expresión de E1A usando 1) un promotor derivado del gen del antígeno específico de próstata (PSA) humano para alcanzar replicación selectiva en células de cáncer de próstata que expresan PSA (Rodríguez, R., et al., *Cancer Res*. 1 Jul 1997;57(13):2559-63), 2) un promotor de osteocalcina humana (hOC) para alcanzar replicación selectiva en células de cáncer de próstata que expresan hOC (Hsieh et al., *Cancer Res*. 1 Jun 2002;62(11):3084-92), y 3) un promotor DF3/MUC1 para alcanzar replicación selectiva en células de cáncer de mama MUC1-positivas (Kurihara, T., et al., *J Clin Invest*. Sep 2000;106(6):763-71).

En contraste con promotores específicos para ciertos tipos de tumores, los promotores que responden al factor de transcripción E2F, tal como el promotor E2F-1, permiten la expresión de genes de adenovirus esenciales para la replicación vírica en una amplia gama de tumores (Cascalló, M., et al., *Mol Ther*. Sep 2007;15(9):1607-15; Johnson, L., et al., *Cancer Cell*. May 2002;1(4):325-37; Rojas, J.J., et al., *Gene Ther*. Dic 2009;16(12):1441-51; Tsukuda, K., et al., *Cancer Res*. 15 Jun 2002;62(12):3438-47). En células normales, la expresión de un gen de adenovirus esencial de un promotor E2F-1 sería inhibida debido a la asociación de E2F con pRb. En células tumorales, sin embargo, hay niveles aumentados de E2F "libre" como consecuencia de la ausencia de hiperfosforilación de pRb, que produce la expresión del gen de adenovirus esencial del promotor E2F-1. Por ejemplo, el adenovirus ICOVIR15K (SEQ ID NO: 1) contiene sitios de unión a E2F palindrómicos insertados en el promotor E1A endógeno. La inserción de estos sitios permite la expresión selectiva de la proteína E1A Δ 24 en células altamente replicativas, tal como células cancerosas. Además, la proteína E1A Δ 24 de ICOVIR15K porta una deleción del sitio de unión a pRb de E1A que hace el adenovirus mutante incapaz de disociar pRb de E2F en células normales quiescentes.

Un ejemplo de una modificación de una proteína de cápside de virus para lograr selectividad es la eliminación del sitio de unión de sulfato de heparina glucosaminoglicano (HSG) KKTK (SEQ ID NO: 26) del eje de la fibra para reducir el tropismo hepático (Bayo-Puxan, N., et al., *Hum Gene Ther*. Oct 2009; 20(10):1214-21). En el adenovirus ICOVIR15K, esto se logró sustituyendo el sitio de unión a HSG KKTK (SEQ ID NO: 26) en el eje de la fibra con un motivo de unión a integrina (RGDK) (SEQ ID NO: 27). Esta modificación en el adenovirus ICOVIR15K mejora la proporción de transducción tumor/hígado con respecto a una fibra de virus de tipo salvaje, aumenta el perfil de toxicidad, aumenta la infectividad del virus de células cancerosas, y aumenta la eficacia antitumoral en modelos experimentales in vivo (Rojas, J.J., et al., *Gene Ther*. Abr 2012;19(4):453-7).

Con respecto a la potencia oncolítica, se han descrito varias modificaciones genéticas para aumentarla también. Estas modificaciones afectan o bien la entrada del virus en la célula o la liberación de virus de la célula. Para aumentar la etapa de entrada, las proteínas de la cápside que el virus usa para infectar la célula se han modificado. Por ejemplo, la inserción del péptido RGD (motivo arginina-glicina-asparagina) en la fibra permite a los adenovirus usar integrinas para acoplarse en la célula y no solo internalizarse como es el caso con adenovirus de tipo salvaje. El uso de integrinas como receptores celulares del virus aumenta la infectividad y la potencia oncolítica.

Respecto a las modificaciones que aumentan la liberación de virus de la célula infectada, estas modificaciones incluyen la delección de E1b-19K, la sobreexpresión de E3-11.6K (ADP), y localización de la proteína E3/19K en la membrana plasmática. E1b-19K es un inhibidor de apoptosis homólogo de Bcl-1. La delección de E1b-19K aumenta la muerte celular por apoptosis prematura de la célula infectada. Esta apoptosis prematura con frecuencia produce una producción de virus total menor en muchas líneas celulares infectadas; sin embargo, acelera la liberación rápida de virus y, a su vez, la propagación de virus en un cultivo celular. Según esto, los mutantes que no expresan E1b-19K presentan un fenotipo de placa grande comparados con el adenovirus de tipo salvaje en ensayo de placa. La proteína E3-11.6K (ADP) desempeña un papel en la lisis de la célula infectada y la sobreexpresión de ADP aumenta la liberación del virus acumulado dentro del núcleo. El fenotipo de virus que sobreexpresan ADP también se caracteriza por placas grandes y la presencia de más virus en el sobrenadante de células infectadas. La sobreexpresión de ADP se ha logrado por dos mecanismos: 1) eliminación de otros genes E3 excepto ADP, o excepto ADP y E3-12.5K; y 2) inserción del gen de ADP después de un promotor fuerte. Eliminar los otros genes E3 excepto ADP, o excepto ADP y E3-12.5K, elimina otros sitios de ajuste en el pre-ARNm dirigido por el promotor E3. Sin la competición para estos sitios de ajuste, el procesamiento del ARNm que codifica ADP se favorece.

Otra estrategia usada para aumentar la potencia oncolítica de adenovirus es la inserción de un gen terapéutico en el genoma del adenovirus oncolítico para generar un “adenovirus oncolítico armado”. En este caso, el gen terapéutico tendría que mediar la muerte de células tumorales no infectadas por medio de la activación de un profármaco con efecto espectador (esto quiere decir, que destruye las células vecinas no infectadas), la activación del sistema inmunitario contra el tumor, la inducción de la apoptosis, la inhibición de la angiogénesis, o la eliminación de la matriz extracelular, entre otras. En estos casos, el modo y tiempo de expresión del gen terapéutico será crítico en el resultado final del enfoque terapéutico.

Respecto a los virus oncolíticos armados con un gen terapéutico para activar el sistema inmunitario contra el tumor, las células viralmente infectadas son superiores en la administración de antígeno no vírico (es decir, antígeno tumoral) para presentación cruzada (Schulz, O., et al., *Nature*. 24 Feb 2005;433(7028):887-92), y se esperaría que la muerte celular viralmente inducida aumentara la disponibilidad de los antígenos asociados a tumor para la absorción por células dendríticas (CD) (Moehler, M.H., et al., *Hum Gene Ther*. Ago 2005;16(8):996-1005) y posteriormente aumentar la estimulación de células T citotóxicas. Además, la infección vírica puede alterar el equilibrio de producción de citoquinas del tumor, y posteriormente afectar la naturaleza de la reacción inmunitaria al tumor, es decir, al contrarrestar la naturaleza inmunosupresora del microentorno tumoral (Prestwich, R.J., et al., *Expert Rev Anticancer Ther*. Oct 2008;8(10):1581-8). Lo más importante, los virus se pueden manipular para expresar proteínas muy inmunógenas tal como factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF). Cuando se expresan proteínas inmunógenas en células tumorales, son estimuladores potentes de inmunidad antitumoral específica y de larga duración. La introducción de genes inmunoterapéuticos en células tumorales y, además, su traducción a proteínas, produce la activación de la respuesta inmunitaria y destrucción más eficaz de células tumorales. Las células inmunitarias más relevantes a este respecto son las células citolíticas naturales (NK) y las células T CD8+ citotóxicas.

La respuesta inmunitaria contra el virus oncolítico es uno de los parámetros a considerar en el desarrollo de viroterapias. Con respecto a la respuesta inmunitaria del huésped, dos posiciones aparentemente opuestas están en juego. Una es que el sistema inmunitario es una barrera que elimina el virus oncolítico antes de que pueda destruir todas las células tumorales. La otra es que el virus es un vehículo para inducir una respuesta inmunitaria antitumoral.

Los términos “inmunodominancia” e “inmunodominante” se usaron originalmente en las décadas de 1960 y 1970 para referirse a respuestas inmunitarias humores particularmente potentes a determinantes antigénicos específicos (Curtiss, L.K. y Krueger, R.G., *Immunochemistry*. Dic 1975;12(12):949-57; Johnston et al., *J Pathol Bacteriol*. Abr 1968;95(2):477-80). Algunos años después, diferentes autores describieron que la respuesta a varios patógenos en ratones experimentales estaba restringida a ciertos alelos de H-2 dependiendo del patógeno o que la respuesta principal estaba restringida a H-2 específico de alelo (Biddison et al., *J. Ex. Med.* 1 Dic 1978; 148(6):1678-86; Doherty P.C. y Zinkernagel R.M., *Nature*. 3 Jul 1975;256(5512):50-2). También se describió que alelos H-2 específicos están unidos a baja sensibilidad o no sensibilidad para un determinante antigénico determinado (Bennink, J.R. y Yewdell, J.W., *J Exp Med*. 1 Nov 1988;168(5):1935-9). Según avanzó el conocimiento respecto a la naturaleza peptídica de los determinantes antigénicos, se describió la existencia de determinantes inmunodominantes o subdominantes según la cantidad de antígeno requerido para inducir una respuesta inmunitaria detectable (Sercarz, E.E., et al., *Annu Rev Immunol*. 1993;11:729-66). La inmunodominancia del epítipo se refiere al fenómeno que se observa después de la infección con un virus o bacteria, que tiene múltiples antígenos y genera cientos o miles de péptidos que pueden ser presentados por entre 3 a 6 alelos diferentes (en seres humanos) a MHC de clase I. Sin embargo, solo un pequeño número de estos epítipos son realmente presentados por ciertos alelos de MHC y son capaces de generar una

respuesta (Yewdell, J.W. y Del Val, M., *Immunity*. Ago 2004;21(2):149-53). Hay diferentes factores implicados en inmunodominancia de epítipo, incluyendo: antecedentes inmunitarios, ruta de infección, abundancia de proteínas víricas y procesamiento de antígenos, transporte y estabilidad del complejo péptido/MHC, coexpresión de múltiples alelos de MHC, frecuencia de células T precursoras en el repertorio de células indiferenciadas, interacción MHC/TCR, generación de CTL de memoria, y generación de células T reguladoras (Treg). En conjunto, los parámetros más importantes para definir una jerarquía de inmunodominancia son que un epítipo se procese de forma eficaz y tener al menos una afinidad umbral mínima para anclaje a un alelo de MHC determinado (Beekman et al., *J Immunol*. 15 Feb 2000;164(4):1898-905; Seifert et al., *J Clin Invest*. Jul 2004;114(2):250-9; Sette, A., et al., *J Immunol*. 15 Dic 1994;153(12):5586-92; Regner et al., *Viral Immunol*. 2001;14(2):135-49). En ausencia de estas características mínimas, un epítipo no se diferenciaría de la multitud de péptidos no inmunógenos producidos durante el proceso normal de degradación de proteínas.

A pesar de los esfuerzos hasta la fecha, todavía es necesario encontrar nuevos enfoques terapéuticos eficaces en el tratamiento del cáncer.

Compendio de la invención

Los inventores han encontrado sorprendentemente que adenovirus oncolíticos que comprenden al menos una delección funcional de un epítipo de células T inmunodominante de una proteína de adenovirus producen un cambio inmunitario de una respuesta inmunitaria anti-adenovirus a una respuesta inmunitaria antitumoral en un mamífero. Por tanto, la presente invención proporciona novedosos adenovirus oncolíticos con mutaciones en epítopos de células T inmunodominantes de proteínas de adenovirus y métodos para su uso para el tratamiento de enfermedades, tal como cáncer. También se proporcionan polinucleótidos que comprenden secuencias de ácidos nucleicos que codifican los adenovirus oncolíticos. También se proporcionan composiciones (por ejemplo, composiciones farmacéuticas) que comprenden los novedosos adenovirus oncolíticos.

Por tanto, en un aspecto la invención proporciona un adenovirus oncolítico, en donde dicho adenovirus oncolítico es capaz de replicarse en una célula tumoral, y en donde dicho adenovirus se selecciona del grupo que consiste en:

- (i) un adenovirus que comprende una mutación V721A en el epítipo Hex713 (YLNHTFKKV) (SEQ ID NO: 11), una mutación A900S en el epítipo Hex892 (LLYANSAHA) (SEQ ID NO: 15) y una mutación a V925K en el epítipo Hex917 (YVLFEVFDV) (SEQ ID NO: 19); y
- (ii) un adenovirus que comprende una mutación L520P en el epítipo Hex512 (GLVDCYINL) (SEQ ID NO: 23), una mutación V721A en el epítipo Hex713 (YLNHTFKKV) (SEQ ID NO: 11), una mutación A900S en el epítipo Hex892 (LLYANSAHA) (SEQ ID NO: 15) y una mutación a V925K en el epítipo Hex917 (YVLFEVFDV) (SEQ ID NO: 19).

La invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende una dosis farmacológicamente eficaz de un adenovirus oncolítico de la invención y uno o más soportes o excipientes farmacéuticamente aceptables.

La invención también proporciona el adenovirus oncolítico de la presente invención para uso como un medicamento.

La invención también proporciona el adenovirus oncolítico de la presente invención para uso en el tratamiento o la prevención de cáncer o una enfermedad premaligna que conduce a cáncer en un mamífero.

La invención también proporciona un polinucleótido aislado que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 3, 4, y 5.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Representación esquemática de las modificaciones del hexón en el adenovirus oncolítico ICOVIR15K-gp100-tyr (SEQ ID NO: 2).

Figura 2. Representación esquemática de diez pases (P) en serie de adenovirus que muestra efecto citopático (CPE).

Figura 3. Ensayo de placa de los virus oncolíticos ICOVIR15K (SEQ ID NO: 1), ICOVIR15K-TD (SEQ ID NO: 3), ICOVIR15K-gp100-tyr (SEQ ID NO: 2), e ICOVIR15K-TD-gp100-tyr (SEQ ID NO: 4).

Figura 4. Citotoxicidad de los virus oncolíticos ICOVIR15K, ICOVIR15K-TD, ICOVIR15K-gp100-tyr, e ICOVIR15K-TD-gp100-tyr y sus correspondientes valores CI_{50} .

Figura 5A-B. Ensayo de producción vírica de los virus oncolíticos ICOVIR15K, ICOVIR15K-TD, ICOVIR15K-gp100-tyr, e ICOVIR15K-TD-gp100-tyr. La figura 5A muestra el número total de unidades de transducción (UT) por ml producido por cada virus a diferentes tiempos tras la infección. La figura 5B muestra el número de UT/ml liberadas por cada virus a diferentes tiempos tras la infección.

Figura 6A-C. Afinidad de unión de epítomos mutados en ICOVIR15K-gp100-tyr comparado con epítomos de tipo salvaje en HAd5. La figura 6A muestra las curvas de afinidad de HLA-A2.1 para epítomos adenovíricos mutados. La figura 6B muestra las curvas de afinidad de HLA-A2.1 para epítomos tumorales. La figura 6C muestra los valores Kd y la funcionalidad para cada mutación.

Figura 7. Inmunización de ratones HLA-A2.1 transgénicos con ICOVIR15K-gp100-tyr con o sin la triple delección. La inmunización principal se hizo con virus inactivo dado IM y el refuerzo se hizo con administración intravenosa de virus activo, ambas a 10^{10} vp/ratón. Se realizó ELISPOT usando 2.500.00 de esplenocitos por pocillo. Conjunto Hx (conjunto de hexón). Los esplenocitos indiferenciados se infectaron con ICOVIR15K-gp100-tyr (15K-gp-tyr) o ICOVIR15K-TD-gp100-tr (15K-TD-pgtyr) durante 24 h y después se añadió a los esplenocitos de ratones inmunizados en el ensayo ELISPOT.

Figura 8A-D. La figura 8A muestra el diseño experimental para vacunar ratones transgénicos HHD con diferentes adenovirus oncolíticos incluyendo ICOVIR15K-TD-gp100-tyr. Se dio una única dosis de 10^{10} partículas víricas (vp) de virus inactivo por vía intramuscular (IM) el día 0, después una dosis de refuerzo de 10^{10} vp el día 14 usando una inyección intravenosa de virus activo. Después de 21 días, los ratones se provocaron con 10^6 células B16CAR-A2. Se siguieron la aparición de crecimiento tumoral (8B) y el crecimiento (8C) a lo largo del tiempo hasta que se realizó el análisis ELISPOT de esplenocitos. La figura 8D muestra las curvas de supervivencia trazadas usando GraphPad Prism. Se estableció que el punto final era 500 mm³. N = 12 sitios de inyección por grupo y N = 6 ratones por grupo.

Figura 9. Evaluación de citotoxicidad de adenovirus oncolíticos que portan mutaciones TD (ICOVIR15K-TD; SEQ ID NO: 3) o QD (ICOVIR15K-QD; SEQ ID NO: 5) comparados con el parental (ICOVIR15K) con el fin de determinar sus valores CI50. Se infectaron células A549 a diferentes MOI y la supervivencia celular se evaluó 6 días tras la infección con un ensayo BCA. Los valores CI50 se calcularon usando GraFit.

Figura 10A-B. Afinidad de unión a péptidos de epítomos mutados Hex512 y Hex917 en ICOVIR15K-QD comparados con los epítomos de tipo salvaje en HAd5. La figura 10A muestra las curvas de afinidad de HLA-A2.1 para Hex512 y Hex917 mutados. La figura 10B muestra los valores Kd y la funcionalidad de cada mutación.

Figura 11A-B. Eficacia antitumoral comparativa de ICOVIR15K e ICOVIR15K-QD en ratones C57BL/6 A2/KbH-2+ transgénicos. Se inyectaron células B16CAR-A2 por vía subcutánea en ambos flancos de ratones y se dejó que se formaran tumores. Los tumores se inyectaron por vía intratumoral con ICOVIR15K, ICOVIR15K-QD, o PBS. La figura 11A muestra el volumen tumoral. La figura 11B muestra la regresión tumoral. Los virus se inyectaron a 10^{10} vp/tumor el día 0. N = 7-9 tumores por grupo.

Figura 12A-C. Eficacia antitumoral comparativa de ICOVIR15K e ICOVIR15K-QD en ratones HHD transgénicos. La figura 12A es un esquema que muestra que se inyectaron células B16CAR-A2 por vía subcutánea en ambos flancos de ratones y se dejó que se formaran tumores. 9 días tras la inyección, los tumores del lado derecho se inyectaron por vía intratumoral con ICOVIR15K (N = 6), ICOVIR15K-QD (N = 5), o PBS (N = 4) a 10^{10} vp/tumor (día 0). Los tumores del lado izquierdo se dejaron sin tratar para todos los grupos. La figura 12B muestra el volumen de los tumores directamente inyectados. La figura 12C muestra el volumen de los tumores no inyectados (contralateral) (N = 6-7 tumores por grupo).

Figura 13. Respuestas inmunitarias generados después de la administración intratumoral de 10^{10} vp/tumor de ICOVIR15K o ICOVIR15K-QD en ratones HLA-A2.1 transgénicos que portan tumores B16CAR-A2. Se realizó ELISPOT usando 2.500.00 de esplenocitos por pocillo. B16 + INF se refiere a reactividad contra tumores B16CAR-A2 previamente incubados con IFN- γ .

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona adenovirus oncolíticos que comprenden una mutación V721A en el epítipo Hex713, una mutación A900S en el epítipo Hex892 y una mutación a V925K en el epítipo Hex917 o una mutación L520P en el epítipo Hex512, una mutación V721A en el epítipo Hex713, una mutación A900S en el epítipo Hex892 y una mutación a V925K en el epítipo Hex917. Polinucleótidos relacionados y composiciones que comprenden los adenovirus oncolíticos. Se proporcionan además los adenovirus oncolíticos novedosos para uso como un medicamento o para uso en el tratamiento o la prevención de cáncer o una enfermedad premaligna que conduce a cáncer en un mamífero.

I. Definiciones

Para facilitar el entendimiento de la presente invención, un número de términos y frases se definen a continuación.

El término "adenovirus" como se hace referencia en el presente documento indica más de 52 subtipos de adenovirus aislados de seres humanos, y otros tantos de otros mamíferos y aves. Véase, por ejemplo, Strauss, S.E., "Adenovirus Infections in Humans," en The Adenoviruses, Ginsberg, ed., Plenum Press, Nueva York, N.Y., pp. 451-496 (1984). Al

término “adenovirus” se puede hacer referencia en el presente documento con la abreviatura “Ad” seguida por un número que indica el serotipo, por ejemplo, Ad5.

Como se usa en el presente documento, el término “adenovirus oncolítico” significa un adenovirus que es capaz de replicarse o que es competente para replicación en una célula tumoral. Son diferentes de un adenovirus no replicante porque un adenovirus no replicante es incapaz de replicarse en la célula diana. Los adenovirus no replicantes se usan en terapia génica como portadores de genes a células diana, ya que el fin es expresar el gen terapéutico en la célula intacta y no la lisis de la célula. Al contrario, la acción terapéutica de los adenovirus oncolíticos se basa en la capacidad de replicarse y lisar la célula diana, y mediante ello eliminar la célula tumoral. Como se usa en el presente documento, los adenovirus oncolíticos incluyen tanto adenovirus competentes para replicación capaces de lisar células tumorales, incluso sin selectividad, como adenovirus oncolíticos que se replican selectivamente en tumores.

Como se usa en el presente documento, el término “vector adenovírico competente para replicación” o “adenovirus competente para replicación” se refiere a cualquier vector adenovírico o adenovirus, respectivamente, que no es deficiente en ninguna función génica requerida para la replicación vírica en células o tejidos específicos. El vector o adenovirus es capaz de replicarse y empaquetarse, pero podría replicarse selectivamente o solo condicionalmente en células o tejidos específicos.

Como se usa en el presente documento, un “adenovirus oncolítico específico de tumor” es un adenovirus que selectivamente destruye células de un trastorno proliferativo, por ejemplo, células cancerosas. Un “adenovirus oncolítico específico de tumor” preferentemente inhibe la proliferación celular, produce lisis celular, o induce apoptosis (colectivamente considerados destrucción) en una población celular predeterminada con un fenotipo determinado que apoya la replicación del virus. Tales virus son incapaces de o están limitados en la capacidad de inhibir proliferación celular, producir lisis celular, inducir apoptosis, o de otra manera replicarse en células que no tienen el fenotipo celular predeterminado. La destrucción de células cancerosas se puede detectar por cualquier método establecido en la técnica, tal como determinar el recuento de células viables, efecto citopático, apoptosis de células neoplásicas, síntesis de proteínas víricas en las células cancerosas (por ejemplo, por marcaje metabólico, análisis de inmunotransferencia de proteínas víricas, o transcripción inversa reacción en cadena de la polimerasa de genes víricos necesarios para la replicación), o reducción en tamaño de un tumor.

Como se usa en el presente documento, una “deleción funcional de un epítipo de células T inmunodominante” se refiere a cualquier mutación (es decir, inserción, sustitución, o deleción) en la secuencia codificante de un epítipo de células T inmunodominante que produce al menos aproximadamente una reducción de 10 veces en la afinidad de unión a HLA-A2 del epítipo.

El término “epítipo” o “determinante antigénico” se usan de forma intercambiable en el presente documento y se refiere a esa porción de un antígeno capaz de ser reconocido por el sistema inmunitario (por ejemplo, células T, células B y anticuerpos). Cuando el antígeno es un polipéptido, se pueden formar epítopos tanto de aminoácidos contiguos como de aminoácidos no contiguos yuxtapuestos por plegamiento terciario de una proteína. Los epítopos formados de aminoácidos contiguos típicamente se retienen tras la desnaturalización de la proteína, mientras los epítopos formados por plegamiento terciario típicamente se pierden tras la desnaturalización de la proteína. Un epítipo típicamente incluye al menos 3, y más habitualmente, al menos 5 u 8-10 aminoácidos en una conformación espacial única. El término “epítipo de células T inmunodominante” se refiere a un epítipo o determinante antigénico de un antígeno que es fácilmente reconocido por el sistema inmunitario y provoca una respuesta robusta de células T CD4⁺ o CD8⁺ comparado a otros epítopos del mismo antígeno o de otros antígenos procesados simultáneamente por la célula.

Como se usa en el presente documento, un adenovirus que tiene “citotoxicidad sustancialmente reducida” se refiere a un adenovirus que tiene aproximadamente una reducción de 2 veces o mayor en su valor CI₅₀ (multiplicidad de infección requerida para alcanzar el 50% de citotoxicidad celular) en células A549 5 días tras la infección comparado con el adenovirus parental.

Como se usa en el presente documento, un adenovirus que tiene “replicación vírica sustancialmente reducida” se refiere a un adenovirus que tiene una reducción mayor de aproximadamente una unidad logarítmica en tamaño de estallido vírico total (cantidad de partículas víricas producidas por una célula infectada) en células A549 60 horas tras la infección en comparación con el adenovirus parental.

Un polipéptido, anticuerpo, polinucleótido, vector, célula, o composición que está “aislado” es un polipéptido, anticuerpo, polinucleótido, vector, célula, o composición que está en una forma no encontrada en la naturaleza. Los polipéptidos, anticuerpos, polinucleótidos, vectores, células o composiciones aislados incluyen los que se han purificado a un grado que ya no están en una forma en la que se encuentran en la naturaleza. En algunos aspectos, un anticuerpo, polinucleótido, vector, célula, o composición que está aislada es sustancialmente puro.

Como se usa en el presente documento, “sustancialmente puro” se refiere a material que es al menos el 50% puro (es decir, libre de contaminantes), al menos el 90% puro, al menos el 95% puro, al menos el 98% puro, o al menos el 99% puro.

Como se usa en el presente documento, el término “trastorno proliferativo” se refiere a cualquier trastorno celular en el que las células proliferan más rápidamente que el crecimiento de tejido normal. Un trastorno proliferativo incluye, pero no está limitado a, cáncer.

Los términos “cáncer” y “canceroso” se refieren o describen el estado fisiológico en mamíferos en el que una población de células se caracteriza por crecimiento celular no regulado. Los ejemplos de cáncer incluyen, pero no están limitados a carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia. Los ejemplos más particulares de tales cánceres incluyen cáncer nasofaríngeo, cáncer sinovial, cáncer hepatocelular, cáncer renal, cáncer de tejidos conjuntivos, melanoma, cáncer de pulmón, cáncer de intestino, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer colorrectal, cáncer de cerebro, cáncer de garganta, cáncer oral, cáncer de hígado, cáncer de huesos, cáncer pancreático, coriocarcinoma, gastrinoma, feocromocitoma, prolactinoma, leucemia/linfoma de células T, neuroma, enfermedad de von Hippel-Lindau, síndrome de Zollinger-Ellison, cáncer suprarrenal, cáncer anal, cáncer del conducto biliar, cáncer de vejiga, cáncer de uréter, oligodendroglioma, neuroblastoma, meningioma, tumor de médula espinal, osteocondroma, condrosarcoma, sarcoma de Ewing, cáncer de sitio primario desconocido, carcinoide, carcinoide del aparato digestivo, fibrosarcoma, cáncer de mama, enfermedad de Paget, cáncer cervical, cáncer de esófago, cáncer de vesícula biliar, cáncer de cabeza, cáncer de ojo, cáncer de cuello, cáncer de riñón, tumor de Wilms, sarcoma de Kaposi, cáncer de próstata, cáncer testicular, enfermedad de Hodgkin, linfoma no hodgkiniano, cáncer de piel, mesotelioma, mieloma múltiple, cáncer ovárico, cáncer pancreático endocrino, glucagonoma, cáncer pancreático, cáncer paratiroideo, cáncer de pene, cáncer hipofisiario, sarcoma de tejido blando, retinoblastoma, cáncer de intestino delgado, cáncer de estómago, cáncer de timo, cáncer de tiroides, cáncer trofoblástico, mola hidatidiforme, cáncer uterino, cáncer endometrial, cáncer de vagina, cáncer de vulva, neuroma acústico, micosis fungoides, insulinoide, síndrome carcinoide, somatostatinoide, cáncer de las encías, cáncer de corazón, cáncer de labios, cáncer de meninges, cáncer de boca, cáncer de nervio, cáncer del paladar, cáncer de la glándula parótida, cáncer del peritoneo, cáncer de faringe, cáncer pleural, cáncer de glándula salivar, cáncer de lengua, y cáncer de amígdala.

“Tumor” y “neoplasia” se refieren a cualquier masa de tejido que resulta de excesivo crecimiento celular o proliferación, ya sea benigno (no canceroso) o maligno (canceroso) incluyendo lesiones precancerosas. Los ejemplos de tumores incluyen, pero no están limitados a, adenocarcinoma, adenoma, astrocitoma, carcinoma, condroma, condrosarcoma, cistadenoma, disgerminoma, leucemia eritroide, fibroma, fibrosarcoma, tumor de células granulosas, hemangioma, hemangiosarcoma, leiomioma, leiomiosarcoma, tumor de células de Leydig, lipoma, liposarcoma, leucemia linfoblástica, leucemia linfocítica, linfoma, histiocitosis maligna, melanoma maligno, tumor de células cebadas, melanocitoma, meningioma, mesotelioma, mieloma múltiple, leucemia mieloide, oligodendroglioma, osteoma, osteosarcoma, plasmacitoma, rabiomioma, rabiomiosarcoma, seminoma, tumor de células de Sertoli, sarcoma de tejidos blandos, carcinoma de células escamosas, papiloma escamoso, sarcoma de células de transición, timoma, y carcinoma de células de transición.

Los términos “célula cancerosa”, “célula tumoral”, y equivalentes gramaticales se refieren a la población total de células derivadas de un tumor o una lesión precancerosa, incluyendo tanto células no tumorigénicas, que comprende la mayoría de la población de células del tumor, como células madre tumorigénicas (células madre cancerosas). Como se usa en el presente documento, el término “célula tumoral” se modificará por el término “no tumorigénica” cuando se refiere solamente a esas células tumorales que carecen de la capacidad de renovarse y diferenciarse para distinguirlas de esas células tumorales a partir de células madre cancerosas.

El término “sujeto” se refiere a cualquier animal (por ejemplo, un mamífero) incluyendo, pero no limitado a, seres humanos, primates no humanos, roedores, y similares, que va a ser el receptor de un tratamiento particular. Típicamente, los términos, “sujeto” y “paciente” se usan de forma intercambiable en el presente documento en referencia a un sujeto humano.

La administración “en combinación con” uno o más agentes terapéuticos adicionales incluye la administración simultánea (concurrente) y consecutiva en cualquier orden.

Los términos “formulación farmacéutica” y “composición farmacéutica” se refieren a una preparación que está en tal forma que permite que la actividad biológica del principio activo sea eficaz, y que no contiene componentes adicionales que sean inaceptablemente tóxicos para un sujeto al que se administraría la formulación. Tales formulaciones y composiciones pueden ser estériles.

El término “sales farmacéuticamente aceptables” o “soporte farmacéuticamente aceptable” se pretende que incluya sales de los compuestos activos que se preparan con ácidos o bases relativamente no tóxicos, dependiendo de los sustituyentes particulares encontrados en los compuestos descritos en el presente documento. Cuando los compuestos de la presente solicitud contienen funcionalidades relativamente ácidas, se pueden obtener sales de adición de base poniendo en contacto la forma neutra de tales compuestos con una cantidad suficiente de la base deseada, ya sea pura o en un solvente inerte adecuado. Los ejemplos de sales de adición de base farmacéuticamente aceptables incluyen sal de sodio, potasio, calcio, amonio, amino orgánico, o magnesio, o una sal similar. Cuando los compuestos de la presente solicitud contienen funcionalidades relativamente básicas, se pueden obtener sales de adición de ácido poniendo en contacto la forma neutra de tales compuestos con una cantidad suficiente del ácido

deseado, ya sea puro o en un solvente orgánico adecuado. Los ejemplos de sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables incluyen las derivadas de ácidos inorgánicos tal como ácidos clorhídrico, bromhídrico, nítrico, carbónico, monohidrogenocarbónico, fosfórico, monohidrogenofosfórico, dihidrogenofosfórico, sulfúrico, monohidrogenosulfúrico, yodhídrico o fosforoso y similares, así como sales derivadas de ácidos orgánicos relativamente no tóxicos como acético, propiónico, isobutírico, maleico, malónico, benzoico, succínico, subérico, fumárico, láctico, mandélico, ftálico, bencenosulfónico, p-tolilsulfónico, cítrico, tartárico, metanosulfónico, y similares. También se incluyen sales de aminoácidos tal como arginato y similares, y sales de ácidos orgánicos como ácidos glucurónico o galacturónico y similares (véase, por ejemplo, Berge, S.M., et al., J Pharm Sci. En 1977;66(1):1-19). Otros soportes farmacéuticamente aceptables que conocen los expertos en la materia son adecuados para composiciones de la presente solicitud. Una "cantidad eficaz" de un adenovirus oncolítico u otro fármaco divulgado en el presente documento es una cantidad suficiente para llevar a cabo un fin específicamente manifestado, tal como un fin terapéutico o profiláctico. Una "cantidad eficaz" se puede determinar empíricamente y de una manera rutinaria, en relación al fin manifestado.

El término "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad de un adenovirus oncolítico u otro fármaco eficaz para "tratar" una enfermedad o trastorno en un sujeto o mamífero. En el caso de cáncer, la cantidad terapéuticamente eficaz del adenovirus oncolítico o fármaco puede reducir el número de células cancerosas; reducir el tamaño del tumor; inhibir (es decir, ralentizar a algún grado y en una cierta forma de realización, parar) la infiltración de células cancerosas en órganos periféricos; inhibir (es decir, ralentizar a algún grado y en una cierta forma de realización, parar) la metástasis tumoral; inhibir, a algún grado, el crecimiento tumoral; y/o aliviar a algún grado uno o más de los síntomas asociados con el cáncer. Véase la definición en el presente documento de "tratar". El grado al que el adenovirus oncolítico o fármaco puede prevenir el crecimiento y/o destruir las células cancerosas existentes, puede ser citostático y/o citotóxico. Una "cantidad profilácticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, a dosis y durante periodos de tiempo necesarios, para alcanzar el resultado profiláctico deseado. Típicamente, pero no necesariamente, puesto que una dosis profiláctica se usa en sujetos antes de o en una fase más temprana de la enfermedad, la cantidad profilácticamente eficaz será menor que la cantidad terapéuticamente eficaz.

Los términos "dosis" y "dosificación" se usan de forma intercambiable en el presente documento. Una dosis se refiere a la cantidad de principio activo dado a un individuo en cada administración. La dosis variará dependiendo de un número de factores, incluyendo el intervalo de dosis normales para una terapia determinada, frecuencia de administración; tamaño y tolerancia del individuo; gravedad de la afección; riesgo de efectos secundarios; y la ruta de administración. Un experto en la materia reconocerá que la dosis se puede modificar dependiendo de los factores anteriores o basado en la evolución terapéutica. El término "forma posológica" se refiere al formato particular del fármaco o la composición farmacéutica, y depende de la vía de administración. Por ejemplo, una forma posológica puede estar en forma líquida para nebulización, por ejemplo, para inhalantes, en un comprimido o líquido, por ejemplo, para la administración oral, o una solución salina, por ejemplo, para inyección.

La palabra "marcador" cuando se usa en el presente documento se refiere a un compuesto o composición detectable que está conjugado directa o indirectamente a una partícula vírica o un polipéptido de modo que genera una partícula vírica o polipéptido "marcado". El marcador puede ser detectable por sí mismo (por ejemplo, marcadores radioisótopos o marcadores fluorescentes) o, en el caso de un marcador enzimático, puede catalizar la alteración química de un compuesto o composición sustrato que es detectable.

Un "agente quimioterapéutico" es un compuesto químico útil en el tratamiento de cáncer, independientemente del mecanismo de acción. Las clases de agentes quimioterapéuticos incluyen, pero no están limitadas a: agentes alquilantes, antimetabolitos, alcaloides vegetales venenos del huso, antibióticos citotóxicos/antitumorales, inhibidores de topoisomerasa, anticuerpos, fotosensibilizadores, e inhibidores de quinasas. Los agentes quimioterapéuticos incluyen compuestos usados en "terapia dirigida" y quimioterapia convencional.

Términos tales como "que trata" o "tratamiento" o "tratar" o "que alivia" o "aliviar" se refieren tanto a 1) medidas terapéuticas que curan, ralentizan, reducen síntomas de, y/o detienen la evolución de un estado patológico o trastorno diagnosticado como 2) medidas profilácticas o preventivas que previenen y/o ralentizan el desarrollo de un estado patológico o trastorno objetivo. Por tanto, esos en necesidad de tratamiento incluyen esos ya con el trastorno, los propensos a tener el trastorno; y esos en los que el trastorno se va a prevenir. En ciertas formas de realización, un sujeto se "trata" con éxito para cáncer según los métodos de la presente invención si el paciente muestra uno o más de los siguientes: una reducción en el número de o ausencia completa de células cancerosas; una reducción en el tamaño del tumor; inhibición de o ausencia de infiltración de células cancerosas en órganos periféricos incluyendo, por ejemplo, la propagación de cáncer en tejido blando y hueso; inhibición de o una ausencia de metástasis tumoral; inhibición o una ausencia de crecimiento tumoral; alivio de uno o más síntomas asociados con el cáncer específico; morbilidad y mortalidad reducidas; mejora en la calidad de vida; reducción en tumorigenicidad, frecuencia tumorigénica, o capacidad tumorigénica, de un tumor; reducción en el número o frecuencia de células madre cancerosas en un tumor; diferenciación de células tumorigénicas a un estado no tumorigénico; o alguna combinación de efectos.

"Polinucleótido" o "ácido nucleico", como usan de forma intercambiable en el presente documento, se refieren a polímeros de nucleótidos de cualquier longitud, e incluyen ADN y ARN. Los nucleótidos pueden ser

desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos, nucleótidos o bases modificados, y/o sus análogos, o cualquier sustrato que se pueda incorporar en un polímero por ADN o ARN polimerasa. Un polinucleótido puede comprender nucleótidos modificados, tal como nucleótidos metilados y sus análogos. Si está presente, la modificación a la estructura del nucleótido se puede impartir antes o después del ensamblaje del polímero. La secuencia de nucleótidos puede estar interrumpida por componentes no nucleotídicos. Un polinucleótido se puede modificar además después de la polimerización, tal como por conjugación con un componente de marcaje. Otros tipos de modificación incluyen, por ejemplo, "caperuzas", sustitución de uno o más de nucleótidos naturales con un análogo, modificaciones internucleotídicas tal como, por ejemplo, esas con enlaces no cargados (por ejemplo, fosfonatos de metilo, fosfotriésteres, fosforamidatos, carbamatos, etc.) y con enlaces cargados (por ejemplo, fosforotioatos, fosforditioatos, etc.), las que contienen fracciones colgantes, tal como, por ejemplo, proteínas (por ejemplo, nucleasas, toxinas, anticuerpos, péptidos señal, poli-L-lisina, etc.), esas con intercaladores (por ejemplo, acridina, psoraleno, etc.), las que contienen quelantes (por ejemplo, metales, metales radioactivos, boro, metales oxidantes, etc.), las que contienen alquilantes, esas con enlaces modificados (por ejemplo, ácidos nucleicos alfa anoméricos, etc.), así como formas sin modificar del/los polinucleótido(s). Además, cualquiera de los grupos hidroxilo normalmente presentes en los azúcares se puede sustituir, por ejemplo, por grupos fosfonato, grupos fosfato, protegidos por grupos protectores estándar, o activados para preparar enlaces adicionales para nucleótidos adicionales, o se pueden conjugar a soportes sólidos. Los OH 5' y 3' terminales pueden estar fosforilados o sustituidos con aminas o fracciones de grupos bloqueantes orgánicos de 1 a 20 átomos de carbono. Otros hidroxilos también se pueden derivar a grupos protectores estándar. Los polinucleótidos también pueden contener formas análogas de los azúcares ribosa o desoxirribosa que en general se conocen en la técnica, por ejemplo, 2'-O-metil-, 2'-O-alil-, 2'-fluoro- o 2'-azido-ribosa, análogos de azúcares carbocíclicos, azúcares alfa-anoméricos, azúcares epiméricos tal como arabinosa, xilosas o lixosas, azúcares piranosas, azúcares furanosas, sedoheptulosas, análogos acíclicos y análogos de nucleósidos abásicos tal como metil ribósido. Uno o más enlaces fosfodiéster se pueden sustituir por grupos enlazadores alternativos. Estos grupos enlazadores alternativos incluyen, pero no están limitados a, aspectos en donde el fosfato se sustituye por P(O)S ("tioato"), P(S)S ("ditioato"), (O)NR₂ ("amidato"), P(O)R, P(O)OR', CO o CH₂ ("formacetal"), en los que cada R o R' es independientemente H o alquilo (1-20 C) sustituido o sin sustituir que opcionalmente contiene un enlace éter (-O-), arilo, alquenilo, cicloalquilo, cicloalquenilo o araldilo. No todos los enlaces en un polinucleótido necesitan ser idénticos. La descripción anterior aplica a todos los polinucleótidos referidos en el presente documento, incluyendo ARN y ADN.

El término "vector" significa una construcción, que es capaz de administrar, y expresar, uno o más gen(es) o secuencia(s) de interés en una célula huésped. Los ejemplos de vectores incluyen, pero no están limitados a, vectores víricos, vectores de expresión de ADN o ARN desnudo, plásmidos, cósmido o vectores fagos, vectores de expresión de ADN o ARN asociados con agentes condensantes catiónicos, vectores de expresión de ADN o ARN encapsulados en liposomas, y ciertas células eucariotas, tal como células productoras.

Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" se usan de forma intercambiable en el presente documento para referirse a polímeros de aminoácidos de cualquier longitud. El polímero puede ser lineal o ramificado, puede comprender aminoácidos modificados, y puede estar interrumpido por no aminoácidos. Los términos también abarcan un polímero de aminoácidos que se ha modificado de forma natural o por intervención, por ejemplo, formación de enlaces disulfuro, glucosilación, lipidación, acetilación, fosforilación, o cualquier otra manipulación o modificación, tal como conjugación con un componente marcador. También se incluyen en la definición, por ejemplo, polipéptidos que contienen uno o más análogos de un aminoácido (incluyendo, por ejemplo, aminoácidos no naturales, etc.), así como otras modificaciones conocidas en la técnica.

El término "aminoácido" se refiere a aminoácidos naturales y sintéticos, así como a análogos de aminoácidos y miméticos de aminoácidos que funcionan de una manera similar a los aminoácidos naturales. Los aminoácidos naturales son los codificados por el código genético, así como esos aminoácidos que se modifican después, por ejemplo, hidroxiprolina, γ -carboxiglutamato, y O-fosfoserina. Análogos de aminoácidos se refiere a compuestos que tienen la misma estructura química básica que un aminoácido natural, es decir, un carbono que está unido a un hidrógeno, un grupo carboxilo, un grupo amino, y un grupo R, por ejemplo, homoserina, norleucina, sulfóxido de metionina, metionina metil sulfonio. Tales análogos tienen grupos R modificados (por ejemplo, norleucina) o esqueletos peptídicos modificados, pero retienen la misma estructura química básica que un aminoácido natural. Miméticos de aminoácidos se refiere a compuestos químicos que tienen una estructura que es diferente de la estructura química general de un aminoácido, pero que funciona de una manera similar a un aminoácido natural.

Los términos "idéntico" o "porcentaje de identidad" en el contexto de dos o más ácidos nucleicos o polipéptidos, se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales o tienen un porcentaje especificado de nucleótidos o residuos de aminoácidos que son iguales, cuando se comparan y alinean (introduciendo huecos, si es necesario) para máxima correspondencia, sin considerar ninguna sustitución de aminoácidos conservadoras como parte de la identidad de secuencia. El porcentaje de identidad se puede medir usando software o algoritmos de comparación de secuencias o por inspección visual. Se conocen varios algoritmos y software en la técnica que se pueden usar para obtener alineamientos de secuencias de aminoácidos o nucleótidos. Un ejemplo no limitante de un algoritmo de alineamiento de secuencia es el algoritmo descrito en Karlin, S. y Altschul, S.F., Proc Natl Acad Sci USA. Marzo 1990;87(6):2264-2268, modificado en Karlin, S. y Altschul, S.F., Proc Natl Acad Sci USA. 15 Jun 1993;90(12):5873-5877, e incorporado en los programas NBLAST y XBLAST (Altschul, S.F., et al., Nucleic Acids Res. 1 Sep 1997;25(17):3389-402). En ciertos aspectos, se puede usar Gapped BLAST como se describe en Altschul et al.,

BLAST-2, WU-BLAST-2 (Altschul, S.F. y Gish, W., *Methods Enzymol.* 1996;266:460-80.), ALIGN, ALIGN-2 (Genentech, South San Francisco, California) o Megalign (DNASTAR) son programas de software públicamente disponibles adicionales que se pueden usar para alinear secuencias. En ciertos aspectos, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de nucleótidos se determina usando el programa GAP en el software in GCG (por ejemplo, usando una matriz NWSgapdna. CMP y un peso de hueco de 40, 50, 60, 70, o 90 y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5, o 6). En ciertos aspectos alternativos, el programa GAP en el paquete de software GCG, que incorpora el algoritmo de Needleman y Wunsch (*J. Mol. Biol.* (48):444-453 (1970)) se puede usar para determinar el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos (por ejemplo, usando o bien una matriz Blossum 62 o una matriz PAM250, y un peso de hueco de 16, 14, 12, 10, 8, 6, o 4 y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5). Alternativamente, en ciertos aspectos, el porcentaje de identidad entre secuencias de nucleótidos o aminoácidos se determina usando el algoritmo de Myers y Miller (CABIOS, 4:11-17 (1989)). Por ejemplo, el porcentaje de identidad se puede determinar usando el programa ALIGN (versión 2.0) y usando una PAM120 con una tabla de residuos, una penalización de longitud de hueco de 12 y una penalización de hueco de 4. Los parámetros apropiados para máximo alineamiento por software de alineamiento particular los puede determinar un experto en la materia. En ciertos aspectos, se usan los parámetros por defecto del software de alineamiento. En ciertos aspectos, el porcentaje de identidad "X" de una primera secuencia de aminoácidos respecto a una segunda secuencia de aminoácidos se calcula como $100 \times (Y/Z)$, donde Y es el número de residuos de aminoácidos puntuados como coincidencias idénticas en el alineamiento de la primera y segunda secuencias (alineadas por inspección visual o un programa de alineamiento de secuencias particular) y Z es el número total de residuos en la segunda secuencia. Si la longitud de una primera secuencia es mayor que la segunda secuencia, el porcentaje de identidad de la primera secuencia respecto a la segunda secuencia será más larga que el porcentaje de identidad de la segunda secuencia respecto a la primera secuencia.

Como ejemplo no limitante, si un polinucleótido particular tiene un cierto porcentaje de identidad de secuencia (por ejemplo, es al menos aproximadamente el 80% idéntico, al menos aproximadamente el 85% idéntico, al menos aproximadamente el 90% idéntico, y en algunos aspectos, al menos aproximadamente el 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% idéntico) respecto a una secuencia de referencia se puede, en algunos aspectos, determinar usando el programa Bestfit (Paquete de análisis de secuencias de Wisconsin, Versión 8 para Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive, Madison, WI 53711). Bestfit usa el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, *Advances in Applied Mathematics* 2: 482-489 (1981), para encontrar el mejor segmento de homología entre dos secuencias. Cuando se usa Bestfit o cualquier otro programa de alineamiento de secuencia para determinar si una secuencia particular es, por ejemplo, el 95% idéntica a una secuencia de referencia según la presente divulgación, los parámetros se ajustan de modo que el porcentaje de identidad se calcula sobre la longitud completa de la secuencia de nucleótidos de referencia y que se permiten huecos en homología de hasta el 5% del número total de nucleótidos en la secuencia de referencia.

En algunos aspectos, dos ácidos nucleicos o polipéptidos de la divulgación son sustancialmente idénticos, lo que significa que tienen al menos aproximadamente el 70%, al menos aproximadamente el 75%, al menos aproximadamente el 80%, al menos aproximadamente el 85%, al menos aproximadamente el 90%, y en algunos aspectos, al menos aproximadamente el 95%, 96%, 97%, 98%, 99% de identidad de nucleótidos o residuos de aminoácidos, cuando se comparan y alinean para máxima correspondencia, medido usando un algoritmo de comparación de secuencias o por inspección visual. En ciertos aspectos, existe identidad sobre una región de las secuencias que tiene al menos aproximadamente 10, aproximadamente 20, aproximadamente 40-60 residuos de longitud o cualquier valor entero entre ellos, o sobre una región más larga de 60-80 residuos, al menos aproximadamente 90-100 residuos, o las secuencias son sustancialmente idénticas sobre la longitud total de las secuencias que se comparan, tal como la región codificante de una secuencia de nucleótidos, por ejemplo.

Una "sustitución de aminoácidos conservadora" es una en la que un residuo de aminoácido se sustituye con otro residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. Se han definido en la técnica familias de residuos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares, incluyendo cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares sin carga (por ejemplo, asparragina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (por ejemplo, glicina, alanina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales beta-ramificadas (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Por ejemplo, la sustitución de una fenilalanina por una tirosina es una sustitución conservadora. En ciertos aspectos, las sustituciones conservadoras en las secuencias de los polipéptidos y anticuerpos de la divulgación no anulan la unión del polipéptido o anticuerpo que contiene la secuencia de aminoácidos, al/los antígeno(s), es decir, el FOLR1 al que se une el polipéptido o anticuerpo. Los métodos de identificar las sustituciones conservadoras de nucleótidos y aminoácidos que no eliminan la unión a antígeno se conocen bien en la técnica (véase, por ejemplo, Brummell, D.A., et al., *Biochemistry*. 2 Feb 1993;32(4):1180-7; Kobayashi, H., et al., *Protein Eng.* Oct 1999;12(10):879-84; y Burks, E.A., et al., *Proc Natl Acad Sci U S A*. 21 Ene 1997;94(2):412-7).

La frase "condiciones de hibridación rigurosas" se refiere a condiciones en las que una sonda hibridará con su subsecuencia diana, típicamente en una mezcla compleja de ácidos nucleicos, pero no a otras secuencias. Las condiciones rigurosas son dependientes de la secuencia y serán diferentes en diferentes circunstancias. Las secuencias más largas hibridan específicamente a mayores temperaturas. Se encuentra una guía extensa para las condiciones de hibridación de ácidos nucleicos en Tijssen, P., *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular*

Biology - Hybridization with Nucleic Probes. 1993;24:19-78. En general, las condiciones rigurosas se seleccionan para que sean aproximadamente 5-10°C menos que el punto de fusión térmico (T_m) para la secuencia específica a un pH de fuerza iónica definida. La T_m es la temperatura (en fuerza iónica, pH y concentración nucleica definidas) a la que el 50% de las sondas complementarias a la diana hibridan a la secuencia diana en equilibrio (como las secuencias diana están presentes en exceso, a la T_m , el 50% de las sondas están ocupadas en equilibrio). Las condiciones rigurosas también se pueden lograr con la adición de agentes desestabilizantes tal como formamida. Para hibridación selectiva o específica, una señal positiva es hibridación de al menos dos veces el fondo, preferiblemente 10 veces el fondo. Las condiciones de hibridación rigurosas ejemplares pueden ser como sigue: formamida al 50%, SSC 5x, y SDS al 1%, incubando a 42°C, o, SSC 5x, SDS al 1%, incubando a 65°C, con lavado en SSC 0,2x y SDS al 0,1% a 65°C.

Los ácidos nucleicos que no hibridan entre sí en condiciones rigurosas son todavía sustancialmente idénticos si los polipéptidos que codifican son sustancialmente idénticos. Esto se produce, por ejemplo, cuando una copia de un ácido nucleico se crea usando la máxima degeneración de codones permitida por el código genético. En tales casos, los ácidos nucleicos típicamente hibridan en condiciones de hibridación moderadamente rigurosas. Las "condiciones de hibridación moderadamente rigurosas" ejemplares incluyen una hibridación en un tampón de formamida al 40%, NaCl 1 M, SDS al 1% a 37°C, y un lavado en SSC 1X a 45°C. Una hibridación positiva es al menos dos veces el fondo. Los expertos en la materia reconocerán fácilmente que se pueden utilizar condiciones de hibridación y lavado alternativas para proporcionar condiciones de rigurosidad similar. Se proporcionan directrices adicionales para determinar los parámetros de hibridación en numerosas referencias, por ejemplo, y Current Protocols in Molecular Biology, ed. Ausubel, et al., John Wiley & Sons.

Para PCR, una temperatura de aproximadamente 36°C es típica para amplificación de baja rigurosidad, aunque las temperaturas de hibridación pueden variar entre aproximadamente 32°C y 48°C dependiendo de la longitud del cebador. Para amplificación de PCR de alta rigurosidad, una temperatura de aproximadamente 62°C es típica, aunque las temperaturas de hibridación de alta rigurosidad pueden variar desde aproximadamente 50°C a aproximadamente 65°C dependiendo de la longitud del cebador y la especificidad. Las condiciones de ciclo típicas para amplificaciones tanto de alta como de baja rigurosidad incluyen una fase de desnaturalización de 90°C a 95°C durante de 30 segundos a 2 minutos, una fase de hibridación que dura de 30 segundos a 2 minutos, y una fase de extensión de aproximadamente 72°C durante de 1 a 2 minutos. Se proporciona protocolos y directrices para reacciones de amplificación de baja y alta rigurosidad, por ejemplo, en Innis, M.A., et al., PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Academic Press, Inc. N.Y. (1990).

El término "recombinante" cuando se usa con referencia, por ejemplo, a una célula, o ácido nucleico, proteína, o virus, o vector, indica que la célula, ácido nucleico, proteína, virus o vector se ha modificado por o es el resultado de métodos de laboratorio. Así, por ejemplo, las proteínas recombinantes incluyen proteínas producidas por métodos de laboratorio. Las proteínas recombinantes pueden incluir residuos de aminoácidos no encontrados en la forma nativa (no recombinante) de la proteína o pueden incluir residuos de aminoácidos que se han modificado, por ejemplo, marcado. Una célula, virus, ácido nucleico, proteína o vector recombinante puede incluir una célula, virus, ácido nucleico, proteína o vector que se ha modificado por la introducción de un ácido nucleico o proteína heteróloga o la alteración de un ácido nucleico o proteína nativos. Así, por ejemplo, las células recombinantes incluyen células que expresan genes que no se encuentran en la forma nativa (no recombinante) de la célula o expresan genes nativos que de otra manera se expresan anómalamente, subexpresan o no se expresan en absoluto.

El término "heterólogo" cuando se usa con referencia a porciones de un ácido nucleico indica que el ácido nucleico comprende dos o más subsecuencias que no se encuentran en la misma relación entre sí en la naturaleza. Por ejemplo, el ácido nucleico típicamente se produce de forma recombinante, tiene dos o más secuencias de genes no relacionados organizadas para hacer un nuevo ácido nucleico funcional, por ejemplo, un promotor de una fuente y una región codificante de otra fuente. Similarmente, una proteína heteróloga indica que la proteína comprende dos o más subsecuencias que no se encuentran en la misma relación entre sí en la naturaleza (por ejemplo, una proteína de fusión).

Como se usa en el presente documento, el término "modificación" se refiere a un cambio en la secuencia de una secuencia de ácido nucleico o polipéptido. Por ejemplo, las modificaciones de la secuencia de aminoácidos típicamente están en una o más de tres clases: variantes de sustitución, inserción o delección. Las inserciones incluyen fusiones amino y/o carboxi terminales, así como inserciones intrasecuencia de residuos de aminoácidos únicos o múltiples. Las delecciones se caracterizan por la eliminación de uno o más residuos de aminoácidos de la secuencia de la proteína. Como se usa en el presente documento, el símbolo Δ o delta se refiere a una delección. Las modificaciones de sustitución son esas en que al menos un residuo se ha eliminado y un residuo diferente insertado en su lugar. Las sustituciones de aminoácidos son típicamente de residuos únicos, pero se pueden producir en un número de diferentes localizaciones a la vez. Se pueden combinar sustituciones, delecciones, inserciones o cualquier combinación de las mismas para llegar a una construcción final. Estas modificaciones se pueden preparar por modificación de nucleótidos en el ADN que codifica la proteína, produciendo de esta manera ADN que codifica la modificación. Las técnicas para hacer mutaciones de inserción, delección y sustitución en sitios predeterminados en el ADN que tiene una secuencia conocida son bien conocidas. Las técnicas de modificación pueden implicar el uso de tecnología de ADN recombinante para manipular la secuencia de ADN que codifica una o más regiones del polipéptido.

Opcionalmente, las técnicas de modificación incluyen, por ejemplo, recombinación, mutagénesis con cebador M13 y mutagénesis por PCR.

Los términos “transfección”, “transducción”, “transfectar” o “transducir”, se pueden usar de forma intercambiable y se definen como un proceso de introducir una molécula de ácido nucleico o una proteína en una célula. Los ácidos nucleicos se introducen en una célula usando métodos no víricos o víricos. La molécula de ácido nucleico puede ser una secuencia que codifica proteínas completas o porciones funcionales de las mismas. Típicamente, un vector de ácido nucleico, que comprende los elementos necesarios para la expresión de proteínas (por ejemplo, un promotor, sitio de inicio de la transcripción, etc.). Los métodos no víricos de transfección incluyen cualquier método apropiado que no usa ADN vírico o partículas víricas como un sistema de administración para introducir la molécula de ácido nucleico en la célula. Los métodos de transfección no víricos ejemplares incluyen transfección con fosfato de calcio, transfección liposómica, nucleofección, sonoporación, transfección mediante choque térmico, magnetofección y electroporación. Para los métodos víricos, cualquier vector vírico útil se puede usar en los métodos descritos en el presente documento. Los ejemplos de vectores víricos incluyen, pero no están limitados a vectores retrovíricos, adenovíricos, lentivíricos y de virus adenoasociados. En algunos aspectos, las moléculas de ácido nucleico se introducen en una célula usando un vector adenovírico según procedimientos estándar bien conocidos en la técnica. Los términos “transfección” o “transducción” también se refieren a introducir proteínas en una célula del medio externo. Típicamente, la transducción o transfección de una proteína se basa en la unión de un péptido o proteína capaz de cruzar la membrana celular a la proteína de interés. Véase, por ejemplo, Ford, K.G., et al., Gene Ther. Ene 2001;8(1):1-4 y Prochiantz, A., Nat Methods. Feb 2007; 4(2): 119-20.

Un “control” o “control estándar” se refiere a una muestra, medida, o valor que sirve como una referencia, habitualmente una referencia conocida, para comparación a una muestra, medida o valor de prueba. Por ejemplo, una muestra de prueba se puede tomar de un paciente sospechoso de tener una enfermedad determinada (por ejemplo, una enfermedad autoinmunitaria, enfermedad autoinmunitaria inflamatoria, cáncer, enfermedad infecciosa, enfermedad inmunitaria, u otra enfermedad) y compararla a un individuo normal (no enfermo) conocido (por ejemplo, un sujeto control estándar). Un control estándar también puede representar una medida promedio o valor recogido de una población de individuos similares (por ejemplo, sujetos control estándar) que no tienen una enfermedad determinada (es decir, población control estándar), por ejemplo, individuos sanos con unos antecedentes médicos similares, la misma edad, peso, etc. Un valor control estándar también se puede obtener del mismo individuo, por ejemplo, de una muestra obtenida anteriormente del paciente antes del inicio de la enfermedad. Un experto en la materia reconocerá que los controles estándar se pueden diseñar para la evaluación de cualquier número de parámetros (por ejemplo, niveles de ARN, niveles de proteína, tipos celulares específicos, fluidos corporales específicos, tejidos específicos, sinoviocitos, líquido sinovial, tejido sinovial, sinoviocitos de tipo fibroblasto, sinoviocitos de tipo macrófago, etc.).

Un experto en la materia entenderá qué controles estándar son los más apropiados en una situación determinada y son capaces de analizar datos basados en comparaciones a valores controles estándar. Los controles estándar también son valiosos para determinar la significancia (por ejemplo, significancia estadística) de los datos. Por ejemplo, si los valores para un parámetro determinado son muy variables en controles estándar, la variación en las muestras de prueba no se considerará como significativa.

Como se usa en la presente divulgación y reivindicaciones, las formas singulares “un”, “una”, “el” y “la” incluyen formas plurales a menos que el contexto claramente dicte otra cosa.

Se entiende que donde se describen formas de realización en el presente documento con el vocabulario “comprender” formas de realización análogas de otra manera descritas en términos de “consiste en y/o consiste esencialmente en” también se proporcionan.

El término “y/o” como se usa en una frase tal como “A y/o B” en el presente documento se pretende que incluya tanto “A y B”, “A o B”, “A”, y “B”. Asimismo, el término “y/o” como se usa en una frase tal como “A, B y/o C” se pretende que abarque cada una de las siguientes formas de realización; A, B y C; A, B o C; A o C; A o B; B o C; A y C; A y B; B y C; A (solo); B (solo); y C (solo).

II. Adenovirus oncolíticos

La presente invención proporciona un adenovirus oncolítico, en donde dicho adenovirus oncolítico es capaz de replicarse en una célula tumoral, y en donde dicho adenovirus se selecciona del grupo que consiste en:

- (i) un adenovirus que comprende una mutación V721A en el epítipo Hex713 (YLNHTFKKV) (SEQ ID NO: 11), una mutación A900S en el epítipo Hex892 (LLYANSAHA) (SEQ ID NO: 15) y una mutación a V925K en el epítipo Hex917 (YVLFEVFDV) (SEQ ID NO: 19); y
- (ii) un adenovirus que comprende una mutación L520P en el epítipo Hex512 (GLVDCYINL) (SEQ ID NO: 23), una mutación V721A en el epítipo Hex713 (YLNHTFKKV) (SEQ ID NO: 11), una mutación A900S en el epítipo Hex892 (LLYANSAHA) (SEQ ID NO: 15) y una mutación a V925K en el epítipo Hex917 (YVLFEVFDV) (SEQ ID NO: 19).

El adenovirus oncolítico de la invención comprende las mutaciones indicadas, que son delecciones funcionales de epítomos de células T inmunodominantes. Los epítomos de células T inmunodominantes son epítomos restringidos a antígeno linfocítico humano (HLA) de clase I, en particular, los epítomos de células T inmunodominantes son epítomos restringidos a antígeno linfocítico humano A2.1 (HLA-A2.1). Los epítomos inmunodominantes se identifican midiendo la potencia de una respuesta inmunitaria tras la inmunización de un huésped (animal) con un antígeno. La potencia de una respuesta inmunitaria contra un epítopo determinado se refiere al número de linfocitos que reconocen y se activan tras el reconocimiento de tal epítopo. El inmunoproteasoma de las células corta los antígenos en pequeños fragmentos (aproximadamente 9 aminoácidos) y tales fragmentos se translocan al retículo endoplásmico y se cargan en moléculas de MHC de clase I o clase II para ser presentados al receptor de células T en los linfocitos. La eficacia de esta ruta de procesamiento y presentación depende de la secuencia de aminoácidos y el haplotipo de las moléculas de MHC. Los fragmentos presentados se definen como epítomos. Los epítomos inmunodominantes se definen como los fragmentos presentados que activan un mayor número de linfocitos del huésped inmunizado. La cuantificación del número de linfocitos activados se puede hacer usando diferentes técnicas tal como ELISPOT o tinción de citoquinas intracelulares (ICS), que habitualmente detecta las citoquinas secretadas por linfocitos activados. La cantidad de CD8+ o CD4+ que reconocen epítomos de adenovirus humanos en seres humanos infectados con los adenovirus de tipo salvaje se ha estudiado para identificar los epítomos inmunodominantes de adenovirus humanos. Véase, por ejemplo, Tang J., et al., *Virology* Jul 2006; 350(2):312-22; Leen, A.M., et al., *Blood* Oct 2004; 104(8):2432-40; y Leen, A.M., et al., *J Virol.* Ene 2008; 82(1):546-54.

Las delecciones no están asociadas con citotoxicidad sustancialmente reducida o replicación vírica sustancialmente reducida en comparación con un adenovirus parental que carece de dicha al menos una delección.

Las delecciones de un epítopo de células T inmunodominante están en la proteína hexón de adenovirus. Las delecciones de un epítopo de células T inmunodominante están en la región base conservada de la proteína hexón de adenovirus. En algunas formas de realización, el adenovirus comprende una mutación V721A en el epítopo Hex713, una mutación A900S en el epítopo Hex892, y una mutación a V925K en el epítopo Hex917. En algunas formas de realización, el adenovirus comprende una mutación L520P en el epítopo Hex512, una mutación V721A en el epítopo Hex713, una mutación A900S en el epítopo Hex892, y una mutación a V925K en el epítopo Hex917.

En ciertas formas de realización, el adenovirus es un adenovirus humano. Por ejemplo, en ciertas formas de realización, el adenovirus es un adenovirus humano seleccionado del grupo que consiste en: adenovirus humanos de serotipos 1 a 51, y derivados de los mismos. En algunas formas de realización, el adenovirus es el adenovirus humano de serotipo 5.

Las modificaciones del adenovirus oncolítico descritas en el presente documento se pueden hacer para mejorar la capacidad del adenovirus oncolítico para tratar cáncer. Tales modificaciones de un adenovirus oncolítico se han descrito por Jiang, H., et al., *Curr Gene Ther.* Oct 2009;9(5):422-7, véase también la solicitud de patente en EE UU No. 20060147420. Por ejemplo, la ausencia o presencia de bajos niveles del receptor de coxsackievirus y adenovirus (CAR) en varios tipos de tumores puede limitar la eficacia del adenovirus oncolítico. Varios motivos peptídicos se pueden añadir al nudo de fibra, por ejemplo, un motivo RGD (las secuencia RGD imitan los ligandos normales de las integrinas de superficie celular), motivo Tat, motivo polilisina, motivo NGR, motivo CTT, motivo CNGRL, motivo CPRECS o un motivo de etiqueta strept (Ruoslahti, E. y Rajotte, D., *Annu Rev Immunol.* 2000;18:813-27). Se puede insertar un motivo en el bucle HI de la proteína de fibra del adenovirus. Modificar la cápside permite infección de célula diana independiente de CAR. Esto permite mayor replicación, infección más eficaz, y lisis aumentada de células tumorales (Suzuki et al., *Clin Cancer Res.* Ene 2001;7(1):120-6). También se pueden añadir secuencias peptídicas que se unen a receptores específicos, tal como EGFR o uPR. Se pueden usar receptores específicos encontrados exclusivamente o preferentemente en la superficie de células cancerosas como una diana para unión e infección adenovírica, tal como EGFRVIII.

En ciertas formas de realización, el adenovirus oncolítico se replica selectivamente en tumores y además comprende mutaciones en uno o más genes seleccionados del grupo que consiste en E1a, E1b, E4 y VA-RNA para alcanzar replicación selectiva en tumores. Por ejemplo, en algunas formas de realización, el adenovirus oncolítico se modifica para incluir una delección de 24 pares de bases en la región CR2 de E1A (E1AΔ24).

En ciertas formas de realización, el adenovirus oncolítico se replica selectivamente en tumores. Por ejemplo, en algunas formas de realización, el adenovirus oncolítico comprende un promotor específico de tejido o específico de tumor para lograr replicación selectiva en tumores. En algunas formas de realización, el promotor específico de tejido o el promotor específico de tumor son secuencias promotoras para controlar la expresión de uno o más genes del grupo que consiste en E1a, E1b, E2, y E4, para lograr la replicación selectiva en tumores. En algunas formas de realización, el promotor específico de tejido se selecciona del grupo que consiste en el promotor E2F, el promotor hTERT de telomerasa, el promotor de tirosinasa, el promotor del antígeno específico de próstata, el promotor de alfafetoproteína, y el promotor COX-2. Por ejemplo, en algunas formas de realización, el adenovirus oncolítico se modifica para expresar un gen de adenovirus esencial de un promotor E2F-1. En algunas formas de realización, se insertan sitios de unión a E2F palindrómicos en el promotor E1A endógeno del adenovirus oncolítico para permitir la expresión selectiva de E1A o E1AΔ24 en células altamente replicativas.

- En ciertas formas de realización, el adenovirus comprende modificaciones de la cápside para aumentar su infectividad o para dirigirse a un receptor presente en una célula tumoral. Por ejemplo, en algunas formas de realización, el adenovirus oncolítico además se modifica para eliminar el sitio de unión a sulfato de heparina glucosaminoglicano (HSG) KKTK (SEQ ID NO: 26) del eje de la fibra para reducir el tropismo hepático. En algunas formas de realización, el adenovirus oncolítico además se modifica para sustituir el sitio de unión a sulfato de heparina glucosaminoglicano (HSG) KKTK (SEQ ID NO: 26) del eje de la fibra con un motivo de unión a integrina (por ejemplo, RGDK) (SEQ ID NO: 27) para aumentar la infectividad y potencia oncolítica.
- En ciertas formas de realización, el adenovirus además comprende al menos un gen comúnmente usado en el campo de la terapia génica del cáncer. Por ejemplo, en algunas formas de realización, el al menos un gen comúnmente usado en el campo de la terapia del cáncer es un gen seleccionado del grupo que consiste en: un gen que activa un profármaco, un gen supresor tumoral, y un gen inmunoestimulador.
- En ciertas formas de realización, el adenovirus oncolítico de la invención además comprende una o más secuencias de ácido nucleico heterólogo que cada una codifica un antígeno o epítipo tumoral. En algunas formas de realización, la una o más secuencias de ácido nucleico heterólogo comprende de 1 a 5 secuencias de ácido nucleico heterólogo que cada una codifica un antígeno o epítipo tumoral. En algunas formas de realización, los antígeno o epítipos tumorales incluyen proteínas codificadas por genes con mutaciones o reorganizaciones únicas a células tumorales, genes embrionarios reactivados, antígenos de diferenciación específicos de tejido, y un número de otras proteínas propias.
- En algunas formas de realización, el antígeno o epítipo tumoral se selecciona del grupo que consiste en: MAGE-1, MAGE-2, MAGE-3, CEA, Tirosinasa, midkina, BAGE, CASP-8, β -catenina, CA-125, CDK-1, ESO-1, gp75, gp100, MART-1, MUC-1, MUM-1, p53, PAP, PSA, PSMA, ras, trp-1, HER-2, TRP-1, TRP-2, IL13R alfa, IL13R alfa2, AIM-2, AIM-3, NY-ESO-1, C9orf112, SART1, SART2, SART3, BRAP, RTN4, GLEA2, TNKS2, KIAA0376, ING4, HSPH1, C13orf24, RBPSUH, C6orf153, NKTR, NSEP1, U2AF1L, CYNL2, TPR, SOX2, GOLGA, BMI1, COX-2, EGFRvIII, EZH2, LICAM, Livina, MRP-3, Nestina, OLIG2, ART1, ART4, B-ciclina, Gli1, Cav-1, catepsina B, CD74, E-cadherina, EphA2/Eck, Fra-1/Fos11, GAGE-1, Gangliósido/GD2, Gnt-V, β 1,6-N, Ki67, Ku70/80, PROX1, PSCA, SOX10, SOX11, Survivina, UPAR, Mesotelina, y WT-1, o un epítipo de las mismas. En algunas formas de realización, el antígeno o epítipo tumoral es un antígeno o epítipo tumoral humano.
- En algunas formas de realización, la secuencia de ácido nucleico heterólogo se inserta en el gen de adenovirus que codifica dicha proteína de adenovirus que tiene al menos una delección funcional de un epítipo de células T inmunodominante. En algunas formas de realización, la secuencia de ácido nucleico heterólogo se inserta en un gen de adenovirus que codifica dicha proteína de adenovirus diferente de dicha proteína de adenovirus que tiene al menos una delección funcional de un epítipo de células T inmunodominante. En algunas formas de realización, la secuencia de ácido nucleico heterólogo se inserta en el gen de adenovirus que codifica una proteína hexón de adenovirus. Por ejemplo, la secuencia de ácido nucleico heterólogo se puede insertar en una región hipervariable de dicha proteína hexón de adenovirus. En una cierta forma de realización, la región hipervariable es la región hipervariable 5 (HVR5). En ciertas formas de realización, la secuencia de ácido nucleico heterólogo se inserta en la región hipervariable 1 de hexón, el bucle HI de la proteína de la fibra, o se fusionada a la proteína IX.
- En algunas formas de realización, el antígeno o epítipo tumoral está flanqueado por enlazadores flexibles. Por ejemplo, en algunas formas de realización, los enlazadores flexibles comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: GSGSR (SEQ ID NO: 28), AGSGSR (SEQ ID NO: 29), y AGSGS (SEQ ID NO: 30). Preferiblemente, la inserción de las secuencias de ácido nucleico heterólogo se hace "en el mismo marco de lectura".
- En ciertas formas de realización, el adenovirus oncolítico de la invención además comprende una o más secuencias de ácido nucleico heterólogo que codifica un antígeno o epítipo tumoral gp100, o un antígeno o epítipo tumoral tirosinasa. En algunas formas de realización, la una o más secuencias de ácido nucleico heterólogo comprenden (a) una secuencia de ácido nucleico heterólogo que codifica un antígeno o epítipo tumoral gp100 y (b) una secuencia de ácido nucleico heterólogo que codifica un antígeno o epítipo tumoral tirosinasa. Por ejemplo, en algunas formas de realización, el antígeno o epítipo tumoral gp100 comprende la secuencia de aminoácidos YLEPGPVTA (SEQ ID NO: 31), y el antígeno o epítipo tumoral tirosinasa comprende la secuencia de aminoácidos YMDGTMSQV (SEQ ID NO: 32). En algunas formas de realización, la secuencia de ácido nucleico heterólogo que codifica un antígeno o epítipo tumoral gp100 se inserta en la región hipervariable 5 de la proteína hexón del adenovirus. En algunas formas de realización, la secuencia de ácido nucleico heterólogo que codifica un antígeno o epítipo tumoral tirosinasa se inserta en la región hipervariable 5 de la proteína hexón del adenovirus. En algunas formas de realización, la secuencia de ácido nucleico heterólogo que codifica un antígeno o epítipo tumoral gp100 y la secuencia de ácido nucleico heterólogo que codifica un antígeno o epítipo tumoral tirosinasa se insertan ambas en la región hipervariable 5 de la proteína hexón del adenovirus.

En ciertas formas de realización, la invención proporciona un adenovirus oncolítico que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 3 o 4. En ciertas formas de realización, la invención proporciona un adenovirus oncolítico que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 5.

5 En ciertas formas de realización, el adenovirus es competente para replicación en células con una ruta Rb mutante. Después de la transfección, se aíslan placas adenovíricas de las células recubiertas con agarosa y las partículas víricas se expanden para análisis. Para protocolos detallados se refiere al experto en la materia a Graham, F.L. y Prevec, L., *Methods Mol Biol.* 1991;7:109-28.

10 Las tecnologías alternativas para la generación de adenovirus o vectores de adenovirus incluyen la utilización del sistema de cromosoma artificial bacteriano (BAC), recombinación bacteriana in vivo en una cepa bacteriana recA+ utilizando dos plásmidos que contienen secuencias adenovíricas complementarias, y el sistema de cromosoma artificial de levadura (YAC) (publicaciones PCT 95/27071 y 96/33280).

15 III. Polinucleótidos

También se proporcionan en el presente documento ácido nucleicos que codifican los adenovirus oncolíticos descritos anteriormente. Opcionalmente, se proporciona un ácido nucleico que codifica el adenovirus oncolítico (por ejemplo, un plásmido). Opcionalmente, se proporciona una pluralidad de ácidos nucleicos que codifican el adenovirus oncolítico (por ejemplo, una pluralidad de plásmidos).

20 También se divulga una célula huésped, no cubierto por la invención reivindicada, que se ha infectado con el adenovirus modificado descrito completamente. La célula huésped se puede transformar por el adenovirus modificado descrito anteriormente. Opcionalmente, la célula huésped se ha alterado genéticamente como resultado de la absorción, incorporación y expresión del material genético del adenovirus modificado descrito anteriormente. Opcionalmente, la célula huésped es una célula de mamífero, tal como una célula humana. El adenovirus puede ser un adenovirus de mamífero tal como un adenovirus humano.

30 En ciertas formas de realización, la invención abarca polinucleótidos aislados que comprenden una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 3, 4 y 5. También se divulgan vectores que comprenden los polinucleótidos de la invención. Estos vectores no están cubiertos por la invención reivindicada. También se divulgan células huéspedes que comprenden los polinucleótidos de la invención. Estas células no están cubiertas por la invención reivindicada.

35 Se generan modificaciones en el ácido nucleico de un virus usando cualquier número de métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, se puede usar mutagénesis dirigida para modificar una secuencia de ácido nucleico. Uno de los métodos más comunes de mutagénesis dirigida es la mutagénesis dirigida por oligonucleótido. En la mutagénesis dirigida por oligonucleótido, un oligonucleótido que codifica el cambio(s) deseado(s) en secuencia se hibrida a una hebra del ADN de interés y sirve como un cebador para el inicio de la síntesis de ADN. De esta manera, el oligonucleótido que contiene el cambio de secuencia se incorpora a la hebra recién sintetizada. Véase, por ejemplo, Kunkel, T.A., *Proc Natl Acad Sci U S A.* Ene 1985;82(2):488-92; Kunkel, T.A., et al., *Methods Enzymol.* 1987;154:367-82; Lewis, M.K. y Thompson, D.V., *Nucleic Acids Res.* 25 Jun 1990;18(12):3439-43; Bohnsack, R.N., *Methods Mol Biol.* 1996;57:1-12; Deng, W.P. & Nickoloff, J.A., *Anal Biochem.* Ene 1992;200(1):81-8; y Shimada, A., *Methods Mol Biol.* 1996;57:157-65. Otros métodos se usan rutinariamente en la técnica para introducir una modificación en una secuencia. Por ejemplo, se generan ácidos nucleicos modificados usando PCR o síntesis química, o se pueden sintetizar químicamente polipéptidos que tienen el cambio deseado en la secuencia de aminoácidos. Véase, por ejemplo, Bang, D. y Kent, S.B., *Proc Natl Acad Sci U S A.* 5 Abr 2005;102(14):5014-9 y referencias en la misma. También se pueden usar selección de un tipo celular en el que el virus habitualmente no se cultiva (por ejemplo, células humanas) y/o mutagénesis química (véase, por ejemplo, Rudd, P. y Lemay, G., *J Gen Virol.* May 2005;86(Pt. 5):1489-97) para generar modificaciones en el ácido nucleico de un virus.

55 Los polipéptidos aislados descritos en el presente documento se pueden producir por cualquier método adecuado conocido en la técnica. Tales métodos varían desde métodos sintéticos de proteína directos a construir una secuencia de ADN que codifica las secuencias de polipéptidos aisladas y expresar esas secuencias en un huésped transformado adecuado. En algunos aspectos, se construye una secuencia de ADN usando tecnología recombinante aislando o sintetizando una secuencia de ADN que codifica una proteína de interés de tipo salvaje. Opcionalmente, la secuencia se puede mutagenizar por mutagénesis específica de sitio para proporcionar análogos funcionales de la misma. Véase, por ejemplo, Mark, D.F., et al., *Proc Natl Acad Sci USA.* Sep 1984;81(18):5662-6 y la patente en EE UU No. 4.588.585.

60 En algunos aspectos, una secuencia de ADN que codifica uno o más polipéptidos de interés se construirían por síntesis química usando un sintetizador de oligonucleótidos. Tales oligonucleótidos se pueden diseñar basado en la secuencia de aminoácidos del polipéptido deseado y seleccionando esos codones que están favorecidos en la célula huésped en la que se producirá el polipéptido recombinante de interés. Se pueden aplicar métodos estándar para sintetizar una secuencia de polinucleótido aislada que codifica un polipéptido de interés aislado. Por ejemplo, se puede usar una secuencia de aminoácidos completa para construir un gen retrotraducido. Además, se puede sintetizar un oligómero de ADN que contiene una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido aislado particular. Por ejemplo, se

pueden sintetizar varios oligonucleótidos pequeños que codifican porciones del polipéptido deseado y después ligar. Los oligonucleótidos individuales típicamente contienen salientes 5' o 3' para ensamblaje complementario.

Una vez ensambladas (por síntesis, mutagénesis dirigida u otro método), las secuencias de polinucleótidos que codifican un polipéptido de interés aislado particular se insertarán en un vector de expresión y unirán operativamente a una secuencia de control de la expresión apropiada para la expresión de la proteína en un huésped deseado. El ensamblaje apropiado se puede confirmar por secuenciación de nucleótidos, mapeo de restricción, y expresión de un polipéptido biológicamente activo en un huésped adecuado. Como se sabe bien en la técnica, con el fin de obtener altos niveles de expresión de un gen transfectado en un huésped, el gen debe estar operativamente unido a secuencias de control de expresión transcripcional y traduccional que sean funcionales en el huésped de expresión elegido.

En ciertos aspectos, se usan vectores de expresión recombinantes para amplificar y expresar ADN que codifica uno o más polipéptidos de interés. Los vectores de expresión recombinantes son construcciones de ADN replicables que tienen fragmentos de ADN sintéticos o derivados de ADNc que codifican un polipéptido de interés, operativamente unidos a elementos reguladores de transcripción o traducción adecuados derivados de genes de mamífero, microbiano, vírico o insecto. Una unidad transcripcional en general comprende un montaje de (1) un elemento o elementos genético(s) que tienen un papel regulador en la expresión génica, por ejemplo, promotores o potenciadores transcripcionales, (2) una secuencia estructural o codificante que se transcribe a ARNm y se traduce a proteína, y (3) secuencias de iniciación y terminación de transcripción y traducción apropiadas, como se describe en detalle posteriormente. Tales elementos reguladores pueden incluir una secuencia operadora para controlar la transcripción. La capacidad para replicarse en un huésped, habitualmente conferida por un origen de replicación, y un gen de selección para facilitar el reconocimiento de transformantes se pueden incorporar adicionalmente. Las regiones de ADN están operativamente unidas cuando están funcionalmente relacionadas entre sí. Por ejemplo, el ADN para un péptido señal (líder secretor) está operativamente unido al ADN para un polipéptido si se expresa como un precursor que participa en la secreción del polipéptido; un promotor está operativamente unido a una secuencia codificante si controla la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión al ribosoma está operativamente unido a una secuencia codificante si está colocado de modo que permita la traducción. Los elementos estructurales destinados para uso en sistemas de expresión en levadura incluyen una secuencia líder que permite la secreción extracelular de la proteína traducida por una célula huésped. Alternativamente, donde una proteína recombinante se expresa sin una secuencia líder o de transporte, puede incluir un residuo de metionina N-terminal. Este residuo se puede opcionalmente cortar después de la proteína recombinante expresada para proporcionar un producto final.

La elección de secuencia de control de la expresión y vector de expresión dependerá de la elección del huésped. Se pueden emplear una amplia variedad de combinaciones huésped/vector de expresión. Los vectores de expresión útiles para huéspedes eucariotas incluyen, por ejemplo, vectores que comprenden secuencias de control de la expresión de SV40, virus del papiloma bovino, adenovirus y citomegalovirus. Los vectores de expresión útiles para huéspedes bacterianos incluyen plásmidos bacterianos conocidos, tal como plásmidos de *Escherichia coli* incluyendo pCR1, pBR322, pMB9 y sus derivados, plásmidos de mayor gama de huéspedes, tal como M13 y fagos de ADN monocatenario filamentosos.

Las células huéspedes adecuadas para la expresión de uno o más polipéptidos de interés incluyen procariotas, levadura, insecto o células eucariotas superiores bajo el control de promotores apropiados. Los procariotas incluyen organismos gram negativos o gram positivos, por ejemplo, *E. coli* o bacilos. Las células eucariotas superiores incluyen líneas celulares establecidas de origen mamífero como se describe posteriormente. También se podrían emplear sistemas de traducción sin células. Se describen vectores de clonación y expresión apropiados para uso con huéspedes celulares bacterianos, fúngicos de levadura, y mamíferos por Pouwels et al. (Cloning Vectors: A Laboratory Manual, Elsevier, N.Y., 1985). Se puede encontrar información adicional respecto a métodos de producción de proteína en, por ejemplo, la publicación de patente en EE UU No. 2008/0187954, las patentes en EE UU No. 6.413.746 y 6.660.501, y la publicación de patente internacional No. WO 04009823.

Las proteínas producidas por un huésped transformado se pueden purificar según cualquier método adecuado. Tales métodos estándar incluyen cromatografía (por ejemplo, cromatografía de intercambio iónico, de afinidad y en columna de tamaño), centrifugación, solubilidad diferencial, o por cualquier otra técnica estándar para purificación de proteínas. Se pueden unir etiquetas de afinidad tal como hexahistidina, dominio de unión a maltosa, secuencia de la cubierta de la gripe y glutatión S-transferasa a la proteína para permitir la purificación fácil por paso sobre una columna de afinidad apropiada. Las proteínas aisladas también se pueden caracterizar físicamente usando tales técnicas como proteólisis, resonancia magnética nuclear y cristalografía de rayos X.

En ciertos aspectos, las células infectadas por el adenovirus o vector adenovírico se pueden identificar in vitro incluyendo un gen indicador en el vector de expresión. En general, un indicador seleccionable es uno que confiere una propiedad que permite selección. Un indicador seleccionable positivo es uno en el que la presencia del gen indicador permite su selección, mientras un indicador seleccionable negativo es uno en el que su presencia previene su selección. Un ejemplo de un marcador seleccionable positivo es un marcador de resistencia a fármacos (genes que confieren resistencia a neomicina, puromicina, higromicina, DHFR, GPT, zeocina e histidinol). Otros tipos de indicadores incluyen indicadores cribables tal como GFP.

Están disponibles varios ensayos para determinar los niveles y actividades de proteínas, tal como métodos de amplificación/expresión, métodos de inmunohistoquímica, FISH y ensayos de antígenos circulantes, transferencia southern, inmunotransferencia, o técnicas de PCR. Además, la expresión o amplificación de proteínas se puede evaluar usando ensayos diagnósticos in vivo, por ejemplo, administrando una molécula (tal como un anticuerpo) que se une a la proteína que se va a detectar y está etiquetada con un marcador detectable (por ejemplo, un isótopo radioactivo) y escaneando externamente al paciente para la localización del marcador. Por tanto, los métodos de medir los niveles de proteína en células en general se conocen en la técnica y se pueden usar para determinar los niveles y/o actividades de proteínas en relación con los métodos y composiciones proporcionados en el presente documento según sea aplicable. Estos ensayos se pueden usar para determinar el efecto de modificaciones en los polipéptidos del adenovirus (por ejemplo, E1A, E1B, hexón, base pentón, proteína de fibra, proteína de cápside IX, ADN polimerasa y proteína de unión de ADN monocatenario). Por ejemplo, estos ensayos se pueden usar para determinar si las modificaciones producen adenovirus no capaces de producir niveles normales o productos génicos completamente funcionales del/los polipéptido(s) o para confirmar adenovirus que comprenden una mutación de todo o parte de uno o más de los polipéptidos de adenovirus.

IV. Métodos de uso y composiciones farmacéuticas

Los adenovirus oncolíticos de la invención son útiles en una variedad de aplicaciones incluyendo, pero no limitado a, métodos de tratamiento terapéutico, tal como el tratamiento de cáncer. En un aspecto no cubierto por la invención reivindicada, la divulgación proporciona un método de inducir lisis de células tumorales que comprende poner en contacto dichas células tumorales con una cantidad eficaz del adenovirus oncolítico o composición farmacéutica de la presente invención para inducir la lisis de células tumorales. En ciertos aspectos, el método de inducir lisis de células tumorales comprende poner en contacto las células tumorales con el adenovirus oncolítico in vitro. Por ejemplo, una línea celular inmortalizada o línea celular cancerosa se cultiva en un medio al que se añade el adenovirus oncolítico para inducir lisis de las células tumorales. En algunos aspectos, las células tumorales se aíslan de una muestra de un paciente tal como, por ejemplo, una biopsia de tejido, efusión pleural, o muestra de sangre y se cultiva en un medio al que se añade el adenovirus oncolítico para inducir lisis de las células tumorales. En ciertos aspectos, el método de inducir lisis de células tumorales comprende poner en contacto las células tumorales con el adenovirus oncolítico en un modelo animal. Por ejemplo, los adenovirus oncolíticos se pueden administrar a xenoinjertos de tumores que se han hecho crecer en ratones inmunocomprometidos (por ejemplo, ratones NOD/SCID) para inducir lisis de las células tumorales. En algunos aspectos, células madre de cáncer se aíslan de una muestra de un paciente tal como, por ejemplo, una biopsia de tejido, efusión pleural, o muestra de sangre y se inyectan en ratones inmunocomprometidos a los que después se administra el adenovirus oncolítico para inducir lisis de las células tumorales. En algunos aspectos, el adenovirus oncolítico se administra al mismo tiempo o poco después de la introducción de células tumorigénicas en el animal para inducir lisis de células tumorales. En algunos aspectos, el adenovirus oncolítico se administra como un terapéutico después de que las células tumorigénicas hayan crecido a un tamaño específico.

En un aspecto no cubierto por la invención reivindicada, la divulgación proporciona un método de inhibir crecimiento tumoral en un mamífero que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del adenovirus oncolítico o composición farmacéutica de la presente invención a dicho mamífero. En algunos aspectos, el mamífero es humano. En algunos aspectos, el mamífero tiene un tumor o ha tenido un tumor extirpado.

En algunos aspectos, el tumor es un tumor seleccionado del grupo que consiste en: adenocarcinoma, adenoma, astrocitoma, carcinoma, condroma, condrosarcoma, cistadenoma, disgerminoma, leucemia eritroide, fibroma, fibrosarcoma, tumor de células granulosas, hemangioma, hemangiosarcoma, leiomioma, leiomiosarcoma, tumor de células de Leydig, lipoma, liposarcoma, leucemia linfoblástica, leucemia linfocítica, linfoma, histiocitosis maligna, melanoma maligno, tumor de células cebadas, melanocitoma, meningioma, mesotelioma, mieloma múltiple, leucemia mieloide, oligodendroglioma, osteoma, osteosarcoma, plasmacitoma, rabdomioma, rabdomiosarcoma, seminoma, tumor de células de Sertoli, sarcoma de tejidos blandos, carcinoma de células escamosas, papiloma escamoso, sarcoma de células de transición, timoma, y carcinoma de células de transición.

En otro aspecto, la invención proporciona el adenovirus oncolítico de la invención para uso como un medicamento. En otro aspecto, la invención proporciona el adenovirus oncolítico de la invención para uso en la prevención o el tratamiento de cáncer o de una enfermedad premaligna que lleva a cáncer en un mamífero. En algunas formas de realización, el mamífero es humano. En algunas formas de realización, el mamífero tiene un tumor o ha tenido un tumor extirpado.

En algunas formas de realización el cáncer se selecciona del grupo que consiste en: cáncer nasofaríngeo, cáncer sinovial, cáncer hepatocelular, cáncer renal, cáncer de tejidos conjuntivos, melanoma, cáncer de pulmón, cáncer de intestino, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer colorrectal, cáncer de cerebro, cáncer de garganta, cáncer oral, cáncer de hígado, cáncer de huesos, cáncer pancreático, coriocarcinoma, gastrinoma, feocromocitoma, prolactinoma, leucemia/linfoma de células T, neuroma, enfermedad de von Hippel-Lindau, síndrome de Zollinger-Ellison, cáncer suprarrenal, cáncer anal, cáncer del conducto biliar, cáncer de vejiga, cáncer de uréter, oligodendroglioma, neuroblastoma, meningioma, tumor de médula espinal, osteocondroma, condrosarcoma, sarcoma de Ewing, cáncer de sitio primario desconocido, carcinoide, carcinoide del aparato digestivo, fibrosarcoma, cáncer de mama, enfermedad de Paget, cáncer cervical, cáncer de esófago, cáncer de vesícula biliar, cáncer de cabeza, cáncer de ojo,

cáncer de cuello, cáncer de riñón, tumor de Wilms, sarcoma de Kaposi, cáncer de próstata, cáncer testicular, enfermedad de Hodgkin, linfoma no hodgkiniano, cáncer de piel, mesotelioma, mieloma múltiple, cáncer ovárico, cáncer pancreático endocrino, glucagonoma, cáncer pancreático, cáncer paratiroideo, cáncer de pene, cáncer hipofisiario, sarcoma de tejido blando, retinoblastoma, cáncer de intestino delgado, cáncer de estómago, cáncer de timo, cáncer de tiroides, cáncer trofoblástico, mola hidatidiforme, cáncer uterino, cáncer endometrial, cáncer de vagina, cáncer de vulva, neuroma acústico, micosis fungoides, insulinooma, síndrome carcinoide, somatostatinooma, cáncer de las encías, cáncer de corazón, cáncer de labios, cáncer de meninges, cáncer de boca, cáncer de nervio, cáncer del paladar, cáncer de la glándula parótida, cáncer del peritoneo, cáncer de faringe, cáncer pleural, cáncer de glándula salivar, cáncer de lengua, y cáncer de amígdala.

Los adenovirus según la invención se pueden administrar por vía local o sistémica. Por ejemplo, en algunas formas de realización, el adenovirus oncolítico o composición farmacéutica se administra por vía intratumoral, intravenosa, intravascular, intratecal, intratraqueal, intramuscular, subcutánea, intraperitoneal, intradérmica, parenteral, intranasal, percutánea, ocular, intracraneal u oral. Los adenovirus según la invención también se pueden administrar en un soporte celular.

Una cantidad eficaz del agente terapéutico o preventivo se determina basado en el fin pretendido, por ejemplo, estimulación de una respuesta inmunitaria contra un tumor. Los expertos en la materia son conscientes de cómo aplicar la administración génica en situaciones in vivo y ex vivo. Para adenovirus y vectores adenovíricos, en general se preparará una solución madre de adenovirus o vector adenovírico. En algunas formas de realización, los adenovirus según la invención se pueden administrar en una única administración o múltiples administraciones. En algunas formas de realización, el virus se puede administrar a una dosis de al menos aproximadamente, como mucho aproximadamente, o aproximadamente 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 , 1×10^9 , 1×10^{10} , 1×10^{11} , 1×10^{12} , 1×10^{13} , o 1×10^{14} partículas víricas, o cualquier valor o intervalo entre ellas, a un sujeto. En algunas formas de realización, el virus se puede administrar a una dosis de al menos aproximadamente, como mucho aproximadamente, o aproximadamente 1×10^3 , 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 , 1×10^9 , 1×10^{10} , 1×10^{11} , 1×10^{12} , o 1×10^{13} unidades formadoras de placa (UFP), o cualquier valor o intervalo entre ellas, a un sujeto. La cantidad que se va a administrar, tanto según el número de tratamientos como dosis, depende del sujeto que se va a tratar, el estado del sujeto y la protección deseada. Las cantidades precisas de la composición terapéutica también dependen del juicio del médico y son peculiares para cada individuo.

En algunas formas de realización, el adenovirus oncolítico para uso de la invención además comprende administrar uno o más agentes terapéuticos adicionales a dicho mamífero. Por ejemplo, en algunas formas de realización, el agente terapéutico es un agente quimioterapéutico. Los agentes quimioterapéuticos incluyen, pero no están limitados a, 5-fluorouracilo; mitomicina C; metotrexato; hidroxiaurea; ciclofosfamida; dacarbazina; mitoxantrona; antraciclinas (epirubicina y doxorrubicina); anticuerpos contra receptores, tal como herceptin; etopósido; pregnasoma; terapias hormonales tal como tamoxifeno y anti-estrógenos; interferones; inhibidores de aromatasa; agentes progestacionales; y análogos de LHRH. Los inhibidores de CDK (quinasa dependiente de ciclina) son agentes terapéuticos que inhiben la función de las CDK. Los inhibidores adecuados de CDK para uso en los métodos proporcionados incluyen, pero no están limitados a, AG-024322, AT7519, AZD5438, flavopiridol, indisulam, P1446A-05, PD-0332991, y P276-00 (Véase, por ejemplo, Lapenna, S., et al, Nat Rev Drug Discov. Jul 2009;8(7):547-66). La elección del agente y la dosis las puede determinar fácilmente un experto en la materia basado en la enfermedad determinada que se trata. Las administraciones combinadas contemplan coadministración, usando formulaciones separadas o una única formulación farmacéutica, y administración consecutiva en cualquier orden, en donde preferiblemente hay un periodo de tiempo mientras ambos (o todos) agentes activos ejercen simultáneamente sus actividades biológicas. Las combinaciones de agentes o composiciones se pueden administrar ya sea concomitantemente (por ejemplo, como una muestra), por separado, pero simultáneamente (por ejemplo, a través de líneas intravenosas separadas) o secuencialmente (por ejemplo, un agente se administra primero seguido por la administración del segundo agente). Por tanto, el término combinación se usa para referirse a la administración concomitante, simultánea o secuencial de dos o más agentes o composiciones.

La invención además proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden uno o más de los adenovirus oncolíticos descritos en el presente documento y uno o más soportes o excipientes farmacéuticamente aceptables. Estas composiciones farmacéuticas encuentran uso en inducir lisis de células tumorales, inhibir el crecimiento de células tumorales, tratar cáncer y/o aumentar la respuesta inmunitaria contra el cáncer.

En ciertas formas de realización, las formulaciones se preparan para almacenamiento y uso al combinar un anticuerpo o agente purificado de la presente invención con un vehículo farmacéuticamente aceptable (por ejemplo, soporte, excipiente) (Gennaro, A.R., *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, 20ª Edición Mack Publishing, 2000). Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no están limitados a, tampones no tóxicos tal como fosfato, citrato, y otros ácidos orgánicos; sales tal como cloruro de sodio; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico y metionina; conservantes (por ejemplo cloruro de octadecildimetilbencil amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio; cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquil parabenos tal como metil o propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (por ejemplo, menos de aproximadamente 10 residuos de aminoácidos); proteínas tal como seroalbúmina, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos tal como polivinilpirrolidona; aminoácidos tal como glicina, glutamina,

asparragina, histidina, arginina, o lisina; hidratos de carbono tal como monosacáridos, disacáridos, glucosa, manosa, o dextrinas; agentes quelantes tal como EDTA; azúcares tal como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones que forman sales tal como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos Zn-proteína); y tensioactivos no iónicos tal como TWEEN o polietilenglicol (PEG).

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden administrar en cualquier número de maneras para tratamiento local o sistémico. La administración puede ser tópica (tal como membranas mucosas incluyendo administración vaginal o rectal); pulmonar (por ejemplo, por inhalación o insuflación de aerosoles, incluyendo por nebulizador, intratecal, intranasal, epidérmico y transdérmica); oral; o parenteral incluyendo inyección o infusión intravenosa, intraarterial, subcutánea, intraperitoneal o intramuscular; o administración intracraneal (por ejemplo, intratecal o intraventricular).

Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. En todos los casos la forma debe ser estéril y debe ser fluida hasta el grado de que exista fácil jeringabilidad. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y se debe conservar contra la acción contaminante de microorganismos, tal como bacterias y hongos. El soporte puede ser un solvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, y polietilenglicol líquido, y similares), mezclas adecuadas de los mismos, y aceites vegetales. Si se necesita, se pueden usar varios agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal, y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro de sodio. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede producir mediante el uso en las composiciones de agentes de retraso de absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

En ciertas formas de realización, las soluciones inyectables estériles se preparan incorporando compuestos en la cantidad requerida en el solvente apropiado con varios de los otros ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido por esterilización por filtro. En general, las dispersiones se preparan incorporando los varios ingredientes activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son técnicas de secado al vacío y liofilización que dan un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional de una solución previamente esterilizada por filtración de los mismos.

Tras la formulación, las soluciones se administrarán de una manera compatible con la formulación de dosis y en tal cantidad que sea terapéutica o profilácticamente eficaz. Para la administración parenteral en una solución acuosa, la solución se puede tamponar adecuadamente si es necesario y el diluyente líquido primero se hace isotónico con suficiente solución salina o glucosa. Estas soluciones acuosas particulares son especialmente adecuadas para la administración intravascular e intratumoral. A este respecto, los medios acuosos estériles, que se pueden emplear los conocerán los expertos en la materia a la luz de la presente divulgación.

Los adenovirus oncolíticos de la invención se pueden combinar en una formulación de combinación farmacéutica, o pauta posológica como terapia de combinación, con un agente terapéutico adicional. En un aspecto de la invención, el agente terapéutico adicional tiene propiedades anticancerosas. Por ejemplo, en algunas formas de realización el agente terapéutico adicional es un agente quimioterapéutico. El agente terapéutico adicional de la formulación de combinación farmacéutica o pauta posológica preferiblemente tiene actividades complementarias al adenovirus oncolítico de modo que no afecten de forma adversa uno a otro. También se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden el adenovirus oncolítico y el agente terapéutico adicional.

Para el tratamiento de la enfermedad, la dosis apropiada del agente terapéutico adicional depende del tipo de enfermedad que se va a tratar, la gravedad y el curso de la enfermedad, la sensibilidad de la enfermedad, terapia previa, antecedentes clínicos del paciente, etcétera todas a la discreción del médico. El agente terapéutico adicional se puede administrar una vez o a lo largo de una serie de tratamientos que duran desde varios días a varios meses, o hasta que se efectúa una cura o se alcanza una disminución del estado de enfermedad (por ejemplo, reducción en tamaño tumoral). Los programas posológicos óptimos para el agente se pueden calcular de medidas de acumulación de fármaco en el cuerpo del paciente y variarán dependiendo de la potencia relativa de un agente individual. El médico puede determinar fácilmente las dosis óptimas, metodologías posológicas y tasas de repetición. En ciertas formas de realización, la dosis del agente es desde 0,01 µg a 100 mg por kg de peso corporal, y se pueden dar una vez o más al día, semanalmente, mensualmente o anualmente. En ciertas formas de realización, el agente se da una vez cada dos semanas o una vez cada tres semanas. En ciertas formas de realización, la dosis del agente es desde aproximadamente 0,1 mg hasta aproximadamente 20 mg por kg de peso corporal. El médico puede estimar las velocidades de repetición para dosis basado en tiempos de residencia medidos y concentraciones del fármaco en fluidos o tejidos corporales.

La terapia de combinación puede proporcionar "sinergia" y demostrarse "sinérgica", es decir, el efecto alcanzado cuando los ingredientes activos usados juntos es mayor que la suma de los efectos que resultan de usar los compuestos por separado. Un efecto sinérgico se puede obtener cuando los ingredientes activos se: (1) coformulan y

administran o entregan simultáneamente en una formulación posológica unitaria combinada; (2) administran por alternancia o en paralelo como formulaciones separadas; o (3) mediante alguna otra pauta. Cuando se administran en terapia de alternancia, se puede lograr un efecto sinérgico cuando los compuestos se administran o entregan secuencialmente, por ejemplo, por inyecciones diferentes en jeringas separadas. En general, durante la terapia de alternancia, una dosis eficaz de cada ingrediente activo se administra secuencialmente, es decir, en serie, mientras en terapia de combinación, las dosis eficaces de dos o más ingredientes activos se administran juntas.

V. Kits que comprenden adenovirus oncolíticos (aspecto no cubierto por la invención reivindicada)

La presente divulgación proporciona kits que comprenden los adenovirus oncolíticos divulgados u otros agentes descritos en el presente documento y que se pueden usar para realizar los métodos descritos en el presente documento. En ciertos aspectos, un kit comprende al menos un adenovirus oncolítico en uno o más envases. En ciertos aspectos, un kit comprende al menos una composición farmacéutica descrita en el presente documento e instrucciones para uso. Un experto en la materia reconocerá fácilmente que los adenovirus oncolíticos divulgados u otros agentes de la presente invención se pueden incorporar fácilmente a uno de los formatos de kits establecidos que se conocen bien en la técnica.

También se proporcionan kits que comprenden un adenovirus oncolítico o composición farmacéutica de la presente invención y uno o más agentes terapéuticos adicionales. Por ejemplo, en algunos aspectos, el kit comprende un adenovirus oncolítico o composición farmacéutica de la presente invención y uno o más agentes quimioterapéuticos adicionales.

Las formas de realización de la presente invención se pueden definir además mediante referencia a los siguientes ejemplos no limitantes, que describen en detalle la preparación de ciertos adenovirus oncolíticos de la presente divulgación y métodos para usar los adenovirus oncolíticos de la presente divulgación. Será aparente para los expertos en la materia que se pueden practicar muchas modificaciones tanto a los materiales como a los métodos sin separarse del ámbito de la presente divulgación.

Ejemplos

Los ejemplos 1-4 muestran el cambio inmunitario de respuestas inmunitarias anti-adenovirus a antitumorales al delecionar epítomos de células T inmunodominantes de adenovirus. Usando ICO15K-TD-gp100-tyr, que es un adenovirus oncolítico HAd5 que incluye mutaciones en tres epítomos de células T inmunodominantes de hexón y el epítomo tumoral humano gp100-tyr insertado en el hexón, se demuestra que ratones tratados con ICO15K-TD-gp100-tyr tienen una respuesta inmunitaria anti-adenovirus global disminuida y al mismo tiempo muestran una mayor respuesta inmunitaria contra un epítomo tumoral tyr en comparación con ratones tratados con ICO15K-gp100-tyr, que un virus control que carece de las mutaciones en el hexón.

El ejemplo 5 muestra que ICO15K-TD-gp100-tyr induce una actividad antitumoral más potente comparado con ICO15K-gp100-tyr en animales que portan tumores murinos. Específicamente, los animales inyectados con ICO15K-TD-gp100-tyr son mucho más resistentes a la formación de tumores que los animales tratados con ICO15K-gp100-tyr.

Los ejemplos 6-8 muestran el impacto del cambio inmunitario en la actividad antitumoral en ausencia de epítomos tumorales. Específicamente, un adenovirus ICOVIR15K con deleción cuádruple (QD) (ICOVIR15K-QD), que carece de un epítomo tumoral humano y tiene una mutación en el epítomo de hexón adicional introducida en comparación a ICOVIR15K-TD, induce una actividad antitumoral más potente comprado con ICO15K en animales que portan tumores murinos.

Ejemplo 1

Generación del adenovirus oncolítico ICOVIR15K-TD que contiene la triple deleción (TD) con el método de genoteca restringida y su derivado ICO15K-TD-gp100-tyr

Se realizó una búsqueda de los epítomos inmunodominantes restringidos por antígeno linfocítico humano A2.1 (HLA-A2.1) de adenovirus 5 en la bibliografía a través de PubMed. Se seleccionó HLA-A2.1 porque es el complejo principal de histocompatibilidad (MHC) de clase I que es más prevalente en las poblaciones blanca y mestiza (35-50%) (Gonzalez-Galarza, F.F., et al., Nucleic Acids Res. Ene 2011;39(Database issue):D913-9). Cada epítomo tiene dos sitios de anclaje principales a HLA-A2.1 en las posiciones 2 y 9 del péptido y dos sitios de anclaje secundarios en las posiciones 1 y 3. El hexón se considera la proteína más inmunógena del adenovirus humano 5 y la selección de los siguientes tres epítomos se basó en la prevalencia de la actividad humana en pacientes infectados por adenovirus 5 en diferentes estudios (Leen, A.M., et al., Blood. 15 Oct 2004;104(8):2432-40; Leen, A.M., et al., J Virol. Ene 2008;82(1):546-54; Olive, M., et al., Hum Gene Ther. 1 Jul 2002;13(10):1167-78; Tang, J., et al., Virology. 5 Jul 2006;350(2):312-22) y después un conjunto de predicciones *in silico*. Con este fin, la proteína hexón se analizó usando los programas NetMHC, IEDB, BIMAS y Rankpep para predecir los epítomos que se unen a epítomos H2-Db de ratón con alta afinidad (Tabla 1). Estos programas también se usaron para identificar epítomos HLA-A2.1 humanos, además de los programas SYFPEITHI y SVRMHC (Gowthaman, U., et al., Amino Acids. Nov 2010;39(5):1333-42). Los epítomos

seleccionados que se van a delecionar son Hex713 (YLNHTFKKV) (SEQ ID NO: 11), Hex892 (LLYANSAHA) (SEQ ID NO: 15) y Hex917 (YVLFEVFDV) (SEQ ID NO: 19), en donde el número después de "Hex" indica la posición del primer aminoácido del epítipo en la secuencia de la proteína hexón (SEQ ID NO: 9).

5

Tabla 1

Servidores usados para predicción de epítipo de MHC de clase 1 que muestran la direcciones web más recientes y funcionales y su referencia bibliográfica.

Servidor	URL	Referencia
BIMAS	www.bimas.cit.nih.gov/molbio/hla_bind	[Parker et al., 1994]
SVMHC	www.sbc.su.se/~pierre/symhc/new.cgi	[Donnes y Elofsson, 2002]
RANKPEP	imed.med.umc.es/Tools/rankpep.html	[Reche y Reinherz, 2007]
NetMHC 3.4	www.cbs.dtu.dk/services/NetMHC/	[Lundegaard et al., 2008]
SYFPEITHI	www.syfpeithi.de/bin/MHCServer.dll/EpitopePrediction.htm	[Rammensee et al., 1999]
MHCI	Atom.research.microsoft.com/hlabinding/hlabinding.aspx	[Jojic et al., 2006]
IEDB SMM	http://tools.immuneepitope.org/mhci	[Peters y Sette, 2005]
SVRMHC	svrmhc.biolead.org/index.php	[Wan et al., 2006]

10

15

20

25

30

35

40

45

50

El plásmido del adenovirus oncolítico ICOVIR15K (Rojas, J.J., et al., Gene Ther. Abr 2012;19(4):453-7) se modificó genéticamente por recombinación homóloga en levadura para delecionar los epítipos Hex713, Hex892 y Hex917 seleccionados. Un enfoque inicial para delecionar estos epítipos fue sustituir los aminoácidos clave en estos epítipos (primer aminoácido o aminoácidos de anclaje en las posiciones 2 y 9 del epítipo). Entre varios mutantes construidos en plásmidos de adenovirus (Y713C, Y713D, Y713E, L714D, L714G, L714P que afectan al epítipo hex713; L902D, L902E, L902G, L902K, L902S, L902W que afectan a Hex892; y Y917D, Y917P, V918D, V918G, V925D, V925G, V925K, V925N, V925P, V925Q, V925S que afectan al epítipo Hex917) solo se obtuvo un virus viable tras transfección de tales plásmidos en células HEK293. El adenovirus obtenido tenía la mutación V925K en el epítipo Hex917, en la que la valina (V) en posición 9 del epítipo (correspondiente al aminoácido 925 del hexón) se sustituyó con una lisina (K). Dada la dificultad en obtener delecciones viables de epítipos inmunodominantes por mutaciones dirigidas se siguió una estrategia diferente basada en crear genotecas de mutantes. Para esto, se usó recombinación homóloga en bacterias para introducir mutaciones de epítipo subsecuentes porque es más eficaz comparada con la recombinación en levadura en términos de tiempo usado y el número de clones positivos (Stanton, R.J., et al., Biotechniques. Dic 2008;45(6):659-62, 664-8). Esta recombinación homóloga en bacterias se basa en la sustitución de genes de selección positiva-negativa insertados en el genoma del adenovirus por un fragmento donante que contiene la mutación genética pretendida (delección de epítipo en este caso). Se aplicó un método de genoteca restringida para delecionar los epítipos inmunodominantes. Este sistema implica usar cebadores (oligonucleótidos) degenerados para sustituir la secuencia codificante por cualquier aminoácido diferente del aminoácido o aminoácidos original(es), leucina, isoleucina, fenilalanina, metionina y valina. El aminoácido original, así como leucina, isoleucina, fenilalanina, metionina y valina, se excluyeron porque estos aminoácidos son capaces de unirse a sitios HLA-A2.1. Los cebadores degenerados se sintetizan con ciertos nucleótidos indefinidos de modo que los cebadores sintetizados corresponden a una genoteca de cebadores. En el cebador degenerado, los nucleótidos que corresponden al codón del aminoácido que se va a delecionar se sintetizan como "NVN", donde N puede ser A, T, C, G y V puede A, C, G. Por tanto, todos los aminoácidos con un codón que contiene una T en la segunda posición no están presentes en la genoteca (Phe, Leu, Ile, Met y Val). Estos aminoácidos son hidrofóbicos alifáticos no polares comúnmente encontrados en los residuos de anclaje de epítipos. La secuencia degenerada también puede estar localizada en el cebador inverso como "NBN", donde B es T, C o G. Se sintetizó un fragmento de PCR del hexón usando los cebadores degenerados y se usó como un fragmento donante en recombinación homóloga en bacterias. Aplicando este método de genoteca restringida para delecionar los epítipos Hex713 y Hex892, se obtuvieron mutantes con sustituciones de aminoácido de una valina por una alanina (V721A) en el epítipo Hex713 y una alanina por una serina (A900S) en el epítipo Hex892. Este conjunto de mutaciones junto con la previamente obtenida V925K se designó "TD" (por triple delección) e incluye las siguientes 3 mutaciones: (1) mutación V721A en la posición 9 del epítipo Hex713, que sustituye una valina con una alanina; (2) mutación A900S en la posición 9 del epítipo Hex892, que sustituye una alanina con una serina; y (3) mutación V925K en la posición 9 del epítipo Hex917, que sustituye una valina (V) con una lisina (K).

La tabla 2 muestra las secuencias aminoacídicas exactas de cada región mutante comparada con su equivalente de tipo salvaje, junto con la afinidad esperada para su correspondiente alelo HLA según el método de predicción NetMHC enumerado en la tabla 1. Los valores CI50 bajos para esta predicción corresponden a buenos unidores, mientras las versiones mutadas muestran valores CI50 predichos altos.

Tabla 2

Secuencia de aminoácidos correspondiente a tres epítipos mutados incluidos en TD y su afinidad predicha para HLA-A*02.01 humano (según el simulador NetMHC)

Alelo	Longitud del péptido	Secuencia de AA	CI50 (nM)	Epítipo
HLA-A*02:01	9	YLNHTFKKV (SEQ ID NO: 11)	50,24	Hex713 (wt)
HLA-A*02:01	9	YLNHTFKKA (SEQ ID NO: 13)	618,28	V721A (en TD)
HLA-A*02:01	9	LLYANSAHA (SEQ ID NO: 15)	63,05	Hex892 (wt)
HLA-A*02:01	9	LLYANSAHS (SEQ ID NO: 17)	1407,05	A900S (en TD)
HLA-A*02:01	9	YVLFEVFDV (SEQ ID NO: 19)	18,97	Hex917 (wt)
HLA-A*02:01	9	YVLFEVFDK (SEQ ID NO: 21)	21734,48	V925K (en TD)

Se transfectaron plásmidos que contenían los genomas víricos en células 293 eucariotas usando el método del fosfato de calcio. Cada virus generado se analizó para su capacidad oncolítica usando la técnica de espectrotitulación, que mide el número de partículas infecciosas necesarias para destruir el 50% de las células en cultivo tisular (CI50). Los virus con mutaciones V721A, A900S y V925K no mostraron ninguna pérdida de su capacidad oncolítica.

Para construir ICO15K-gp100-tyr, la región hipervariable 5 (HVR5) del hexón (HVR5), que corresponde a los aminoácidos 270-281 del hexón, se sustituyó con epítomos de melanoma gp100-280 (gp100) y tirosinasa369 (tyr) como se muestra en la figura 1. Las secuencias de epítomo de gp100 y tyr corresponden a YLEPGPVTA (SEQ ID NO: 31) y YMDGTMSQV (SEQ ID NO: 32), respectivamente. El epítomo tyr se modificó en la posición correspondiente al aminoácido 372 de la tirosinasa nativa para introducir una mutación N372D. La mutación N372D de tyr produce una modificación postraducciona que lo hace fácilmente reconocido por los TCR (Skipper, J.C., et al., J Exp Med. 1 Feb 1996;183(2):527-34). El virus control ICO15K-gp100-tyr con epítomos gp100 y tyr se construyó sin la triple delección. Los epítomos tumorales se flanquearon por enlazadores GSGSR (SEQ ID NO: 28), AGSGSR (SEQ ID NO: 29) y AGSGS (SEQ ID NO: 30) como se muestra en la figura 1. Con el fin de generar una genoteca de inserciones de epítomos, se insertaron enlazadores entre epítomos para tener regiones de homología que se pudieran usar para productos de PCR solapantes. Se diseñaron los enlazadores para contener los aminoácidos glicina y serina (GS) debido a su flexibilidad (Vigne, E., et al., J Virol. Jun 1999;73(6):5156-61; Taremi, S.S., et al., Protein Sci. Oct 1998;7(10):2143-9; Kingston, R.L., et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 1 Jun 2004;101(22):8301-6). Además del contenido de GS repetitivo en los enlazadores, se usó secuencia de ADN de codones diferentes para evitar recombinación homóloga. Además, se seleccionó el aminoácido alanina (A) para algunos enlazadores para proporcionar un buen sitio de corte C-ter durante el procesamiento por proteasoma usando el sitio web de predicción del corte por proteasoma servidor NetChop 3.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetChop/>), y se seleccionó arginina (R) para algunos enlazadores para proporcionar un buen aminoácido para unión a TAP (Transportador asociado con procesamiento de antígeno) y su entrada en el retículo endoplásmico (Uebel, S. y Tampe, R., Curr Opin Immunol. Abr 1999;11(2):203-8). Ambos plásmidos que contenían genomas víricos ICO15K-TD-gp100-tyr e ICO15K-gp100-tyr se transfectaron en células 293, amplificaron en A459 y posteriormente se purificaron.

Ejemplo 2

Validación de la viabilidad de las nuevas construcciones *in vitro*

Pase en serie de las soluciones madre víricas en células cancerosas humanas A549 y tiempo requerido para generar efecto citopático

Con el fin de evaluar la estabilidad de la triple delección, 10 pases en serie de cada virus con triple delección se analizaron para efecto citopático (CPE) como se muestra en la figura 2. Esto implicó la infección de monocapas de células A549 con ICOVIR15K-TD-gp100-tyr o ICOVIR15K-TD. Para adenovirus de tipo salvaje, el CPE habitualmente se observa 72 h post-infección. Este periodo de tiempo también se observó en todos los diez pases realizados con los virus con triple delección.

Capacidad de generar placas y tamaño de placa (agujeros en monocapas) en un ensayo de placa en células A549

Se infectaron monocapas de células A549 con un virus con triple delección (ICOVIR15K-TD-gp100-tyr o ICOVIR15K-TD) o un virus control sin la triple delección (ICOVIR15K o ICOVIR15K-gp100-tyr) durante 7 días, y las células viables se tiñeron posteriormente con la tinción roja neutra. Como se muestra en la figura 3, el tamaño de placa de cualquier virus con triple delección no cambia comparado con cualquier virus control. Estos hallazgos indican que los virus con triple delección siguen comportándose como el virus parental y no pierden capacidad para generar placas.

Ensayo de citotoxicidad *in vitro* para determinar el valor CI50 en células A549

Se infectaron células A549 con ICOVIR15K, ICOVIR15K-TD, ICOVIR15K-gp100-tyr o ICOVIR15K-TD-gp100-tyr a multiplicidades de infección (MOI) que varían de 0,00001 a 200 unidades de transducción (UT)/célula, y la supervivencia celular se evaluó 5 días tras la infección. Los valores CI50 de cada virus con la triple delección muestran que estos virus no perdieron ninguna actividad oncolítica o citotoxicidad cuando se comparan con los virus parentales. Estos hallazgos muestran que las modificaciones de la cápside no interfieren con la capacidad oncolítica de los virus con triple delección.

Ensayo de producción vírica

Se infectaron células A549 con ICOVIR15K, ICOVIR15K-TD, ICOVIR15K-gp100-tyr o ICOVIR15K-TD-gp100-tyr a una MOI de 25 UT/célula durante 4 horas y después se lavaron con PBS. La producción vírica total (líneas sólidas, figura 5A) y la producción vírica liberada (líneas discontinuas, figura 5B) se analizaron 24, 48, 72 y 96 horas tras la infección. El virus parental ICOVIR15K se usó como una referencia control para un buen virus oncolítico. Los virus que tienen la triple delección (ICOVIR15K-TD e ICOVIR15K-TD-gp100-tyr) parecen tener aproximadamente una reducción 1 log en la producción total comparados con el virus control ICOVIR15K 24 h tras la infección; sin embargo, el análisis estadístico usando la prueba U de Mann-Whitney para comparar las curvas de producción vírica (Wang, G.P. y Bushman, F.D., J Virol Methods. Jul 2006;135(1):118-23) demostró que no había diferencia entre los grupos. Además, no hubo diferencia significativa entre virus con triple delección y virus control con respecto a la cantidad de virus liberado durante el tiempo. Estos resultados muestran que los virus con triple delección y virus control mostraron producción vírica similar con respecto tanto a producción vírica total como la producción vírica liberada. Estos hallazgos también están apoyados por los resultados obtenidos en la CI50 del ensayo de citotoxicidad mostrado en la figura 4, en el que no se observaron diferencias con los virus con triple delección en comparación con virus control que carecen de modificaciones genéticas en la cápside. Los valores CI50 se obtuvieron 5 días tras la infección, permitiendo de esta manera múltiples rondas de replicación vírica para una evaluación correcta de la capacidad oncolítica.

Ejemplo 3

Afinidad de unión a HLA-A2.1 humano de los epítomos adenovíricos mutados y epítomos tumorales presentes en ICOVIR15K-TD-gp100-tyr

Se usó un ensayo de estabilización de HLA-A2.1, con modificaciones menores de Takiguchi et al. (Takiguchi, M., Tissue Antigens. Abr 2000;55(4):296-302), para evaluar la afinidad de unión de los péptidos mutados. Se incubaron células murinas que expresan HLA-A2.1 (células RMA-S A2) durante 18 h a 26°C con el fin de permitir la expresión en superficie de HLA-A2 en ausencia de cualquier péptido. Los péptidos se diluyeron en serie 1:3 en una placa de 96 pocillos con un fondo en forma de U, empezando con 300 µM hasta 0,1 µM en volumen de 100 µl. Se añadieron 2,5e5 células RMA-S A2 a cada pocillo en volumen de 100 µl. La mezcla se incubó durante 2 horas a 26°C y después a 37°C durante 2 horas para dejar que el HLA-A2.1 sin unir se internalizara. Las células se centrifugaron durante 3 minutos a 500 g y se lavaron tres veces con PBS, SBF al 5%, BSA al 0,5%. Las células se incubaron con 100 µl del sobrenadante de hibridoma anti-HLA-A2.1 (PA2.1) y se incubaron durante 30 minutos a 4°C. Las células se lavaron tres veces y después se incubaron con anti-IgG de ratón en cabra Alexa Fluor® 488 (Molecular Probes®) a dilución 1:500 durante 30 minutos a 4°C. Las células se lavaron tres veces y después se analizaron con citómetro de flujo Gallios (Beckman Coulter). Como control negativo, se incubaron células RMA-S A2 con un péptido que no tenía afinidad por HLA-A2.1 en las mismas condiciones experimentales. Se calculó el índice de fluorescencia usando la fórmula: Índice de fluorescencia = (fluorescencia de la muestra – fluorescencia del control negativo)/fluorescencia del control negativo.

Usando GraphPad Prism v5, se analizaron los valores de Kd usando una regresión no lineal. Se obtuvo un valor Kd para cada péptido que representa la constante unión en equilibrio con la mitad de la unión máxima posible.

Usando este ensayo, se analizaron los epítomos de unión a HLA-A2 en el ICOVIR15K-TD-gp100-tyr. Como se muestra en la figura 6A, las versiones mutadas de los epítomos Hex982 y Hex713 mantuvieron el mismo nivel de unión a HLA-A2 comparados con sus equivalentes sin modificar. Por tanto, estas mutaciones se consideraron “deleciones no funcionales”. La mutación V925K en el epítomo Hex917 redujo significativamente la unión a HLA-A2 en casi 600 veces comparado con su equivalente sin modificar, como se muestra en la figura 6A. Por tanto, esta mutación se consideró una “delección funcional”. Además, todos los epítomos tumorales introducidos en ICOVIR15K-TD-gp100-tyr se unen a HLA-A2.1 humana y son funcionales como se muestra en la figura 6B. Como se resume en la figura 6C, ICOVIR15K-TD-gp100-tyr contiene una “delección funcional” que produce la pérdida de un epítomo de adenovirus inmunodominante y epítomos gp100 y tyr funcionales.

Ejemplo 4

Análisis *in vivo* de la respuesta inmunitaria generada por ICOVIR15K-TD-gp100-tyr

Se inmunizaron ratones transgénicos HHD, que son una cepa de ratón C57BL/6 con MHC H-2 de clase I murina eliminada y manipulada para expresar cantidades significativas del Ag de MHC de clase I HLA-A2.1 (también llamado HHD A2/Kb H-2b; Firat, H., et al., Eur J Immunol. Oct 1999;29(10):3112-21) con ICOVIR15K-gp100-tyr o ICOVIR15K-TD-gp100-tyr usando una pauta de inmunización basada en una *principal* con virus inactivado administrado por vía

intramuscular el día 0 y *reforzada* además con el virus activo administrado por vía intravenosa el día 14. El día 28, la respuesta inmunitaria contra un número de epítomos del hexón se analizó con el fin de determinar qué epítomos del hexón son más inmunógenos y si los epítomos con triple delección no podían generar respuesta inmunitaria.

La respuesta inmunitaria contra diferentes epítomos en el punto de tiempo del día 28 se evaluó usando el ensayo de inmunoadsorción ligado a enzima en manchas (ELISPOT), que permite la visualización de producto secretor (es decir, IFN γ) de células que responden individuales en una membrana, proporcionando de esta manera información cualitativa (tipo de antígeno) y cuantitativa (número de células que responden). Para realizar tal análisis, se sacrificaron los ratones el día 28, los bazo se recogieron y se aislaron los esplenocitos. Los esplenocitos de cada animal se sembraron a 2.500.000 células/pocillo. Se usaron fitohemaglutinina (PHA a 15 ng/ml) más ionomicina (250 ng/ml) como control positivo, y se usó el medio solo como control negativo. Se usaron péptidos y conjuntos de péptidos a una concentración final de 1 μ M. Los antígenos se incubaron con los esplenocitos durante al menos 18 horas a 37°C, CO $_2$ al 5%. Los pocillos se lavaron e incubaron con el anticuerpo anti-IFN γ biotinilado secundario durante 2 horas (Mabtech 3321-6-250), se lavaron, y después se incubaron durante 1 hora con estreptavidina-ALP (Sigma E2636-2ML). Las placas se lavaron con PBS, y las manchas se revelaron usando la solución BCIP/NBT (Sigma B1911-100ML) hasta que surgieron manchas distintas (15-30 minutos). La placa se lavó con agua del grifo, se dejó secar durante la noche, y las manchas se contaron usando el lector clásico AID EliSpot (ELR071; AID GmbH, Strassberg, Alemania). El número de manchas se corrigió por el contenido de linfocitos CD8 en la población celular de esplenocitos, ya que el contenido de CD8 variaba del 0,5% al 3,5%.

En este experimento, se examinó la reactividad contra un panel de epítomos del hexón incluyendo a los que se dirige la delección triple (Hex713, Hex892 y Hex917) y los predichos que se unen con alta afinidad a HLA-A2.1 según diferentes métodos *in silico* mostrados en la tabla 1. Estos incluían los siguientes epítomos o polipéptidos adenovíricos/tumorales restringidos a HLA-A2.1 humana: E1A19 (LLDQLIEEV) (SEQ ID NO: 33); Hex63 (RLTLRFIPV) (SEQ ID NO: 34); Hex512 (GLVDCYINL) (SEQ ID NO: 23); Hex548 (MLLGNGRYV) (SEQ ID NO: 35); Hex652 (MLYPIPANA) (SEQ ID NO: 36); Hex713 (YLNHTFKKV) (SEQ ID NO: 11); Hex892 (LLYANSAHA) (SEQ ID NO: 15); Hex914 (TLLYVLFEV) (SEQ ID NO: 37); Hex917 (YVLFEVFDV) (SEQ ID NO: 19); Tyr369(3D) (YMDGTMSQV) (SEQ ID NO: 32)); gp100-209 (IMDQVPFSV) (SEQ ID NO: 38) y gp100-280 (YLEPGPVT) (SEQ ID NO: 31)). Además, un conjunto de polipéptidos del hexón (polipéptidos de 15 aminoácidos solapantes en 9 aminoácidos de toda la secuencia de proteína del hexón) y esplenocitos indiferenciados preinfectados con ICOVIR15K-gp100-tyr o ICOVIR15K-TD-gp100-tyr durante 24 horas también se incluyeron.

Los resultados se muestran en la figura 7. El panel de epítomos del hexón incluía a los que se dirige la triple delección (Hex713, Hex892 y Hex917) y los predichos que se unen con alta afinidad a HLA-A2.1 según diferentes modelos de predicción. A pesar de que las respuestas de células T CD8 contra los epítomos del hexón con triple delección Hex713 y Hex892 eran indetectables y se vieron pequeñas respuestas contra Hex917 cuando se inmuniza con ICOVIR15K-gp100-tyr, el virus con triple delección ICOVIR15K-TD-gp100-tyr no es capaz de montar una respuesta contra el epítomo Hex917 y por tanto la sustitución de aminoácidos V925K en el hexón es funcional *in vivo*. La respuesta inmunitaria contra otros epítomos del hexón que se predijo que se unían con alta afinidad a HLA-A2.1, tal como Hex63, Hex512, Hex548, Hex652 y Hex914, también se evaluó. De estos epítomos predichos, solo Hex512 fue capaz de inducir una alta respuesta inmunitaria. De forma interesante, los ratones tratados con el virus con triple delección ICOVIR15K-TD-gp100-tyr dieron una mayor respuesta contra Hex512 que el virus control parental, lo que sugiere que hubo un cambio en la inmunodominancia a otros epítomos del hexón cuando la triple delección estaba presente.

Cuando se analizó un conjunto de polipéptidos del hexón (polipéptidos de 15 aminoácidos solapantes en 9 aminoácidos de toda la secuencia de proteína del hexón) en el ensayo ELISPOT, tanto los virus ICOVIR15K-gp100-tyr como ICOVIR15K-TD-gp100-tyr generaron una alta respuesta inmunitaria contra el hexón, pero el nivel de respuesta inmunitaria contra el hexón generada por el virus con triple delección era significativamente menor que el virus control. Este hallazgo importante muestra que, incluso aunque no se detectó una alta respuesta inmunitaria contra los epítomos objetivo individuales en la triple delección, la inmunogenicidad anti-hexón global disminuye cuando estos tres epítomos se delecionan (Figura 7). Además, para probar si la inmunidad general contra todas las proteínas de adenovirus cambió debido a la triple delección, presentamos el conjunto entero de epítomos de adenovirus a esplenocitos de animales inmunizados usando esplenocitos indiferenciados infectados con virus y células presentadoras de antígeno. Los esplenocitos indiferenciados se infectaron *ex vivo* con ICOVIR15K-gp100-tyr o ICOVIR15K-TD-gp100-tyr durante 24 horas y después se añadieron a esplenocitos de ratones inmunizados en el ensayo ELISPOT (Figura 7). Los ratones inmunizados con ICOVIR15K-gp100-tyr respondieron muy bien contra esplenocitos indiferenciados infectados con ICOVIR15K-gp100-tyr o ICOVIR15K-TD-gp100-tyr. Sin embargo, los ratones inmunizados con el virus con triple delección ICOVIR15K-TD-gp100-tyr respondieron con menor actividad a esplenocitos indiferenciados infectados con ICOVIR15K-gp100-tyr o ICOVIR15K-TD-gp100-tyr. La respuesta inmunitaria anti-adenovirus global estaba significativamente reducida en ratones inmunizados con el virus con triple delección ICOVIR15K-TD-gp100-tyr comparada con el virus sin triple delección ICOVIR15K-gp100-tyr.

Con el fin de evaluar si la modulación de la respuesta inmunitaria contra el hexón con los epítomos de triple delección aumenta la inmunogenicidad de epítomos tumorales presentados en la cápside de adenovirus, la respuesta inmunitaria contra el epítomo tumoral tirosinasa también se analizó en la figura 7. Sorprendentemente, la respuesta inmunitaria

contra tirosinasa aumentó en el 50% cuando el epítipo tumoral se presenta en el contexto de virus con triple delección ICOVIR15K-TD-gp100-tyr.

En conjunto, estos datos muestran que el virus con triple delección ICOVIR15K-TD-gp100-tyr era parcialmente capaz de esconderse del sistema inmunitario, permitiendo mediante ello que el epítipo tumoral tirosinasa sea más inmunógeno que cuando se presenta en el virus control ICOVIR15K-gp100-tyr.

Ejemplo 5

Impacto del cambio inmunitario en actividad antitumoral

Como se ha descrito anteriormente, se detectó una fuerte actividad inmunitaria CD8+ contra el epítipo tirosinasa en ratones inmunizados con ICOVIR15K-TD-gp100-tyr (Figura 7). El siguiente ejemplo muestra que ICO15K-TD-gp100-tyr induce una actividad antitumoral más potente comparada con ICO15K-gp100-tyr en animales que portan tumores murinos. Específicamente, los animales inyectados con ICO15K-TD-gp100-tyr son mucho más resistentes a la formación de tumores que los animales tratados con ICO15K-gp100-tyr.

Se vacunaron ratones transgénicos HHD con adenovirus oncolítico parental ICOVIR15K, el adenovirus oncolítico con epítomos de melanoma presentados en el HVR5 (ICOVIR15K-gp100-tyr) y el mismo adenovirus oncolítico con epítomos de melanoma, pero que porta la triple delección (ICOVIR15K-TD-gp100-tyr). Los ratones se vacunaron como se describe en el diagrama mostrado en la figura 8A. Posteriormente, los ratones se expusieron 7 días después de la vacunación a 10^6 células tumorales murinas B16CAR-A2 (células positivas para tirosinasa) dadas por vía subcutánea. Las células B16CAR-A2 son derivadas de células B16CAR previamente transducidas con un vector retroviral no replicativo MSCV-A2 que codifica una secuencia de ADNc de HLA-A2/Kb en la que el transgén HLA-A2/Kb expresa los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$ de HLA-A2.1 humano fusionados al dominio $\alpha 3$ murino Kb bajo el control del promotor CMV.

La formación de tumores se evaluó como en un ensayo de formación por exposición de tumores clásico y el crecimiento tumoral también se siguió (Figura 8B). Todos los ratones vacunados con el virus parental ICOVIR15K desarrollaron tumores, mientras el 90% de los ratones vacunados con ICOVIR15K-gp100-tyr desarrollaron tumores, y solo el 60% de ratones desarrolló tumores cuando se vacunaron con ICOVIR15K-TD-gp100-tyr. El único grupo de tratamiento que demostró inhibición significativa de crecimiento tumoral fue el que presenta epítomos de melanoma y porta la triple delección (ICOVIR15K-TD-gp100-tyr).

Para evaluación adicional de la eficacia antitumoral, se midió el tamaño del tumor con un calibrador digital y se calculó según la fórmula $V \text{ (mm}^3\text{)} = \pi/6 \times W \times L \times D$, donde W, L y D son anchura, longitud y profundidad del tumor, respectivamente (Figura 8C). Se usó la prueba de la t de Student bilateral para comparar por pares la significancia estadística de las diferencias en el volumen del tumor entre los diferentes grupos de tratamiento. Los resultados mostraron que la vacunación con un virus oncolítico que combina la triple delección (TD) con la presentación de epítomos tumorales (gp100/tyr) tiene impacto significativo en el crecimiento tumoral después de la inyección de células B16CAR-A2. Además, también se dibujaron curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para cada grupo, para las que el punto final se estableció como un volumen tumoral $\geq 500 \text{ mm}^3$ (Figura 8D). Los animales cuyo tamaño tumoral nunca alcanzó el umbral se incluyeron como información censurada a la derecha. Se usó una prueba del orden logarítmico para determinar la significancia estadística de las diferencias en tiempo al suceso. De nuevo, el único grupo de tratamiento que demostró supervivencia de ratones significativamente aumentada con respecto al grupo sin tratar fue el que presenta epítomos de melanoma y porta la triple delección (ICOVIR15K-TD-gp100-tyr).

En conjunto, estos datos demuestran que la delección de un epítipo de hexón inmunodominante de adenovirus junto con la presentación de epítomos asociados a tumor en la cápside de adenovirus es capaz de aumentar la eficacia antitumoral de adenovirus oncolíticos.

Ejemplo 6

Generación y caracterización del adenovirus oncolítico ICOVIR15K-QD

Un nuevo adenovirus oncolítico ICOVIR15K-QD, que mantiene la "TD" de ICOVIR15K-TD e incorpora una nueva mutación en el hexón, se generó usando ICOVIR15K-TD como fondo. Hex512 es un epítipo adenovirico que genera una de las mayores respuestas inmunitarias en el modelo murino HHD transgénico como se muestra en la figura 7. El método para introducir esta nueva mutación es idéntico al seguido para la generación de ICOVIR15K-TD, usando cebadores degenerados con el fin de sustituir la secuencia codificante para los aminoácidos de Hex512 por cualquier otro excepto el original. El conjunto de delecciones epitópicas del hexón de este nuevo virus se ha llamado cuádruple delección (cuádruple delección, QD). A destacar, no se ha incorporado antígeno tumoral en este virus. Las siguientes delecciones epitópicas del hexón están incluidas en ICOVIR15K-QD: (1) mutación V721A en la posición 9 del epítipo Hex713, que sustituye una valina con una alanina; (2) mutación A900S en la posición 9 del epítipo Hex892, que sustituye una alanina con una serina; (3) mutación V925K en la posición 9 del epítipo Hex917, que sustituye una valina (V) con una lisina (K); y (4) mutación L520P en la posición 9 del epítipo Hex512, que sustituye una leucina (L) con una prolina (P).

La tabla 3 muestra la secuencia aminoacídica exacta de cada región mutante comparada con su equivalente de tipo salvaje.

5 Tabla 3
Secuencia de aminoácidos correspondiente a cuatro epítomos mutados incluidos en QD

Alelo	Longitud del péptido	Secuencia de AA	Epítomo
HLA-A*02:01	9	YLNHTFKKV (SEQ ID NO: 11)	Hex713 (wt)
HLA-A*02:01	9	YLNHTFKKA (SEQ ID NO: 13)	V721A (en QD)
HLA-A*02:01	9	LLYANSAHA (SEQ ID NO: 15)	Hex892 (wt)
HLA-A*02:01	9	LLYANSAHS (SEQ ID NO: 17)	A900S (en QD)
HLA-A*02:01	9	YVLFVFDV (SEQ ID NO: 19)	Hex917 (wt)
HLA-A*02:01	9	YVLFVFDK (SEQ ID NO: 21)	V925K (en QD)
HLA-A*02:01	9	GLVDCYINL (SEQ ID NO: 23)	Hex512 (wt)
HLA-A*02:01	9	GLVDCYINP (SEQ ID NO: 25)	L520P (en QD)

10 Todas las deleciones QD en el hexón se confirmaron por secuenciación genómica. La caracterización física y funcional del virus ICOVIR15K-QD purificado mostró que la proporción de virus funcional (vp/UT) está dentro de los estándares normales y no mostró pérdida en capacidad de replicación oncolítica medida por un valor CI50 no afectado (Figura 9).

15 La afinidad de unión de la versión mutada Hex512 presente en ICOVIR15K-QD también se ensayó usando el ensayo de estabilización de HLA-A2.1 previamente descrito. Como se muestra en la figura 10, la mutación L520P en el epítomo Hex512 redujo significativamente la unión a HLA-A2.1 en más de 10 veces y se puede considerar una deleción epitópica funcional.

Ejemplo 7

20 Actividad antitumoral del adenovirus oncolítico ICOVIR15K-QD

Se realizó evaluación adicional del potencial terapéutico del cambio inmunitario por deleción de epítomos adenovíricos inmunodominantes con ICOVIR15K-QD, en el que no se ha insertado antígeno tumoral. Su actividad antitumoral se evaluó en dos modelos de ratón diferentes: ratones transgénicos HHD y ratones C57BL/6 A2/KbH-2+ transgénicos. Los ratones C57BL/6 A2/KbH-2+ son una cepa de ratón también manipulada para expresar Ag de MHC de clase I humano HLA-A2.1, pero no inactivados para MHC de clase I murina H-2.

Actividad antitumoral del adenovirus oncolítico ICOVIR15K-QD en ratones C57BL/6 A2/K^bH-2+ transgénicos

30 Se inyectaron por vía subcutánea 10^6 células B16CAR-A2 en ambos flancos de los ratones C57BL/6 A2/K^bH-2+ transgénicos y se dejaron formar tumores (n = 5 animales/grupo). El día 8 tras la inoculación, los tumores se inyectaron por vía intratumoral con 10^{10} vp de 1) adenovirus oncolítico ICOVIR15K, 2) ICOVIR15K-QD, o 3) PBS. Las soluciones madre de virus se diluyeron a $5 \cdot 10^{11}$ vp/ml en PBS y se inyectaron dos veces por tumor con volumen de 10 μ l por sitio de inyección usando una jeringa de insulina BD de 0,3 ml, 30 G (Becton Dickinson 324826). Específicamente, la primera inyección se administró al tumor y se selló con 5 μ l de pegamento quirúrgico (VetBond). Después de esperar 30 segundos para que se fraguara el primer sello, la segunda inyección se administró al mismo tumor y se selló con VetBond. El tamaño del tumor se midió con un calibrador digital y se calculó según la fórmula $V \text{ (mm}^3\text{)} = \pi/6 \times W \times L \times D$, donde W, L y D son anchura, longitud y profundidad del tumor, respectivamente. Se usó la prueba de la t de Student bilateral para comparar por pares la significancia estadística de las diferencias en el volumen del tumor entre los diferentes grupos de tratamiento. Para las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier, el punto final se estableció a un volumen tumoral $\geq 500 \text{ mm}^3$. Los animales cuyo tamaño tumoral nunca alcanzó el umbral se incluyeron como información censurada a la derecha. Se usó una prueba del orden logarítmico para determinar la significancia estadística de las diferencias en tiempo al suceso. Los resultados se muestran en la figura 11.

45 Los tumores inyectados con PBS crecieron rápidamente. Los tumores inyectados con adenovirus oncolítico ICOVIR15K retrasaron significativamente el crecimiento tumoral como resultado de la destrucción de células tumorales por replicación de adenovirus intratumoral. Además, tres de los siete tumores inyectados con ICOVIR15K desaparecieron. Sin embargo, en el grupo inyectado con ICOVIR15K-QD, el crecimiento tumoral se redujo significativamente más con respecto a ICOVIR15K, con la desaparición de cuatro de los ocho tumores inyectados (Figura 11A). La supervivencia mediana de los animales tratados con ICOVIR15K se ajustó a 24 días (comparado con los 21 días para el grupo tratado con PBS), mientras la supervivencia mediana fue 65 días para los animales tratados con ICOVIR15K-QD (Figura 11B). Estos datos muestran que eliminar los epítomos de células T inmunodominantes de adenovirus (mutaciones Hex917 y Hex512) produce actividad antitumoral aumentada de los adenovirus oncolíticos independientemente de la expresión de antígeno tumoral del virus, que sugiere que los antígenos tumorales liberados del tumor por el efecto de replicación del virus y citotoxicidad son capaces de dirigir una respuesta inmunitaria antitumoral eficaz.

Actividad antitumoral del adenovirus oncolítico ICOVIR15K-QD en ratones transgénicos HHD

Se inyectaron por vía subcutánea 1×10^6 B16CAR-A2 en ambos flancos de los ratones HHD A2/Kb H-2b- transgénicos y se dejaron formar tumores ($n = 4$ animales por grupo). Los tumores del lado derecho se inyectaron por vía intratumoral con $1 \cdot 10^{10}$ vp de 1) adenovirus oncolítico ICOVIR15K, 2) ICOVIR15K-QD, o 3) PBS. En este experimento los tumores del lado izquierdo se dejaron sin tratar para todos los grupos para evaluar la actividad antitumoral sistémica. Las soluciones madre de virus se diluyeron y administraron como se ha descrito previamente. El tamaño del tumor se midió durante 7 días y su volumen se calculó según la fórmula $V \text{ (mm}^3\text{)} = \pi/6 \times W \times L \times D$. Se usó la prueba de la t de Student bilateral para comparar por pares la significancia estadística de las diferencias en el volumen del tumor entre los diferentes grupos de tratamiento. Los resultados se muestran en la figura 12. Los animales se sacrificaron 7 días después de la inyección para recoger esplenocitos para evaluación por ELISPOT adicional como se describe en el ejemplo 8 a continuación.

Los tumores inyectados con PBS crecieron rápidamente, así como sus tumores no inyectados contralaterales. Los tumores inyectados con ICOVIR15K crecieron lentamente comparados con los grupos de PBS, pero el crecimiento de los tumores tratados con ICOVIR15K-QD se redujo adicionalmente, aunque no significativamente con respecto a los otros grupos durante este periodo de seguimiento de 7 días (Figura 12A). A destacar, los tumores contralaterales no experimentaron ninguna inhibición de crecimiento tumoral en el grupo tratado con ICOVIR15K, mientras el crecimiento de los tumores contralaterales a tumores tratados con ICOVIR15K-QD se redujo significativamente (Figura 12B). Esta evidencia apoya fuertemente la generación de una respuesta inmunitaria sistémica contra tumores solo para animales tratados con ICOVIR15K-QD.

En conjunto, estos datos sorprendentemente demuestran que la delección de los epítomos del hexón inmunodominantes en la cápside de adenovirus aumenta la eficacia antitumoral de adenovirus oncolíticos mediante un mecanismo sistémico que no requiere la presentación de epítomos asociados a tumores de adenovirus.

Ejemplo 8

Cambio inmunitario de respuestas inmunitarias anti-adenovirus a antitumorales al deleccionar epítomos inmunodominantes de adenovirus en ausencia de epítomos tumorales

Los ratones transgénicos HHD del ejemplo 7, que portan tumores B16CAR-A2 en ambos flancos se inyectaron en el tumor del flanco izquierdo con ICOVIR15K, ICOVIR15K-QD o PBS, también se usaron para un análisis de la respuesta inmunitaria generada por el virus ICOVIR15K-QD *in vivo*. Siete días después de ser inyectados como se ha descrito en el ejemplo 7, los animales se sacrificaron, se recogieron los bazo y se aislaron esplenocitos del bazo. Para evaluar la respuesta inmunitaria contra diferentes epítomos en este punto de tiempo, se usaron 2.500.000 esplenocitos/pocillo para determinar la inmunorreactividad por ensayo de inmunosorción ligado a enzima en mancha (ELISPOT) según el protocolo descrito en el ejemplo 4.

En este experimento, se examinó la reactividad contra los siguientes epítomos o polipéptidos adenovíricos restringidos a HLA-A2.1 humano: E1A19 (LLDQLIEEV) (SEQ ID NO: 33); Hex512 (GLVDCYINL) (SEQ ID NO: 23); Hex713 (YLNHTFKKV) (SEQ ID NO: 11); Hex892 (LLYANSAHA) (SEQ ID NO: 15); y Hex917 (YVLFVFDV) (SEQ ID NO: 19). Además, un conjunto de polipéptidos del hexón (polipéptidos de 15 aminoácidos solapantes en 9 aminoácidos de toda la secuencia de proteína del hexón) también se incluyeron. Puesto que los epítomos tumorales contra los que la respuesta antitumoral se podría montar no están definidos, también se incluyeron células murinas B16CAR-A2 tumorales que se preincubaron con IFN- γ para aumentar sus propiedades presentadoras de antígeno.

Los resultados del ensayo ELISPOT se muestran en la figura 13. En fuerte contraste con los ratones tratados con ICOVIR15K, los ratones inyectados por vía intratumoral con ICOVIR15K-QD no son capaces de montar una respuesta contra los epítomos Hex512 y Hex917, confirmando que las sustituciones de aminoácidos L520P y V925K en el hexón son funcionales *in vivo*.

Además, cuando esplenocitos de estos animales se cocultivaron con células murinas B16CAR-A2 tumorales completas para ensayar la inmunidad contra estas células, los ratones tratados con ICOVIR15K-QD mostraron mayor inmunorreactividad contra tumores B16CAR-A2 que los ratones tratados con ICOVIR15K o PBS.

En conjunto, estos datos muestran que el tratamiento con un adenovirus oncolítico en el que los epítomos adenovíricos inmunodominantes se han deleccionado es capaz de generar una respuesta inmunitaria antitumoral más potente contra el tumor comparado con un adenovirus no modificado.

Secuencias

SEQ ID NO: 1 - ICoVIR15K

taattaccctgttatccctacatcatcaataatataacctatitgtgattgaagccaatatgataatgaggggggtggagtttgtgacgtggcgccg
ggcggtgggaacggggcggtgacgtagtagtggcggaagtgtgatgttgcagtggtggcgaacacatgtaagcgacggatgtggca
aaagtgtacgttttgggtgtgcgcgggtgtacacaggagtgacaatttgcgcgggttttaggcggatgtttagtaaatgtggcgtaaccga
gtaagatttggccatttgcgggaaaactgaataagaggaaagtgaatctgaataattttgtgttacatagcgcgtaaatattgtctagggcc
ggggggactttgaccgtttacgtggagacitcgccaggtgttttctcagggtgtttccgcgtacitggcggtctgtggctcttgcgggaaa
aaggatttggcgcgtaaaagtgggtcgaagtactcggcggtctgtggctcttgcgggcaaaaaggatttggcgcgtaaaagtgggtcgaag
tacgtcgaccacaaccccgccagcgtcttgtcatttggcggtcgacgtgtacgggtcaaagtggcggtttattattatagtcagctgacgt
gtagtgtatttataccgggtgagttcctcaagaggccactcttgagtccagcgagtagagtgttctctccgagccgctccgacaccgggac
tgaataatgagacatattatctgccacggaggtgttattaccgaagaatggccgccagtctttggaccagctgatcgaagaggtactggctg
ataatcttccacctctagccatttgaaccacctacccttcacgaactgtatgaittagacytgacggcccccgaagatcccaacgaggaggg
cggtttgcagatttttccgactctgtaatgttggcgggtgcaggaagggtgacttactacttttccggcgcccggttctcgggagcc

[illegible]

[illegible]

(The following text is a highly repetitive and nonsensical sequence of characters, likely representing corrupted or placeholder data.)

[illegible]

[illegible]

caggttcaggttcctccgcgtgtgtcagggcgaaacggagtcacacttggtagctgccttccraaaaagggcgcggtgccagggccttggagttg
cactgcaccgttagtggcattcaaaaaggtgacctggtccgggtcggggcgttaggalacagcgccgtgcataaaaagcccttgatctgtctaaaagc
cacctgagcccttgcgccttcagagaaagacatgccgcaagacttggcgaaaactgattggccggacagggccgcgtcgtgcacgcagca
ccttggctgcgtgtgtggagatctgcaccacatttgcggcccaacgggttttcacgacttggccttggtagactgtccttcagggcgcggtgtgc
ccgttttgcctcgtacatccatttcaatcaecgtgctcttatttataataalgtctccgtgttagacactlaagctgcgccttcgatctcagcgagcg
gtgcagccacaacggcgagcccgtggggctcgtgattcgtttagggcacctctgcanaacgactgcagggtacgctgcaggaatcggcccat
catcgtcacaaaaggtcttggctgggtgaaggtcagctgcaccccggtgggtgtcctcgttgcagccaggtcttgcatacggccggcragagcttc
cacttggctcagggcagtagttgaagttgcctttagatcgttatccacgtggtaacttgtccalcagcgcgcgccgcagcciccatgccttctccc
acgcagacacgagtcggcacactcagcggggttcatcccgtaatttcactttccgcttgcgtgggtcttctcttctctcttgcgtccgcatacca
cggcgccactgggtgcgttcttcatcagccggcgactgtgtgccttacctcttggccatgcttgattagcaccgggtgggtgtcgtgaaaccacca
ttgtagcgccacalccttcttcttctcgtgtgtccacgattaccttgggtgatgtggcgggcgctcgggcttggggagaaagggcgcttcttctt
cttggggcgcaatggccaaaaccggcgccgaggtcgatggccggcggtgtgggtgtgctgcggcaccagcgcgctctgtgatgagcttctctc
gtcctcgggactcgtatagcgccgtctatccgcttcttggggggcgcccggggagggcgggcgggcgacggggacgggggacgacacgtctcca
tgggttgggggagcgctcgcccgccagccggctccggcgctcgggggtgggttgcggctgtcctcttccgactggccatttcttctctataggc
agaaaaagatcatggagtcagtcaggaaggaagacagcctaaccggccccctcgtagttggccaccaccggctccaccgaigccggcaac
ggccctaccaccttccccgtcgaggcacccccgcctttagggagggaggaaggtgattatcgagcaugaccaccaggttttgaagcgaaagcagc
gaggaccgctcagtaaccacagagggataaaaaagcaagaccaggacaacgcagagggaacacagggaaacagtcggggcgggggagcg
aaaggcatggcgactaccagatgtgtgggagacgacgtgtgttgaagcatctgcagcgccaggtggcgccattatctgcgacgcgttgcagga
ggcgagcgatgtgcctctcgccatagcggaigtgcagccttgcctacgaacggccacctattctaccggcggtaccccccaaaacggccaaga
aaacggcgacatggcgagcccaaccgcggcclcaacttctaccocgtatttgcgtggccagagggtgttggccacctatcacatcttctccaaa
ctgcgaagataccctatctctgcctggccaaccgcagccgagcgagacaagcagcttggcgttgcggcagggcgctgtctatactgtatalcgc
ctcgtctaacgaaagtgccaaaaactttaggggtcttggacgcgacgagaagcgccggcgcaaacgctctgcacaggaaaacagcgaaa
atgaaggctcacttggaggtgttgggtggaactcgaggggtgacaacgcgcgccttagccgtactaaaacgcagcatcgaggtcacccacttgc
ctaccggcgacttaacctaccccccaagggtcatgagcacagtcagtgaggtgagctgacgtgcgcggcgcgagcccttggagagggatgc
aaatttgcagaacaacagagggggggcctaccgcagttggcgacgagcagctagcgcgclgggttcaaacggcgcgagccgtgcgac
tggagggagcgacgcaaaactaatgatggccgcagtgctcgttaccgtggaggtgagtgcatgcagcggttcttggctgaccggagatgca
ggcgcaagctagaggaaaacttgcactacaccttgcagaggggctacgttaccgaugcctgcagatctccaacgttggagctctgcacactg
gtctctactccttgggaatttgcaggaanaaccgcttggggcaaaaacgtgcttcaatccacgctcaaugggcgagggcgcgccggcgactacgtccg
cgactgcgttacttatttctatgctacacctggcgagacggccatggggcgttggcgagcagtgcttggagggagtgcacctcaaggagctgca
gaaactgtctaaagcaaaacttgaaggacctatggacggccttcaacgagcgctccgttggcgcgccacttggcgacatcatltccccgaa
cggcttgcctaaaaccctgcacacaggggtctgccagacttccacagtcacaaagcatgttgcagaactttaggaaacttactagagcgctcaggga
atcttgcggcgcaacctgtctgtcaacttcttagcgacttgggttgccttaagtagccgggaatggcctccgcggcttggggccacttgcacttct
gcagcttagccaactaccttggctfaccactctgcataatggaaagacgtgagcggtgacgggtctactgaggtgactgtgtcgtgcgaactat
gcaccccgacggctcccttgggttgaatttgcagctgtgttaacgaaagtaaaatatacgggtacctttagagctgcaggggtccctgcgctgacg
aaaagtccggcggtccgggggttgaactcactcgggggctgttggagcttggcttacccttgcgaattttagcttagggactaccacggccac
gagattaggttctacgaagaccaatcccggccgctaatgctggagcttaccgcttgcgtctattaccaggggccacattctggccaaattgca
agccatcaacaaagcccgcraagatttctgtacgaaagggacgggggggttacttggacccccagtcggcgagggagctcaaccat
ccccccggcgcgagccatcagcagcagccggggcccttggcttccaggtatggcaaccaaaagaagctgcagctggcgccggcc
accacggacgaggagggaalacttggacagtcagggagaggaggttggagcaggaagggagacatgtatgaaagactcgggaug
cctagacgagggaagcttccgaggtcgaagaggtgtcagacgaaacacggcaccctcggttgcatttcccctcggcgcccccagaal
cggaacccgggttcagcatggctacaacctccgctcctcaggcgccggcgacgtgccgttgcggacccaaccgtagatgggacacc
acttggaaaccagggcggttaagtccaagcagccggcgccgtttagcccaagagcaacaaacagcgccaaaggctaccgtcatggcgcaagg
cacaagaacgccatagttgctgtgtgcaagactgtgggggcaacatctcttgcggcgccgttcttctcttaccatcacggcggtggccttcc
cccgtaacatctcgtacattacacgttcatctctacagcccaactgcacggcgggcagcgcggaacagcagcgggccacacagaagcaa
auggcgaccggafagcaagacttgcacaaagcccaagaaatccacagcggtggcgagcagcaggaugagggagcgctgcgtctgtgcgc
caacgaacccgtatcgacccgcagacttagaaacaggatttctccactctgtatgclataatttcaacagagcagggggcgaagaacaagagc
tgaaaataaaaaacaggtctctgcgactcctcaccgcagctgctgtatcacaaaagcgaaatcagcttccggcgacgctgtggaagacgc
ggaggtctcttcaataataactcggcgctgacttgaagaaactagtttgcgccttctcaaatthaagcgcaaaactacgtcatctccacg

taggactaaaglacggggctcttgcattglaacagacacctaaccatttgaccgtagcaactggccagggtgactatlaaataacttc
 ctgcaaaactaaagttactggagccttgggtttgattcacaaggcaatafagcaactaaigtacaggaggactaaggatgattctaaaaca
 gacgccctatacttgatgttagttatccgtttgatgctcaaaaccaactaaatctaaagactaggacagggccctcttttataaactcagccaca
 acttggatataactacaacaaaggcccttacttgcattacagcttcaacaattccaaaaggcttgagggttaacctaaagcactgccaagggttg
 atgtttgacgctacagccatagccattatagcaggagatgggcttgaatttgggttcactaatgacacaaacacaaatccctcaaaaacaaa
 atiggccatggcctagaaattgattcaacaaggctatgggttctaaactagggaactggccttagtttgacagcacagggtgccattacagtag
 gaaacaaaaataatgataagctaacttgggtgaccacacagctccatctcctaactgttagactaaatgcagagaaagatgclaaacacactit
 ggtcttaacaaaaatgggcagtcacatacttgcctacagttcagtttggctgttaaggcagtttggctccaatatctggaacagttcaagtgcc
 tcatctattataagattgacgaaatggagtgctactaaacaattccttctggaccagaatatgggaacttagaattggagatcttactgaa
 ggcacagccctatacaaacgctgttggattatgcttaacctatcagcttaccaaaatctcagggtaaaactgccaaaagtaacattgtcagta
 agtttacttaaacggagacaaaactaaacctgtaacactaacattacactaaacgggtacacaggaacaggagacacaaactccatctgcat
 actctatgtcatcttctatgggactgtctggccacaactacataatgaataatgttgcacatctcttactacattttctacatttgccecaagataa
 agaattctgtttgtttatgtttcaacgtgtttatgtttcaattgcagaaaatttcaagtcatttttactcagtagtatagccccaccacacatagcttat
 acagatcacggctacctaatacaactcacagaacctagattcaacctggccacctccctcccaacacacagagtacacagtcctttctcccg
 gctgggcttaaaaagcatcatatcatgggtaacagacataatcttaggtgttataatccacacgggttctctgagccaaacgctcatcagtgat
 atiaataaaactcccgggcagctcacttaagttcatgtctgtctccagctgtctgagccacaggtgtgtctccaaacttgcgggtgttactaacgggc
 ggccgaaggagaagtcacgacctacatggggtagagtcataatctgctcatcaggatagggcggtgtgtctgcagcagcgccggaataaa
 ctgtctgcggccgctcgtctgtcaggaatacaacatggcagtgctgtctcctcagcgatgattcgcacggccgcgagcagataaggcgctt
 gtctctggggcacagcagcgccacctgattctcacttaaatcagcacagtaactgcagcacagcaccacaatattgttcaaaatcccacagtg
 caaggcgctgtatccaaagctcatggcggggaccacagaacctcagtgcccatataccaagcgccaggttagaataagtgccgacccc
 tcaataaacacggctggacataaacattaccccttttggcatgttgaattcaccacctcccggtacatataaacctctgattaaacatggcgccat
 ccaccacacccctaaacagctggccaaaacctggccggcggtatatacactgcagggaaacgggactggaaatgacagtgaggagacc
 caggactcgttaacctggatcatcatgtctgtcatgatatcaatgttggcacaacacagggcacagtgcatcacctctcaggattacaagct
 cctcccggtttagaaccataatcccagggaacaacctatctgaatcagcgtaaatcccaactgcaggggaagacctgcacgtlaactcac
 gttgtgcatgttcaaaagtgttactcgggcagcagcggatgctcctcagtatggtagcgcggttctgtctcaaaaggaggttagacgaltc
 cctactgtacggagtgccggagacaaccgagatctgttgggtcgtaggtgtcatgccaatgggaacggcgagcgtagtcataatctctgaag
 caaaaccaggtgcggcggtgacaaacagatctgctgtcgggtctcgcggcttagatcgtctgtgtagtaggtgttagtatccactctca
 aagcatcagggcgcccccgttctgggttctatgttaactcctcattgcgcgctgtccctgataacatccaccacggcagataagccaca
 cccagccaaactacacattcgttctgcaggtacacacgggagggagcgggaagagctgggaagaaccatgttttttttttattccaaaagatta
 tccaaaacctcaaaatgaagatctatagtgaaacggcgtccccctcgggtggcggttcaaaactctacagccaaagaacagataatggcattt
 gtaagatgttgacaaatgggttccaaaaggcacaacggccctcaggtccaagtgagacgtaaaggctaaaccttcaggggtgaatctccttat
 aaacattccagcacttcaacatgcccataaattctcattctcggccacttctcaatatactctaaagcaaatccgaatattagtcggccat
 tgtaaaaatctgtctcagagcgccctccacctcagcctcaagcagcgaatcatgattgcaaaaatccagggtctcagacagctgtataagat
 tcaaaaggcggaacatacaaaaataccgcgattcccgtaggtcccttgcaggggccagctgaaacataatctgtcaggtctgcacggacca
 ggcggccacttcccggcaggaacatgacaaaagaacctacactgattatgacacgcatactcggagctatgttaacaggcttagccc
 cgaigttagcttctgtcattggcgccgataaaaatgcaaggtgtctgtcaaaaatcaggcgaagcctcgcgcaaaaagaagacacatc
 gtagtcatgtctcatgagataaaggcaggttaagctccggaacccacagaaaaagacaccattttctctcaaacatgtctcgggtttctg
 cataaacacaaaaataaatacaaaaaaacatttaaacattagnagcctgtcttacaacaggaaaaacaaccttataagcataagacggact
 acggccatgcggcggtgaccgtaaaaaaactgggtacccgtgattaaaaagcaccacggacagctcctcgggtcatgtccggagtcataatgt
 aagactcgggttaaacacatcagggttgattcatalcgggtcagtgctaaaaagcgaccgaaatagcccgggggaatacatalcccgcaggcgta
 gagacaacattacagccccataggaggtatacaaaaattataggagagaaaaacacataaacctgaaaaacctcctgcttaggcaa
 aatagcaccctcccgctcagaacaacatacagcgtctccacagcggcgagccataacagtcagcctaccagtaaaaaagaaaacctatta
 aaaaaacaccactcgaacgggcaccagctcaatcagtcacagtgtaaaaaaggcccaagtgacagcgaggtataataggaactaaaaaat
 gacgtaacgggttaagttccacaaaaaacaccagaaaaccgcagcgaaacctacggccagaaacgaaagccaaaaaacccacaacttcc
 tcaaatctgacttccgttttccacgttaagtcacttccattttaaagaaaactacaattcccaacacatacaagttactcggccctaaaaacctac
 gtacccggcccggttccacggcccgccacgtcacaactccacccctcattatcatattggcttcaatocaaaataaggtatattatgat
 gatgtagggaacagggttaattat

SEQ ID NO: 2 - ICOVIR15K-gp100-tyr

[illegible]

gcatgcaagctgattgccaggggcaagggcccttgggtgtaagtggttacaagaagcgttgaagctgggaatgggtgcalacgtggggataatgagat
gcatttgggactgtatttttaggttggctatgttccagccataatccctcgggggattcattgtgtgcagaaccaccagcacagtgtalccgggtg
cacttgggaaatttgttcalgtagctttagaaggaatgcgttgaagaacttggagacgcccttgtgacctccaagatttccatgcattegtccat
aatgatggcaatggggccacggggcgggcggtctgggcgaaagataatttctgggatactaacgtcatagtgtgttccaggatgagatcgtcat
agggccatttttacaagaagcgcgggcgaggggtgccagacttgcgggtataatgtgttccatccggccacggggcgtaagttaacctcacagatttgc
catttccacgcctttaggttcagatgggggggattcatgttacctgcggggcgatgaagaaaaacgggttccgggggttagggggagatcagcttgg
gaagaaagcaggttccigagcagcttgcgaacttaccgcagccgggttggggccgtaaaacacacctattaccgggtgcaacttggtagttaagag
agctgcagcttgcggtcatccctgagcagggggggccacttctttaagcatgtccctgtacitcgcatgttttccctgaccaaaatccggccagaagg
cgctcgcgcgccagcgatagcagttcttgcgaaggaagcaaaagttttcaacgggttgagagccgtcgcgcgttaggcattgtttttagcgggttga
ccaagcagttccagggggttccacagctcgggtacacttgccttaccggcatcgcagatccagcatatctccctgttccgggggttggggcggtt
cgctgtacggcagtagtgcgttgcgttgcacagacggggcaggggttccacggggcgaggggtctctgtcaucgttagtctgggtcac
gggtgaaggggtgtgcgtccgggtgtgcgttggccaggggtgcgttgaaggtctgtctgtgtgtgtgaagcgcttccgggttccgcttgc
cggttgcggccaggtagcatttgacratgggttcatagtccagccctccggggcggttggggcggttgcgcaggttgccttggaggaggcc
ggcgccagaggggcgagtgcagactttagggggcgtagagcttggggcgagagaataaccggttccgggggagtagggatccggcgcccgag
ggcccgccagacgggtctcgcatccacagagccagggtgagcttggggcggttgcggggcgaacaaacagggttcccccattgtttgatgcgtt
ttaccttgggttccatgagccgggtgtccacgctcgggtgacgaaggggtgtccgttgcgttcccggtalacagacttgaagggcctgttcccgagc
gggtgttccgggttccctctctgtatagaaactcggaccactctgagacaaaggctcgcgtccagggcagcaggaaggaggttaaggttggag
gggttagcggttctgttccataggggggtccactcgtccaggggttgaagacacatgtccctcttccggcatcaaggaaagggtgattgtt
gtaggtttagggccaggttaccgggttctgaagggggggtataaaaaaggggttggggggcggttctgtctacttcttccgcatcgcgt
cttgcgagggggcagctgttgggggttagtactccctctgaaaagcggggcagacttctgcgttaagattgtcagtttcaaaaaacagggggga
ttgatatcacttggcccggttggatgcccittgaggggtggccgcatccatcttggtcagaaaagacaatcttttgttgcgaagcttgggtggcaa
acgaccccgtagagggcggttggacagcgaacttggcgatggagcgaggggttgggttttgcgtcgcgtccggcggtccttggccgcgatgtt
agctgcacgtatcgcgcgaacgcacccgcatccgggaaagacgggtgtgtcgtcgtcgtcgggcaccaggttgcacgcgcaaccgcgtt
gtcaggggtgacaaggtcaacgctgtgtgttaccttccgcgttagggcgctcgttgggtccagcagaggcgggcgcccttgcgcgagcaga
atggcggttaggggggtcagctgtgtcgttccgggggggttgcgttccaggttaagagaccggggcagcagggcgcggtcgaagtagtct
atcttgcatecttgcgaagttagcgctgtgtccatgtcgcggggcggaagcgcggtcgttattgggttgaattgggggaccccatggcatgg
gggtgggtgagcgcgagggcggtacatgccgcaaatgtcgttaaacgttagagggggtctctgagttatccagatatgtagggttagcatctcca
ccggcggtgtgtgtgcgcgcacgtaatctgtatagtctgtcggaggggagcgaggaaggtcgggaccgaggttgcacggggcggtcgtcctgc
tcggaaagactatctgctgaagatggcatgtgagttgagatattgttggacgtcgggaagacgttgaagctggcgtctgttagacctaccg
cgtcacgcacgaaggagggcgttagggatcgcgcagcttgttgaaccagctcggcggtgacctgcacgtttagggcgagtagtccaggggtt
ccttgatgatgtcatacttacctgtcccttttttccacagctcgcgggttagggacaaactcttcgcgggttccagiaccttggatcggaac
ccgtcggcctccgaacggtaagagccttagcatgtagaactgtgttgcagggccttggtagggcgagcatcccttttctacgggttagcggtatg
cctgcgcgggccttccggagcgaggttgggttgaugcgcaaggtgttgcctgacctgacattgaggtgactggtatttgaagtcagtgtcgtgc
catecgccctgtctccagagcaaaaaagtcggtgtgttgggaacgcgggttggcagggcggaaggtgacatcgttgaagagtatcttccc
gcgcgagggcataaagtgtgtgtgaltcggaaaggggtccggccaccicggaaacgggttgaattaccttggggcgagcagcaictgtca
aagccgttgaattgttggcccaaatgtaaggttcaagaagcgcggggtatgccctgattggaaggcaatttttaagttctcgttaggtgagct
cttcagggggagcttagccgttgcctgaagggggccagcttgcgaagatgaggggttgaagcgacgaatgagctccacaggtcacggggc
aitagcatttgcaggttgggtcggaaaggttctaaacttggcgacctatggccatttttctgggggtgatgcagttagaaggtaagcggggttgtt
cccagcggttcccatccaaaggttccgggttaggttctcgcgcggcgagcacttagaggtcatctccggccgaacttcatgaccagcatgaagg
gcacgagctgttcccaaggcccccacaaagtataggttcttacctgttaggttacaagagagacgtcgggttcgaggaatgcagcggga
tcgggaagaacitggatctccggccaccaatitggagaggttgcctattgatgttgaagtagaagltccctgcagcggggcggaacacictgt
ctggcttttgaaaaaacgtgcgcagttacttgcagcgggtgcacgggctgtacatctgcacaggggttgaactgacgaccgcgcacaaggaa
gcagagtgggaatttgaugcccttgccttggcggggttggctgtgtgttctacttgggttcttgtccttgaaccgttgggtgtcgtcgauggg
agttacgttggatgggaccaccacgcgcgcgagcccaagtcagatgtccgcgcgcggcggttggagctttagtacaacatcgcgc
agatgggagctgtccatgggttggagctcccgcgcggtcaggtcagggcggaagctctcgtcaggttacctcgtcatagacgggtcagggcg
cggtctagatccaggtgatacctaatttcaggggctgtgtgtgtgcgcgtcgtatgggttgaagggcgcatcccgcgcgcgact
acggtaaccgcgcggcgggcggttggccgcgggggtgtcttggatgtatgtcaltaaaagcgggtgacggcgcgagcccccggaggtga
ggggggcctccggaaccccggaagggggcgaggggcacgttgcggcccccgcggcgagcgtgtcttccgcgcgttgcgtt

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

cgggggggttacttggacccccagtcggggagggagctcaacccaatccccccgcccggcagccctatcagcagcagccggggccc
 ttgcttcccaggaatggcaccacaaaagaagctgcagctgcggccgccaccacggacggaggaatacttggacagctcagcagagga
 aggttttggacgagggagggagggacatgatggaagactgggagagccctagacgaggaagcttccgaggtcgaagaggtgtcagacga
 aacaccgtcacccctgggtgcattccccctggcggcgcccaganaatcggaacccgggtccagcatggctacaaactccgctcctcaggc
 gcccggcgacatgcccgttgcggacccaaccgtatgagggacacacatgggaaccagggcgccgtaagtcgaagcagccggccggcgtta
 gcccagagcaacaacagcgcccaaggctacccgtcatggcgcgccgacagaacgccatagttgcttgccttgcagacgttgggggcaa
 catctccttgcggcgcttcttctctaccatcacggcggttgccttcccccgtaacatcctgcattactaccgtcatctctacagcccatactg
 caccggcgagcagcgccagcgccagcagcaacagcagcggccacacagaagcaaaaggcgaccggatagcaagactcagacaagccccaa
 gaaatccacagcggcgccagcagcagggagggagggagcgctgccttggcgcccaacgaacccgtatcgaccggcgagcttagaagacag
 gatttttccactcgtatgtatatttcaacagagcagggggccaaagaacaagagctgaaaaataaaaaacaggtctctgcgafccctaccgg
 cagctgcctgtatcacaagaagcgaagatcagcttcggcgacgctgggaagcggcgaggtctctctcagtaaaactgcggcgctgacttta
 aggaactagtttgcggcccttctcaaatfaagcggcgaatactacgtatctcagcgccacacccggcgccagcactgtcgtcagcgcc
 attatgagcaaggaaatccacggccctacatgttggagttacagccacaatgggacttggggctggagcgcccaagactactcaacc
 gaataaactacatgagcggggacccacatgatatccgggttcaacggaaatccggcgccacggaaacggaaatctcttggaaacggcg
 ctattaccaaccacacctgtaataacttaacccccgtagttggcccgctgcccctgtgttaccaggaaggtcccgctccaccactgtggtact
 tcccagagacggccagggcgaggtcagatgacaaactcagggggcgagcttgcggcggttcttgcacaggggtgcgggtcggccggg
 aggggtatactaccctgacaaacagagggcgaggtattcagctcaacgacagagctgggtgagctcctcgttgggtctcctcggcgacgggac
 attcagatcgggcgccggcggtcttcttctcagcctcgtcagggcaatcctaactctcagacctcgtcctctgagcggcgctctggag
 gcatgggaactctgcaattatgagggagtttggccatcggtctacttaaceccctcggggacctccggccactatccggatcaattatctc
 taactttagcgcggttaaggagctcggcgacggcctacgactgaatgttaagtgagagggcagagcaactggccgtgaaacacctgggtcca
 ctgtcggcgccacaagtgttggccggactccgggtgagtttgcctacttgaattggccgaggatcatatcgaggggccggcgccagggcg
 tccggcttaccggccagggagagcttcccgtagcctgattcgggagttaccacggcgcccccctgtagttgagcgggacaggggacct
 gtgttctcacttgcatttgcactgtcctaacccttggattacatcaagatcttgggtccatctctgtctgagtataataatacagaataaaaaa
 tactgggggtctctatcgccatctgttaaacgccaccgtcttaccggcccaagcaaaccaaggcgaaacttaccgtggtactttaacatctc
 cctctgtatataaacagtttcaaccagacggagtgagctacgagagaacctctcggagctcagctactccatcagaaaaaacaccacc
 ctcttaccgtcggggaacgtacgagtgctcaccggcgctgcaccacactacggcctgacgttaaacagacttcttccggacagacc
 tcaataactctgttaccagaacagggaggtgagcttgaaaaaccttgggttattaggccaaaggcgagctactgttgggttattgaacaat
 caagcaactctacgggtatttctaattcaggttctctagaatcggggttgggttattctctgtcttgggttcttatttcttataactaacgttctc
 tgcctaaggctcggcccgctgtgtgtgcacattgtcatttatgtcagctttaaaccgttgggttgcgcaccacaagatgattaggtacataatcc
 taggttactcacccttgcgtcagccacggtaaccacccaaaagggtgattttaaaggagccagcctglaattgtacattcgagctgaagctaa
 tgagtgaccacacttataaaatgcaccacagaacatgaaaagctgttatttgcacaaaaacaaatggcaagatgctgttattgtattt
 ggccagccaggtgacactacagagtataatgttacagtttcaggglaaaagtcataaaacttattgtatatttccatttattgaaatgtgcga
 cattaccatgtacatgagcaaacagtataagttgttggcccccacaaaattgtgttggaaaacactggcaatttctgtcactgtatgctaatta
 cagtgctcgttgggtctgtacactactctatattaaatacaaaagcagacggcagcttattgaggaaaagaaaatgcttatttactaagttac
 aaagctaatgtcaccactaacgtcttactcgtctgttgcacaaacaaatcaaaaagttagcattataatagaataggattaaacccccgggtc
 atttccgtcctaatafaceattccctgaacaattgaactctatgttggatgtctcagcgctacaaccttgaagtcaggcttcttggatgtcagcat
 ctgacttggccagcactcttccgggatttcttccagttccactacagcgaccacacctaacagagatgaccaacacacacacacggcgcc
 cggcgctacccggactacatctaccacaataacaccccaagtttctgcttcttcaataactgggataacttgggcatgttgggtgttctccatag
 cgttattgttgtatgcttatttatttattgttggctcactctgtcctttaaagcgcaaacggcgcccgaccacccatctatagtccttcatgttgcaca
 cccaaacaatgattggaatccatagattggacggacigaaacacatgttcttcttctacagtatgattaaatgagacatgattctcaggttita
 taltactgaccttgttgcgttcttctgtgtgtcctcacttggctcgttctcactcgaagtagacigcattccagccttccacagictatttgc
 ttacggatttgcacccctcagctcatctgcagcctcatcactgttggctcgttcttccagtgcaatggacttgggtctgtgtgcgttgcataf
 ctcagacacacccagctacagggacaggaactatagctgtgagcttcttgaatctttaaattatgaaatttactgttacttctgtgattatttgc
 accctatctggttltgttcccgacctccaagcctcaagacatataatgcagattcactcgtalatggaatltccaagttgtacaaatgaa
 aaaagcgatcttccgaagcctgttattatgcaatcatctctgttattgttctgtcagttaccatcttagccctagctatatacccttaccctgacat
 tggctggaaacgaatagatgcacacaccccaacttccccggcgccgctatgcttccactgcaacaagttgttgcggcggttcttccc
 agccaatcagcctcggccacttccccacccccactgaaatcagctacttaactaacaggaggagatgactgacacctagatctagaaa
 tggacgggaattatcagagcagcgccctgtgaaagacgcagggcgagcccgagcaacagcgcctgaatcaagagctcacaagacat

ggtaacttgcaccagtgcaaaagggtgtaacttcttcttgcgtgtaaaagcaggccaagtccactacgacaglaataaccacgggacaccgctta
gtctaacagttgccaaaccagcgtcagaaattgggtgcatgggtgggagaaaagcccattacccaaactcagcactcggtagaaaaccgaagg
ctgcattcactcactctgtcaaggacctgaggatctctgcacccttaagaaccctgtgctgggtctcaaaagatcttattcccttaactaataaaaa
aaaataataaagcactcacttaaaatcagttagcaaatctctgtccagttattcagcagcactccttgcctctccagctctgggtattgc
agcttccctcctggcgtcgaacttctcccaaatctaaatgggaatgtcagtttctctgttccatccgcaaccactatctcatgttcttgc
gaatgaagcgcgcaagaccgtctgaagataccctcaaccccgtgtatccatagacacgggaaccgggtcctccaactgtgcctttcttactcct
cccttgtatcccccaatgggttcaagagagtccccctgggggtactctcttgcgcctatccgaacctcagttacccccaatggcagcttgcg
ctcaaaatgggcaacggcctctctctgggacgaggcgcggaaccttaccctcccaaaatgtaaccactgtgagcccacctctccgaggagaca
agtcacaacataaactctggaatatctgcaccccctcagtgtaacctcagaagccctaactgtggctgcgcgcgcacctctaattggctgcgggc
aacacacacaccatgcaatcacaggccccgtctaaccgtgcacgactccaaacttagcattgccaccgaaggacctcacaagtgtcagaag
gaaagctagccctgcaaacatcaggccccctcaccaccaccgtagcagtaaccttactactactgctcaccctcttaactactgcccact
ggtagcttgggcattgtactgaagaagcccattatcacaaaaatggaaaactaggactaaagtacggggctccttgcagtaacagacgac
ctaaacacttgcaccgtagcactggctccaggtgtgactatataaataacttcttgcgaactaaagttactggagccttgggtttgtatcacaa
ggcaataitgcaactaatgtagcaggagggactaagggaattgtctcaaaaacagacgccccttatacttgatgttagttatccgttgtatgctcaaaac
caactaaatctaagactaggacaggggccctcttattataaaactcagcccacaacttggatattactacacaacaaaggcccttacttgggttacagct
tcaacaacttccaaaaagccttgagggttaacctaaagcactgccaagggggttgatgtttgacgctacagccatagccattaatgcaggagatggg
cttgaatttgggtcaactaatgcacaaacacaaatcccccaaaaaaatttggccatggccttagaatttgaatcaacaaggcctatgggttcc
taacttaggaacttggccttagttttagacagcacagggtgccattacagtaggaacaaaaataatgataagctaacttcttgggaccacaccagc
tcacatctctaactgttagactaaatgcagagaaagatgctaaactcacttgggtttaaacaataatgtggcagtcacaacttcttactacagttcagt
tttggctgttaaaaggcagtttggctccaalatctgggaacagttcaaaagtctcacttattataagatttgacgaaaatggagttgctactaacaat
tccctctgggaccagaataitgggaactttagaaaatggagatcttactgaaggccacagcctatacaaacgcgtgttggatttatgccaaactatc
agcttatecaaaatctcaccgttaaaacttcccaaaagtaacattgtcagtcgaagttaacttaaacgggagacaaaactaaacctgttaactactaac
attacactaaacgggtacacagggaacaggagacacaactccaaagtgcatactctatgtcatttcatgggactgggtctggccacaactacatta
atgaaatatttggccacatctctacacttttcatacttggccaaagaataaagaalcgttgggtttagtttgaactgttattttcaatgtcagaa
aaattcaagtcatttttcatcagtagtagtagcccccaccaccacatagcttatacagatcacccgtaccttaatacaactcacagaacctagtttc
aaccttgcacactcctccccaacacacagagtagacacagicttcttccccggctgggcttaaaaaagcactataatcatgggttaacagacatactt
taggtgttatattccacacgggttctctgtcagcgaacgcctcactcagtgatattataaactccccgggcagctcacttaagttcatgtcgtctgt
ccagctcgtcagccacaggctgtctgtcacttggcgttgccttaacgggcggcggaaggagaaagtccagccctacatggggggtagagtcatt
aatcgtgcactcaggatagggcggtgtgtgtcgcagcagcggcggaataaactgtctgcgcgcgcgcctcctgtcgcagggaatacaacatgg
cagtggtctctcagcgatgattcgcaccccccgcagcataaggcgccctgtctccuugcagacagcagcgcacccctgatctcacttaaalca
gcacaglaactgcagcacagcaccacaafattgtcaaaatcccacagtgcaaggcgctgtatccaaagctcatggcgggggaccacagaa
cccacgttggccatcataccacaagcgcaggttagaataagtgccgaccctcataaaacacgctggacataaacattactcttcttggcattgtt
taattcaccacctcccggtaaccatataaacctctgattaaacatggcgccatccaccaccatccaaaccagcttggccaaaaaccttgcgcgc
ggctatcacactgcagggaacccgggacttggaaacatgacagttggagagcccaggactctglaaccttggatcatcatgtctgtcatgatatca
atgttggcacaacacaggcacacutgcatacacttctcaggtatcaaaagcttccctcccggttagaaccatatccagggaacaacccattc
ctgaatcagcgtlaaatccacactgcagggaagacctcgcacgttaactcaggttgcattgtcaaaaggtttacattcgggcagcagcggat
gatctctcagtagtggttagcgcgggttctgtctcaaaaggaggttagacuatccctactgtacggagttgcgcggagacaaccgagatcgtgt
gggtcttagtgtcatgccaaatggaaacgcgggacgttagtcatatttcttgaagcaaaacagggtgcggggcgtgcaaaacagatctcgtctc
cggtctcgcgcgttagatcgtctgtgttagttagtttagtataccactctcctcaaaagcaccaggcgccccctggcttccgggttctatgtaact
cttcatlccgcgcgttgccttgataacatccaccaccgcagaalaagccacaccagcccaactacacattcgttctgcgagtcacacacgg
gaggagcgggaagagctggaagaacctatgttttttttattccaaaagattatccaaaacctcaaaatgaagatctattasgtgaacgcgtc
ccctccggtggcgttggcctcaaacctacagccaaagaacagalaatggcatttgaagatgttgcacaatggcttccaaaaggcacaacggccc
tcacgtcgaagtggacgttaaaaggctaaacccctcagggttgaatctctctataaaacttcagcaccctcaaccatgcccataaattctcatct
cgccaccttctcaatatacttcaagcaaatcccgaatattaagtcggccattglaaaaatctgtctccagagcgccctccaccttcagcctcaa
gcagcgaatcatgattgcaaaaattcagggttctcacagacctgtataagattcaaaagcgggaacattaaacaaaataccgcgactccgttag
gtcccttgcgaagggcagctgaacataatctgtcaggtctgcacggaccagcgogggccactccccgcagggaacctgacaaaagaac
ccacactgaattatgacacgcatactcggagctatgctaaaccagcgtagccccgatgtaaagcttgggtcagtagggcgggcgatataaaatgcaag
gtcctctcaaaaaatcagggcaaaagcctcgcgcaaaaaagaaagcacatcgtagtcatctcatgcatgataaaagcgaagttaacctccga

aaccggtgtttgacalaccatgaagatctggaaggctcgaagtacatgagaccgccaccaggtgcagaccctgcagagtgccgggta
aacatattaggaaccagccctgtagtctggatgtagaccgaggagctgaggcccgatcacttgggtctggccctgcacccgcctgagttgg
ctctagcgatgaagatacagattgaggtacigaaatgtgtggcggtggcftaagggtgggaaagaataataaagggtggggcttattgtagttt
tgtatctgtttgcagcagccgcccgcgcatgagcaccactcgtttgatgggaagcattgtgagctcataattgacaacgcgcattgccccat
ggggccgggggtgcgtcagaatgtgatgggtccagcattgatgggtcggcccgctcctgcgcgaactctactaacttgacctacagagaccgt
gtctggaacgcgctgggagactgcagccctccgcccgcctcagccgcctgcagccaccgcgcgggggattgtgactgacttgccttctga
gcccgcctgcgaagcagtgccagctcccgcttccgcgcgcggaigacaaagtgcagggctcttttggcacaattggatctttgaccggggaact
taattgtctgttctcagcagctgttggatctgcgccagcaggtttctgccttgaaggcttccctccctcccaatgcgggtttaaacaataaataaaa
aaccagactctgtttgatttggatcaaggaagtgtcttgcctgtcttatttaggggttttgcgcgcgcggttagggcccgggaccagcgggtctcg
gtcgttgagggtctctgttattttccaggacgttggtaagggtgactctggatgttcagatatacagggcataagcccgctctgtgggttggagg
lagcaccactgcagagctcatgctgcggggttgggtttagatgatacagctcgttagcaggagcgtcggcgctgtgttgcctaaaaatgtcttcc
agtagcaagctgattgccaggggcagggccctgtgtgtaagtgtttacaaagcgttaagctgggatgggtgcatacgtgggatafatagat
gcacttggactgtatttttaggttggctaigtccagccataaccctcggggattcatgttgcagaaaccaccagcacagtgtatccgggtg
cacttggggaattgtctatgtagcttgaagggaatgcgtgggaagaacttggagacggccttgttgacctccaagatttccatgcattctgccc
aatgatggcaatggggccaccggggcgggcgctggcggaagatatttctgggaltactaacgtctagttgtgttccaggatgagatcgtcat
aggccattttacaaagcgcggggcgagggttccagactgcggtataatgttccatccggcccaggggcgtagttaccctcacagatttg
cattccacgcctttagttcagatggggggtatgtctactctgcgggcgataaagaaacgggttccggggtaggggagatcauctgg
gaagaaagcaggctcctgagcagctgcgacttaccgcagccgggtggggccgtaaatcacacctataccgggggcacactggtagttaagag
agctgcagctgcgctcatccctgagcagggggggccactctgtaagcatgtccctgactgcagtttccctgaccaaatccggcagaagg
cgctcgcggccagcgtatagcagttcttgcgaagggaagcaaaagttttcaacgggttgagaccgtccggccgtaggcattgttttagcggttga
ccaagcagttccaggcggtccacagctcgggtcactgtctctacggcatctcgatccagcatalctcttcgttgcggggttggggcggtt
cgctgtacggcagtagtcgggtctctgcgcagacggggccagggtcatgtctttccacggggcgagggtcctctgtagcgtagtctgggtcac
ggltgaaggggtgcgtccgggtgcgcgttggccagggttgcgttggagctgtctgtgtgtctgaagcgctgcgggtcttgcgcttgcgctg
cgcgtcggccaggtagcatttgaccatgtgtgcatagtccagccctccggggcggtggcccttggcgccagcttgcgcttggaggagggc
ggcgccagggggcagtcagacattttaggggcgttagagcttggggcgagaaataccgattccgggggagtaggcataccggcgccgag
ggcccgagacgggtctgcattccagagccagggtgagcttggccgttgggggtcaaaaaccagggttcccccatgtcttttgatcggttcc
ttaccctgtgttccatgagccgggtgtccacgcctgggtgacgaaaaggctgtccgtgtcccggtataccagacttgagaggccgtgtctcgagc
gggtgtccgggtctctctcgtatagaaactcggaccactctgagacaaaggctcgcgtccaggccagccagcaaggagggttaagtgggag
gggttagcggtcgttgcctaggggggtccactcgtccagggttgaagacacatgtccctctcggcatcaagggaagggtgatttgggtt
gtagggttagggccacgtgaccgggtgttccgaagggggggtataaaaaggggggtggggggcggttgcctcactctctccgcatacgtctg
ctcgcaggggccagctgttgggttagtactccctcgtgaaaagcgggcaigacttctgcgttaagattgtcagtttccaaaaacgaggaggga
ttgataattcacctggcccggtgtatgccctttaggggttggccgcatccatctgtgtcagaaaagcaaatcttttgtgtcaagcttgggtggca
accgcccgtagaggggcgttggacagcaacttggcgatggaggcgaggggttgggttgtgtcgcgagtcggcgcgctccttggccgcgattgtt
agctgcacgtattcgcgcgaacgcaccgccttcggggaagacgggtgtgtcgtctcgtcgggcaccagggtgcacgcgccaaccgcgggtt
gtgcagggtgacaaggtaacgcctgtgtgttaccctcgcgttaggcgtctgttgggtccagcagaggcgggccgcttgcgcgagcaga
atggcggttaggggggtctagctgcgtctcgtccgggggggtctgcgtccacggfaagaccccgggcagcagggcgcgctcgaagtgtct
atcttgatccttgcgaagtctagcgccgtgtgtccatgtcggggggcggaagcgcgcgctcgtatgggtttagtgggggaccccatggcatgg
gggtgggtgagcgcgaggcggtacatgccgcaaatgtctgaancttagagggggtctctgagttatccaagatfatgtagggttagcatctcca
ccggggatgtgtggcgccagctaaltcgtatgttctgtcgaggggagcgaggagggtcgggaccgagggttgcctacggcggggtcgtctgc
tcggaagactatctgccgaagatggcaltgtgagttgatatagttggacgtcgggaagacgttgaagctggcgctgtgtgagacctaccg
cgtacgcagcgaaggaggcgtaggagtcgcgcagcttgttgaccagctcggcggtgacctgcacgtctagggcgagtagtccagggtt
ccttgatgatgtcatacttactgttccctttttccacagctcgcgggttagggacaaactcttcgcgggttcttccagtagcttggatcggaaac
ccgtcggcctccgaacggtaagagccctagcatgtagaaatgggtgacggcctgggttagggcgagcatcccttttctacgggttagcggtatg
cctgcgcggccctccggagcgagggttgggttaggcgcaagggttgccttgacatgacttttaggttacttggatattgaagtcagttctgtcg
catcggccctgtctccagagcaaaaagtcggtgcgttcttggaaacgcggatgtggcaggggcgaaagtgcatacgttgaagatfatcttccc
ggcgagggcataaagtgtcgtgtgatcguaaaggttccggccactctguaacgggttgaataacttgaagcggcgaagcacgatactcgtca
aagccgttgatgttggcccaaatgtaaagtccaagaagcgggggtatccctgtatgggaaggcaatttttaagtctcgttaggtgagct
cttcagggggagctgagcccgctcgtgaaggggccagctctcaagatgaggggttgaagccacgaatgagctccacaggtcacggggc

[illegible]

ctgagagctcagcgaaccgcgagctgcatgcacagcctgcgaagggccctcggctcggacacgggcagcggcgatagagagggccgagctcctac
tttgacgcggggcgctgacctcggctggggccccaaagccgacgcgcctctggagggcaugctgugggccggacctgggctggcgggtggcacc
ggcgcgctgggcaacgtcggcgggctggaggaatatgacgaggacgatgaglacgagccagagggacggcgagtaactaagcgggtgatg
ttctgatcagatgagtgcaagacgcaacggaccggcggtggcgggcgcgctgcagagccagccgctcggccttaactccacggacgac
tggcgccaggtcatggacgcgcatctgtctgactcgcgcgaatctgacgcgttcgggcagcagccgcagggccaaaccggctctccgc
aatcttggaaagcggctggtcccgggcgcgcgcaaaacccacgcacgagaaggtgctggcgatctgtaaacgcgcctggccgaaaacagggcc
atccggcccgacgagggccggcctggctctacgacgcgcgtctctcagcgcgtggtctctgtaaacacggcgcaacgtgcagaccaaactggga
ccggctggtgggggatgtgctgcgagggcgtggcgacgcgtgagccgcgcgacgagcagggcgaacctggggctccatggttgcactaaa
cggcttctgagtgacacagcccgccaacgtgtccgggggacagggaggactacaccaacttggtaggcgcacttgcggctaagtgtgactga
gacaccgcaaaagtgggtgtacacagctctgggcccagactatctttccagacccagtagacaaggccctgcagaccgtaaacctgagccagggct
ttcaaaaacttgcagggggctgtguggggggtgggggtcccaagccgagccgcgcgaccgtgtctagcttgcgtgacggccaaactcgcgcctg
ttgctgtctgtaaatagcgccttcacggacaugtggcagcgtgtccgggacacataacctaggctcacttgcgtgacactgtaccgcgagggccat
aggtcagggcgcatgtggagcagcatacttccaggagagattacaaggtgtcagccgcgcgcctggggcaggaggacacggggcagccctggag
gcaaaccttaaaactacctgctgaccaaaccggcgcgacagaagatccctcgttgcacagttaaacagccagggagggagcgcatttggcgctacg
tgacgagagcggtggagccttaacctgatgcgcgacggggtaacgccagcgctggcgctggacatgacggcgcgcaacatggaaaccggg
catgtatgctcaaacggcggttataaccggcctaagtggactacttgcacgcggcgccgcgcgtgaaaccccgagtaattcccaatgccat
cttgaacccgcacttggctaccggcccttgggtttctacacggggggaftcgaggtgcggcgagggttaacgagtgatctctgggacgacata
gaegacagcgtgttttcccgcaaccgcagaccctgctagagttgcaacagcgcgagcagggcagaggcgccgcgtgcgaaaggaaagct
tccgagggccaagcagctgtgctggtatcaggcgctggcgcccgcggtcagatgctagtagccatttcaagcttgatagggtctctface
agcactcgcaccaccggcccgcgctgtggtggcgaggagggaglacctaaacaactcgcgtctgcagccgcagcgcgaaaaaaactcgc
ctccggcatltcccaacaacgggafagagagccctagtggacaagatgagtagatggaaagcgtacgcgcagggagcacaaggacgtggcc
aggcccgcgcccgccaccctgtctcaaaaggcacgaccgtcagcggggctctgtgtggggaggagcagatgactcggcagacgacagcag
cgctctggatttgggaggaggtggcaaccgggttgcgcaccttgcggccaggcgtggggagaaatgtttaaaaaaaagacatgatgcaa
aataaaaaactcaccagggccatggcagcgagcggttgggttctgtatctcccttagtatgcggcgcgcgccgatgtatgaggaaggctctc
ctccctctacgagagtggtgtgagcgcgccgcccagttggcgcgcgcgctgggttctcccttcgatgtcccttggaccggccggttggct
ccggcggtacctgcggctaccggggggagaaacagcctcgttactctgagttggcacccctattcgacaccaccgggtgtgtacctgtgtgg
acaacaagtcaacggatgtggatccctgaactaccagaacgacacagcaacttctgaccacgggtctatcaaaaacatgactacagccc
ggggggaggcnaagcacacagaccatcaatcttgacgagccggctgcacttggggcgcgcgacctgaaaacctcctgcataccaacatggcna
atgtgaacgaugttcatgtttaccataaagttaagggcggggtgatgtgttccgctgtgctactaaggacaatcagggtgagctgaataacg
agtgggtgtgagttcacgctgcccaggggcaactactcggagaccatgacatagacctatgaacaaacgcgctgtggagcactacttga
agtgggcagacagaaacgggggtctgaaagcgacatcgggggtaaggttgacaccggcaacttcagacttgggttgaccccgctactgtgt
ctgtctatgcttgggtatatacaaacgaagccttccatccagacatcatfttgcgtccaggatgtcggggtggacttcccccagccgctgtg
agcaacttgttgggcaiccggaagcggcaaccccttcaggaggggttttaggatccctacgatgatctggagggtgttaacattccggcact
gttggatgtgtgacgcctacaggcgagcttgaagatgacaccgaacaggggcggggggtggcgcgaggcgggcagcaaacagcagttggcag
cgcgcgagggaagagaacccaacgcggcgagccgcggcaatgacggcggtggagggacatgaacuatcatgccaftcggcgcyacacctt
ggcacacggggctgaggagaagcgcgctgagggccgaagcagcgggccgaagctgcgcgccccgctgcgaacccgaggtcgagaagc
ctcagaagaanaacgggtgatcaaaccttcagagaggacagcaagaacgcagttacaaccttaataagcaatgacagcacttaccaggt
accgcagctgtgtacttgcatacaactacggcgacctcagaccgggaatcgcgtcattggacctgtgttgcactctcgaacttaccgtggc
tgggagcaggtctactgtgtgttgcagacatgatgcaagaccgggtgaccttccgctccagcgccagatcagcaacttccgggtgtgtg
ggcgcgagcgtgttcccggtgactccaagagcttctacaacgaccaggcggtctacttccaaactatccggcagtttacctctctgacccac
gtgttaactcgttccggagaaccagatfttggcgcgccggcgcagcccccacatcaccacccgctcagtgaaaacgttctgtctcagagal
cacgggagcgtacgcgtcggcaacagcctcggaggagttcagcgagtgaccatttgcagcgccagagcgccgcaccttgcctctacgttta
caaggcccttgggcagatgtcgcgcgcgtctatcagagccgacttfttgcagcaagcatgtccatcttatactgcacagcaataacacag
gctggggccctgcgttcccaagcaagatgttggcgggggccaagaagcgtctccgaaccaacacccagttgcgctgtgcggggcactaccg
cgcgcccttggggcgcgcaaaacggcgccgacttggcgccaccacgtctgatgacgccatcgacgcggtgtgtggaggaggcgcgca
actacagcccacggccgccacagttgtccacagttggagcgcgccacttcagaccgtgtgtgcgcggagaccggcgctatgctaaaatgaag
agacggcgaggcgcgctagcaogtgcacacgcgcgcgacccggcacttgcggcccaacgcgcggcgggcgggcctgtcttaaccggcg
acgtcgcacccggccacggcgcccgatgcggggccctcgaaggcttggcggggtattgtacttgcgcgcgcggcgccaggtccagcgagc

gcggccgcccagcagccggccgcaatagtgctatgacacaggggctcagggggcaacgctglatggggtgcgggactcgggttagcggccct
 gcggcgccccgctgcgcaccggcccccgcgcaactagatggcaagaaaaactacttagactcgtactgtgtatglatccagcggcgccg
 gcggcgcaacgaagctatgtccaaagcgcaaaatcaagaagagatgtccagggcatcgcggccggagatctatggcccccgaaagaaggga
 agagcagggattacaagccccgaagctaaagcggggtcaaaaagaaaaagaaagatgatgatgaacttgacgacgaggtggaaactgct
 tgcacgctaccggcgccagggcgacgggtacagtggaagggcgacggcgtaaaacgtgtttggcgaccggcgaccacggtagtctttacgc
 cgggtgagcgctccaccggcaactacaagcgcggtatgatgagggttacggcgacgagggaccgtgttagcaggcgcaacgagcgccctc
 ggggaggtttgcttacggaaagcggcataaaggacatgctggcggttgccgctggacgaggggaacccaacacctagcctlaaagcccgtaac
 actgcagcaggtgctgcccgcgcttgccacgctcgaagaaaagcgcgcccaaaugcgcgagctggttgacttggcaccacacggctgcagc
 tgategtaccgaagcgccagcgacttgaagatgtcttggaaaaaatgaccggtggaacctgggctggagcccgagggtccgctgcccga
 atcaagcaggtggcgccgggacttggcgctgcagaccgtggacggttcagatacccaactaccagtagcaccagtagttgccaccggccacaga
 gggcatggagacacaaacgtccccgggtgctcaugcggtggcggaigccgcuylgcaggcggtgcgctgcggcgctcgaagacctct
 accgaggtgcaaacggaccggtggatgtttcgcttcagcccccgcgcccgcgcggttcagggaagtacggcgccggccagcgcgcc
 tactggcggaatatgcttaccatcttccatgttgcgctacccccgggtatcgttggctacacctaaccgccccagaaagacgagcaactaccgga
 cggcgaaaccacactggaaacccggcgccgcgctgcccgtgcccagccccgtgctggccccgattccgctgcgaggggtggctgcggaag
 gaggcaggaccctgggtgctgccaacagcgcgctaccaccccagcagcgttlaaaagccgggtctttgtggcttgcagatatggccctcacc
 lggccctccggttcccggtgcggggtatccgagggaagatgcaccgtaggaggggcaglgccggccacggccgtgacggcgcggtatgc
 gtcgtggcaccacggcgggcgccgctgcgcaccgctgcatgcggcggtatcctgccccctcttattccactgacggcgcggtga
 ttggcgccgtgccccgaatgcatcctgggcttgcagggcgagagacactgattaaaaaagttgcatgtggaaaaatcaaaataaaa
 gtctggactctacgctcgcttggctctgtaactatgttgaagatggagacatacaacttgcgctctggccccggacacggctcgcgccc
 gttcatgggaactggcaagatatcgccaccagcaatatgagcggtggcgccctcagctggggcgctgctgtggagcggtcaataaatttc
 gggtccaccggttaagaactatggcagcaaggccgtggaaacagcagcagggccagatgctgagggtataagttgaagagcaaaatttcaa
 caaaaggtggtagatggcctggcctctggcattagcgggggtgtggacttggcacaacagucagtgcaaaataagattaacagtaagcttg
 atccccggccctcccttagaggagcctccaccggccgtggagacagltgtccagaggggcggtggcgaaaagcgtccgccccggacag
 ggaagaaactctgtgagcgaatagacgagcctccctctgacgaggaggcactaaagcaaggcctgcccaccacccgctccatcgcgcc
 ccatggctaccggagltgctggccagcacacacccgtaacgctggacgtccctcccccggcagacccagcagaacctgtgtcgtcga
 ggccccagcccggtgtgttaaccgcttagccgcgctccctgcgcggcgcccgccagcggtcccgatcgttgcggccccgtagccagt
 ggcaactggcaagcacactgaacagcaltggtggcttgggggtgcaatcccgaaagcgccgacgaltgttctgaatagctaaagtgtgt
 atgtgtgtcatgtatgtgctccatgtgcccggcagaggagctgctgagccggcgccggccccgtttccaagatggctaccccttcgatgtgc
 cgcagtgtgttaccatgcacatctcggccagggacgctcggagtaacctgagccccgggtgtgtgagttgtcccgccgcccagcagagct
 acttcagcctgaataaacaagtttagaaacccacgggtggcgctacgcacgacgtgaccacagaccgggtcccggttggacgtcggtt
 catccctgtggacgtgaggaactgtgctacgtaacggcgcggttaccctagctgtgggtgataaccggtgtgctggacatggcttcca
 cgtacttggacatccggcggtgctggacagggggccctacttlaagccctacttggcacttgcctacaacgccctggctcccaagggtgccc
 ccaaatccttgcgaatgggatgaagctgctactgctctgaaatfaaacctagaagaagaggacgaltgacaacgaagacgaagtagacgag
 caagctgagcagcaaaaaactcagctatttgggcaggcgccctlatcttggtataaatatlaaaggagggtlatcaaatagggtgtcgaaggt
 caaacacctaaatatgccgataaaacattcaacctgaacctcaaataggagaatctcagttgttacgaaactgaaattaatcatgcagctggg
 agagtccttaaaaagactaccccaatgaacacatgtttacgggtcatatgcaaaaccacaatgaaatggaggggcaaggcattctgttaa
 gcaacaaaatggaaagctagaaggtcaagtggaatgcaattttctcaactactgaggcgaccgcaggcaatggtgataacttgaactcta
 aagtggtattgtacagtgaagatgtatagataagaacccagacactcataattcttaccatgcccactatfaaggaaggtaactcagagaact
 aatgggccaacaatctatgcccaacaggcctaattacattgctttagggaacaattttatgtgtctaatgtattacaacagcagcggtataatggg
 tgtctggcgccgcaagcaltgcagttgaatgctgtgttagatttgaagacagaacacagagcttccataaccagcttttgcgttgaattcattg
 gtgatagaaccagggtactttctatgtggaatcaggtgtgtgacagctatgatccagatgttagaattatfgaaaatcatggaactgaagatgaa
 ctccaaattactgctttccacttggagggtgtgtatatacagagactcttaccaggttaaaacctaaacagggtcaggaatggatgggaa
 aaagatgctacagaattttagataaaaatgaataagagttggaaataattttgcatggaaatcaatctaattgccaacctgtggagaattt
 cctgtactccaacatagcgctgtatttggccgacaagctaaagtacagctcttccaaacgtaaaaatttctgataacccaacacctacgactac
 atgaacaagcgagtggtgtgctccgggttagtgagctacataaacttggagcagcgctggctccttgaactataggaacgltcaacc
 atttaaccaccaccgcaatgctggcctgcctaccgctcaatgttctgggcaatggtgctatgttgccttccacatccaggtgctcagaa
 gttcttggcattaaaaacctcttctccttgcggggtcicacatacctacaggtggaaacttcaggaaggatgttaacatggttctcagagctccc
 taggaatgacclagggtgacggagccagcattgaagttgatagcatttgcctttacgcacacttcttccccatggcccaacacagcgtc

[illegible]

catgactactacaccttgcagaggtctacgtacgccaagctgcaagatctccaacgttggagctctgcaaccttggctctctaccttggaaatttgcacgaaaaaccgecttggggcaaaacgtgcttccacacgctcaggggcgaggcgccgcgactacgctcggcgacttgcgttacttattctatgctacaccttggcagacggccatgggcttggcagcagtgcttggagggagtgcaacctcaaggagctgcagaaactgctaagcaaaacttgaaggacctatggacggcccttcaacgagcgctcctgtggccgcgcacctggcggaacatcatttccccgaacgcttgccttaaaaccttggaaacagggctgocagacttaccagttcaaaagcatgtttgcagaactttaggaacttatacctagagcgctcaggaaacttgcgcgcacacttgcgtgcacttctatagcgacttgtgtcccttaaglacccggcaatgccccctccgcgcttgggggcacgttctaccttctgcagcttagccaactaccttggcctaccactctgacataaagggaagacgtgagcggtgacggcttacttggagtgctacgttgcgttgcacacctatgcaaccccgcaacgctccctgttggcaattcgcagctgcttaacgaaagtcaaaatatacggtaactttagcttgcaggggtccctgcgctgacgaaaagtccgggactccgggggttgaanaactcactccggggctgtggagcttgggcttacttccgcgcaaaatttgtacctgaggactaccacggccacagagatttaggttctacgagaaccaatcccgcccgcccaaatgtcggagcttaccggcttgcgtcattaccagggccacatttctggccaattgcaaggccatacaaaaagcccycccaagagtttctgtctacgaaagggacgggggttacttggacccccagctccggcgaggagctcaacccaalccccgcgcgcgcagccctatcagcagcagcgcgcggcccttgccttccaggatggcacccaaaaagaagctgcagctgcgcgcgcacccacggagcagaggaaggaaactcgggacagtcagggcagaggaggttggacgagggagggagggacatgatggaagactgggagagcctagacgaggaagcctccgagggctcgaagagggttcagacgaaacacccgtcaccctcgggtcgcattccccctgcgcggcccgccagaaatcggcaaccgggttccagcatggctacaacctccgtctctcaggcgccgcggcgacttgcgcgttgcggcaaccaacctgagatgggacacacttggaaaccagggcgcggtlaagctcaagcagcccgccgctttagcccaagagcaacaacagcgccaaggctaccgctcattggcggggcacagaacgccaatagttgtctgttgcaggaactgtgggggcaacatctctcttgcgcgcgcttctctctacatcacggcgcttgccttccccgtaacatctgtcatlactacgctatctctacagccatactgcacccggcgagcggcgagcgggcagcgaacacagcagcggccacacagaaggcaaaagcgacgggatagcgaagactctgacaaaagcccaagaaatccacagcgggcgagcagcagcagggaggaggagcgcttgcgtctggcgcccaacgaacccglatgcagcccgcgagcttagaaaacaggatlttccacactgtlatgtatatttcaacagagcagggggccaagaacaagagctgaaaataaaaacagggtctctgcgatccctcaccgcgagctgctgtatcacaanaagcgaagatcagcttgcgcgcacgctgggaagacgcggagggctctctcagtaataactgcgcgctgactcttaaggactagtttgcgcgccccttctcaaatttaagcgcgaanaactacgtcatctccagcgggccacacccggcgccagcactgtctgcagcgccattatgagcgaaggaaatccacggccctacatgttggagttaccagccacaalgggacttgcggctggagctgcccgaagactactcaaccgaaataaactacatgagcgcgggacccacatgataccgggtcaacgggaatccgcgcgccacggaaaaccgaattctcttggaaacagggggctatlaaccacacactcgttaataaccttaalccccgttagttggcgccgttgccttgggttaccaggaaggtccgcgtcccaaccactgttggacttccagagacgcccaggcggaagttcagatgactaaactcagggggcgagcttgcggggcgcttctcacaggggtgcggtgcgcgggcaugggtataactcacttgacaalcagauggcgaggtattcagctcaacgacgagtcgggtgagctctcgttgggtctccgtccggacgggacatttcagatcggcgggcgccggcgcttcttaccgctccgctcagggcaatcctaactctgcagacctcgtctctgcagcgcgctctggagggcaatgggaacttgcgaattattgaggaggttggccatcgggttactttaacccttctcgggacctccggccactatccggatcaattattcctaacttgcgcgggtaaaaggaactcggcgagcggtacgactgaatgtaagtgagagggcagagcaactgcgcctgaaacacctgggtccacigtgcgcggccacaagtgcttggcccgcgactccgggtgagtttgcacttgaattgcgcgaggaatcatactgagggcccgggcgacggcgctcggcttaccggccagggagagcttgcgccttagcctgattcgggagtttaccagcgccccctgctagttgagcggggacaggggacccctgtgttctcactgtgtttgcaactgtcctaaccttggattacatcaagatcttgttgcctctctgtgtgagtataataaatacagaanaataaatactggggctcctatcgccatcctgttaaaccggcacccgttccacccgccaagcaaaccaaggcgaaaccttaccctggactttaacatctctcctctgtgatttaaacagtttcaaccagacggaagtgagctacgagayaacctctccgagctcagctactcctacagaaaaaacaccacccctcctaactcgtccgggaacgtacagagtgctgcacccggcgctgcaccacacctaccgctgaccgttaaaccagacttctccggacagaccctcaalaactctgtttaccagaacaggaggtgagcttagaaaaccttgggttattaggccaaaagcgagctactgttgggggttattgaacaattcaagcaacttaccgggctatttataatcagggttctctagaaatcgggggttgggggttattctctgttctgtgattcttatttctalactaacgcttctctgcctaaaggctcgcgcgctgtgtgtgtgcacatttgcatttattgtcagctttaaaccgttgggtgcgcaccccaagatgatttaggtacataatccttaggttactcacccttgcgtcagccacgggtaccacccaaaagggtggaatttaaggagccagcctgtaatgttaccctgcagctgaagctaatgagtgcaaccactctataaaatgcaccacagaacatgaaaagctgcttattgcgcacaaaaacaanaattggcgaagtatcgtgttattgtatttggcagccaggttgacactacagagataatgtttacagtttccagggttaaaagtcataaaactttatgtalacttctcattttatgaaatgtgcgacattacacatgtacatgagcgaacagataaagttgttgcggcccaaaaattgttggaaaacacttggcacttctgtctgcacttgcctatgctaattacagtgctcgcgttgggtctgtaccctactctatataaatacaaaaagcagacgcagcttatttagggaaagaanaattgccttaatttactaagtlacaaaagctaaatgtcaaccactaacgtcttactcgcgtcttgcacaaaacaattcaaaaagttagcatataatagaataaggatttaaacccccgggtcatttctctgtcctaataccatccctgaacaattgactctatgtgggatatgtccagcgctacaaccttgaagtcaggttccctggatgtcagcatctgacttggccagcactctcccgcggaatttggccagttccaactacagcgaccacccctaacagagatgaccaacacaaccaacgcgcgcgcgcctaccggacttacaatccacaataacaccccaagtttctgcttgcataaactggat

[illegible]

cggcggtgacaaacagatctggcttccgggtctcgcgcttagatcgcctctgtgtagtgtgtaglatatccactctctcaaaagcalfccaggc
 gceccctggcttccgggttctatgtaaactcttctatgcgcgcctgcctgtataacatccaccaccgcagaataagccacaccaccgccaacct
 acacattcgttctgcgagtcacacacggggaggagcgggaaagagctgggaagaacctatgttttttttttattccaaaagattatccaaaactca
 aaatgaagatctattaagtgaacgcgcctccctccaggtggcgtgggtcaaaactctacagccaaagaacagataatggcatttgtaaagtgttgc
 acaatggcttccaaaaggccaaacggccctcacggtccaagtggagctaaagggtfaaacctctcagggtgaattctctctataaacattccagc
 acctcaacctatgcccaataaattctcatctcgccaccttctcaatatalctctaaagcaaatccgaatatattagtcgggccattgtaaaaatctgc
 tccagagcgccctccaccttcagcccaagcgaggaatcatgattgcaaaaattcagggtctctacagacctgtalaagattcaaaagcggaa
 caftaacaaaaataccgggatccgtaggtcccttcgcaggggccagctgaacafaatctgtcaggtctctcacgggaccagcgcgggccacttc
 cccggccagggaacctatgacaaaagaaccacactgattatgacacgcatactcggagctatgctaaccagcgtagcctccgatgtaaagctgtt
 gcatggcgccgcatataaaatgcaagggtctgctcaaaaaatcaggccaaggcctcgcgcgcaaaaaagaaagcacatcgtlgtatgctcat
 gcagataaaggcaggtaagctccgggaaccaccacayaaaaagacaccattttctctcaaacatgtctgcgggtttcttgcataaacacaaaa
 aaaataacaaaaaaacatttaaacattagaagcctgtcttacaacaggaaaaaacaccccttataagcataagacggactacggccatgccgg
 cgtgacccgtataaaaaactcgggtcaccgtgtataaaaagcaccaccgcagctctctcgggtcatgtccggagtcataatgtfaagactcggtaaac
 acatcagggttgattcacatcgggtcagtgctaaaaaggcgaccgaaatagcccggggggaatacacataaccgcaggcgtagagacaacattaca
 gcccctataggagggtatatacaaaaattataggagagaaaaaacacataaacaccttgaaaaaacctctcgtcctatggcctaaatagccacctctcc
 gctccagaacaacatacagcgcttccacagcgccgagccataacagtcagccttaccagtataaaaagaaaaacctatfaaaaaaacaccactc
 gacacggcaccagctcaatcagtcacagtgtaaaaaaggggccaagtgcagagcgagtatataaggactaaaaaatgacgtaacgggttaa
 agtcacaaaaaaacaccagaaaaaccgcacgcgaacctacgccagaaaacgaaggcctaaaaaacccacaaactctcaaatctgcacttc
 cgttttccacgttaacgtcacttccattttaagaaaaactacaattcccaaacacatactagtlactcgcgcectaaaaacctacgtcacccgcgcgt
 tccacgcgcgcgcgcgcacgctcacaaactccacccctcaattalcataattgggttcaatccaaaataagggtatatatttggatgatgt

SEQ ID NO: 4 - ICOVIR15K-TD-gp100-tyr

catcatcaataataataaccattatcttctgattgaagccaatatgafaatgaggggggtggagtttctgacgtggccgccccgcgtgggaacgggggc
gggtgacgtagtagtgtgtggcggaagtgtgatgttgcaagtggtggcggaacacatgtaagcgacggatgtggcaaaagtgtacgttttgtgtgt
gcgccgggtgtacacagggaaagtgcacatttccgcgcgttttgaagcggaatgtgtgtagtaaatgtggcgtaaaccgagtaagatttggccatttcc
gcggggaaaactgaataagagggaagtgaatatctgaataatttctgtgtactcatagcgcgtaataatttcttagggccgcgggggacittgaccgt
ttacgtggagagactcgcgcaggtgttttctcagggtgtttccgcgtacgtcggcgggcctcgtggccttctcgcggcaaaaaggatttggcgcgtta
aaagtgtgttcgagtacgtcggcggtcgtcgtgtgtccttccgcgcgaaaaaggatttggcgcgtaaaaagtgtgttcgaagiacgtcgcaccacaaa
ccccgcccgagcgtcttctgtatgttgcgtcgcacgtgtgtacgggggtcaaaagtgtggcggttttattattatagtcagctgtacgtgtatgtattataccc
gggtgagtttctcaagagggccactcttgaagtgtccagcgtagtaggttttctcctccgagccgctcgcgacacggggactgaaaatgtagacatat
taicigccacgggaggtgttattaccgaagaaatggccgcagctcttcttggaccagctgtatcgaagaggtaacttggctgtataatcttccaccict
agccattttgaaccacctaacccttcacgaactgtatgtatttagacgtgtacggcccccggaagatccaacgagggaggcggtttcgcagatttttc
ccgactctgtaatgtttggcggtgcagggaagggatgtacttactcattttccgcgcggcgcccggttctccggagccgcctcacccttcccgcc
agcccgagcagccggagcagagagccttgggtccggtttctatgccaaacctgtaccggagggtgtatcgatccaccacagtgacgacgagg
atgaagaggggtgaggaggtttgtgttagattatgtggagcaccgccgggcacgggtgtcagggtctgtctattatcacccggagggaatacggggggac
ccagatattatgtgttcgttctgtatagaggacctgtggcgtgtttgtctacagtaagtgaaaattatgggcagtggtgtatagagtggtgggt
ttgggtgtggaatttttttaatttttccagttttgtgtgttaaaagaattttgtattgtgattttttaaagggtctgtgtctgaacctgtagccgtgagccc
gagccagaacccggagccctgaagacctacccggcgtcctaaaatggcgccgtgtctalccgtgagacggccggacatcacctgtgtccagagaa
tgtaatagtagtacggatagctgtgtactccggctccttctaacacacctctcgagatacacccgggtgtgtccgtgtgtccctttaaaccagttg
ccgtgagaggtgggtgggtgtcgcaggctgttggaaatgtatcgaggacttgccttaacgagccctgggcaaccttttgaacttgagctgtaaacgc
cccaggccataaaggtgttaaactctgtattcgtgtgtgttlaacgcctttgttctgtaatgtgtgtatgttaagtttaataaagggtgtgagataatg
tttaacttgcatggcgtgtttaaattggggcggggctttaaagggtatataatgcgccgtgggctaacttgggttaacatctgtacctcatggaggtgtg
ggagtgtttggaagatttttctgtctgtgcgtlaacttgcgtggaacagagctctaacagtlacctcttgggttttggaggtttctgtggggctatccca
ggcaaaagttagtctgcagaatfaaggaggagttacaagtgggaatttgaagagcttttgaatccctgtgtgtgagctgtttgattcttgaatctggg
tcaccaggcgcttttccaaagagaagggtcatcaagactttggattttccacaccggggcgcgctgtcgggctgtctgttctttttgagtttataaa
ggataaaatggagcgaagaaacccatctgagcgggggggtacctgtctggattttcttggccatgcatctgtgtgagagcgggtgtgtgagacacaa
aatcgccctgtactgtgtgttccgtctcggccggcgataataccgacggaggagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
ggcagaggcagagcgcctatggaaccccgagagcgcgcctgtgaccctcgggaatgaatgtgtlacaggtgtgctgaactgtatccagaactga
gacgcatttgcacaattacagaggaatgggcaggggcttaaaaggggttaaaaggaggagcggggggcttctgtaggtctacagagggagcctag

cccgggagtcgctggcgccacgfaalcgtatagttcgtgcgagggagcggaggaggtcgggaccgagggtgclacgggcccggcgtctcgc
 lcggaaagactatcgcctgaagatggcatgtagtggatgatalgggtggacgciggaagacgttgaagcggcgtctgtagacactacg
 cgtcacgacgaaaggagcgttaggagtcggcgagcttctgaccagctcggcggtgacctgcacgtctagggcgagtagtcagggtt
 ccttgatgagtcatactatcctgctccctttttccacagctcggcggtgaggacaaactctcggcggtcttccagtagcttggatcggaac
 ccgtcggcctccgaacggtaagagcctagcatgtagaacgttgtagggcctggtagggcgagcatccctttctacgggtagcggtatg
 cctgcggcgccctccggagcgagggtggtgggtgagcgcaagggtgctcccgacacgtttagggtagctggtatgtaggtcagtgctg
 catccggcctgctccagagcaaaaagtcgtgcgtcttttggaaacggcgatttggcagggcgaaugtgacatcggtgaagaglatcttcc
 ggcgaggcgataaagttgctgtgtagcggaagggtcccgccacctcggaaacgttggtaantacctggcgggcgagcacgactcgtca
 aagcgttgaigtgtggtggccacaatgtaaagttccaaagcgcgggatcccttgatggaaaggcaatttttaagttccctgtaggtgagct
 ctccaggggagctgagcccgctctgaaaggccagctcgaagatgaggggtggaaaggacgaatgagctccacaggtcacgggccc
 attagcatttgcagggtggtcgaaagggtcclaaacggcgacctatggccatttttctgggggtgtagtcagtagaaggtaagcggtctgt
 cccagcggtccatccaaagggtcggcgtagggtctcggcgccagctacagagggtcactcccgccgaactcatgaccagcatgaagg
 gcacgagctgcttccaaaggcccccacaaagtatagggtctctacatcgttaggtgacaaagagacgctcggtcgaggatcgagccga
 tccgggaagaactggatctcccgccaccantggaggagtgctttaggtgaaagtagaagctccctgcagccggcggaacactcgtg
 ctggcttttgaataaacgtgacgagtagctggcagcggtgacggcgctgacatctgcacgaggtttagctgacgacggcgacacaggaa
 gcagagtggaattgagccctcgcctggcggttggctgggtgcttctacttgcagctgcttgcctgaccgtctgctgctcagggg
 agttacgggtggatcggaaccacacggcgcgagcccaaggtccagatgtccggcgcgggcggtcgagctttagtacaacatcgcg
 agatgggagctgtccatggtctggagctccggcggtcaggtcaggcgggagctctgcagggttaacctgcataagcgggtcagggcg
 cgggctagatccaggtgatacctaattccagggcggtggtggcggtgctgaggttgcagaaggcccgatcccccggcgcgact
 acggtaccggcgcgggcgggcggtggcgggcggtgcttggatgtagctctaaaagcggtgacggcgagcccccggaggta
 gggggggctccgacccggcgggagagggggcagggggcagctggcgccggcgcgggcgagggcgagggcgaggggtaggt
 gctggcgaaacggcgacggcggtggtgctgctgaaactggcggtctcgtgaaagacgagggcgggcggtgagctgagctgaaag
 agagttcgacagaalcaatttgggtgctgtgacggcggtggcggtggcgaaactcctgacagctctcgtgaggtgctgtagggcgatctggc
 catgaaactgctgactcttccctcctggagatctccggcggtgctgctccacgggtggcgggcgaggtgctgtaggaatggcggtcatgagct
 ggagaaaggcggtgagggcctccctggtccagacggcggtgtagaccacggcctccggcagctcgggcgagcgatgaccactcggcg
 agattgagctccacgtgcccggcggaagacggcgtagtttgcaggcgctgaaagaggttagtgaagggtggtggcggtgtgttctgcccag
 aagaaglacataaccagcgtcgcaacgtggtatctgatatcccaaggcgctcaaggcgctccatggcctgtagaagttccaggcgga
 agttgaaaaactgggagttgcccggcgacacgggttaactcctcctccagaagacggatgagctcggcgacgtgtcggcgacctcggcgt
 caaaggctacaggggctctctctctcttcaatctcctctccataaggcgctccctctctctctcttggcgggcggtgggggggggggac
 acggcgcgacgacggcgacacggcgagggcggtgacaaagcgctcgatcatctcccgcgcgacggcgacgtggtctcggtgacggc
 ggcgcgctctcggcgggcgaggttggaaagacggcgcccgctcatgtccgggtatgggttggcgggggcggtgcatggcgaggggata
 cggcgctaaccatgcatctcaacaatttgggtgtaggtactcggcgcgagggagctgagcgaggtcggcatgacgggagctggaaaact
 ctcgagaaaggcgcttaaccagtcacagtcgcaaggtaggtgagcaacgggtggcgggcgagcgggcggtcggtgggtgtgttctgg
 cggaggtgctgtgtagtgaatgaatagtagggcggtttagagacggcggtgtagacagaagcaccatgtctgtgggtcggcctgctg
 aatcgcgaggcggttggccatgccccaggcttgggttgcacatggcgaggtctgttagtagtcttgcagtagcctttacgggcacttct
 ctctctctctctgtctgcatctctgcatctatcgtcgggcgggcgggaggttggcgtaggtggcgccctctctccatgctgtgga
 ccccgaaagccctcactcggtgaaagcagggttaggtcgggcgacaacggcgctcggttaatatggcctgctgcacctcggtgagggtagact
 ggaagtcatcatgtccacaaaggcggtggtatgcccgtgtgtaggtgtagtgcagttggccataacgggacaggttaacgggtcgtgga
 cccggctgagagagctgggtgtagcagacggagtaagccctcaggtcaaalacgtatgcttgaagtcggcaccaggtactggtatc
 ccacaaaaagtgcggcgccggctgggttagagggggcagcgttaggttggccggggcgctcggggcgagatcttcaacataaggc
 gatgatalccgtagatgtagctggacalccaggtgatggcgggcggttgggtgagggcgcgcggaaggtcggaagcggttccagatg
 ttgcgcagcggcaaaaagtgctccatgggtgggagcgtctggcggtcaggcgcgcgcaatcggtgacgtctagaccgtgcaaaagga
 gagcctgtaagcgggacactcttccgtggttgggtgataaattcgcaagggtatcatggcggaacgacgggggtcgagcccggtatccggc
 cgtccggcgtagcatgaggggttaccggcggttgcgaaccagggtgtagcagacagacagggggaggtgctcttgggttcttcc
 agggcgggcggtgctgctgtagcttttggccactggcgcgcgagcgtaagcggttagggctggaaagcgaaagcatlaaggtgctc
 gctccctgtagcgggauggtatatttcaauggttagtgcggggaccccggttcaggtctcggaacggcgagctcggtgcaacgggg
 gtttgcctcccgctatgcaagaccccggttgcaaaactctcggaaacagggacagaccccttttgccttccagatgcatccgggtgctg
 cggcagatggcgccctcctcagcagggcgaaagcagagcagcgagacatgcaugggacccctccctcctcctacccgctcag

gagggggcgacatccggcgtgacggcgagcagatgggtgafacgaacccccggcgccggggccggcactacctggacttggagg
 agggcgaggccctggcgccgctagggagcgccctctctgagcggfaccgaagggtgagctgaagcgtgatalacgctgtagggctfacgt
 gccggcgagaaacctgttctggcgaccgcgagggagaggagcccgaggagatgcgggatcgaaagtccacggaggcgagctgc
 ggcatggcctgaatgcgagcgtgtgctgcgcgagggagacgttgaagccgacgcgcgaaccgggattagtcgccgcgcgcacacgt
 ggcgcccgccgaccctggaaccgcatacagcagcagcggfgaaccaggagattaaacttcaaaaaagctttaacaaccacgtgcgtacgtt
 gtggcgccgagggaggtggctataggactgatcctctgtgggactttgtaagcgccgtggagcgaaccgaatagcaagccgctcatg
 ggcgagctgttctatagtgagcagcagcaggagacaacgaggcattcagggaatgcgctgctaatacatagtagagcccgaggccgctg
 gctgctcgatttgaataacatctcagagcagatgtgtgagggagcgcagcttgaagcctggctgacaagggtggccgcatcaactatcca
 tgcctagcctgggcaagtfttaccgcccgcaagatalaaccalaccccttaccgttcccatagacaaggaggtaagatcagggggtctacatgc
 gcatggcgctgaagggtgttaccctgagcgagcagcctggcggttattcgcaacgagcgcatccacaaggccgtgagcgtgagccggcg
 ccgagctcagcgaccgcgagctgctgacacagcctgcaaaaggccctggctggcagggcagccggcagatagagggccgagctctac
 ttgacgcggggcgtgacctgctgtggcccccagccgacgcgccctggagggcagctggggccggacctggcgctggcggtgcaccc
 gcgcgcgctggcaacgtcggcgggcgtggaggaaatagcagggagcagatagtagcagccagaggagcggcgagtagtaagcgggtgag
 ttctgtagcagatgagcaagacgcgaacgggacccggcggtggggcgccgctgagagccagccgtccggccttaactccacggagcag
 tggcgccaggtcatggaccgcacatgtctgacgtgcgcgaatctgagcgcttccggcagcagcccgaggccaaccggctctccgc
 aattctggaagcgtgtgctccggcgcgccgaacccacgcagcaggaagggtgtgctggcagtcgaaacgcgtggccgaaacagggcc
 aiccggcccgacgagggccgctggcttaccgagcgcgtgcttgcagcgcgtggctgctgtaaacagccgcaacgtgcagaccaacctgga
 ccggctgggtgggggatgtgcgcgagggccgtggcgagcgtgagcgcgcgagcagcagggcaacctggggctccatgtgtgactaaa
 cgccttccctgagtagacagcccgccacgtgcccgggggacaggaggactataccaacttltgtagcgccactgcggttaattgttactga
 gacaccgcaaggtgaggtgtaccagcttggggccagactalttttccagaccagtagacaaggcctgcagaccglaaacctgagccaggct
 ttcaaaaacttgcaggggctgtgtgggggtgctgggtctccacaggcgaccgcgcgaccgtgtctagcttgcctgagcccaactcgcgcctg
 ttgctgtgcttaataagcgccttccagggacagtggcagcgtgtccgggacacatacctaggtcacttgcctgactgactgacgcgagggcat
 aggtcagggcgcatgtggagcagcagatacttccaggagattacaagtgtcagcccgccgctggggcagggagggacacgggcagcctggag
 gcaaccttaactacgtgctgacaaaccggcgggcagaagatccctctgtgcacagtttaaacagcgaggaggagcgcatgttgcgctacg
 tgcagcagagcgtgagccitaacctgagtcggcagggggtaacgccagcgtggcgctggacatgaccgcgcgcaacatgggaaccggg
 catgtatgcctcaaacggcggtttatcaaccgcctaatggactacttgcacgcgcggccgcgtgaaccccgaggtatttaccatgtccat
 ctigaaccggcactggctacccgccctgttctacacgggggaltcgaggtgcccaggggtaacgatggattctctgggacgacata
 gacgacagcgtgttctcccgcaaccgcagacccctgtagagttgcaacagcgcgagcagcgagggcgcgctgcgaagggaagct
 tccgagggcgaagcagctgttccgaltagggcgtgcggcccgcggtcagatgclagtageccatttccaaagcttgatagggtctctacc
 agcactcgcaccacccggccgctgctggcgaggaggagttacctaacaactcgcgtgctgcagccgcagcgcgaaaaaaacgtgc
 ctccggcatttcccaaacggggaatagagagcctagtggaagaagatgagtagatgggaagacytacgcgcaggagcagaggagcgtgcc
 agggccgcggccggccaccgctcgtcaaaaggcagaccgtcagcggggctgtgtgtgggaggagatgactcggcagcagcagcag
 cgtcttgatgtgggagggagtggaacccgttgcgcaccttgcgccagcgtggggagaaatgttttaaaaaaaagcatgtatgcaa
 aataaaaaactcaccagggccatggcaccgagcgttgggttctgttaltcccttagtagtgccgcgcggcgatgtatagggaagggtctc
 ctccctctacgagagtggtgagcggcgcaagtggcggcgctgggttctcccttgcagctccctggaccgcgcgttgggtgctt
 ccgggttactcgggctaccgggggggagaacagcactcgttactctgagttggcaccctattcgacaccaccggtgtgactcgtggtg
 acaacaagtcaacggatgtggatccctgaactaccagaacgacacagcaactttctgaccacgggicattcaaaacaaactactagccc
 gggggagggcaagcacacagaccatcaatctgacgaccgttgcacttggggcgggcagctgaaaaccatctgcataccaacatgccaa
 atgtgaacgaggtcatgtttaccaataagtttaaggcgcggtgatgtgtgcgcgttgcctactaaggacaatcaggtggagctgaaatacg
 agtgggtggagttcacgctgcccaggggcaactactcggagaccatgaccatagaccctatgaacaacgcgatcgtggagcactacttgaa
 agtgggcagacagaacgggggttctggaaagcgacatcggggtaaggttgaacccgcacttcagactgggttgaacccgtcacttgg
 ctgtcatgcttgggtatatacaaacgaagccttccatccagacatcatttgcctgaggtgcgggtggaacttaccacagccgctg
 agcaactgttggatccgcaaggcggaacccctcaggagggccttaggaacacclacgatgafctgagggtgtgtaacattccgcact
 gttggaatgtgagccctaccaggcgagctgaaagatgacaccgaacagggcggggggtggcgagggcgagcaacagcagttggcag
 cggcgcggaagagaatcacaacggcgagccggcgcaatgacgcgggtggaggacatgaacgatcatgcatctgcggcgacacattt
 gccacacgggctgaggagaagcgcgctgaggccgaagcagcggcggaagctgcgcgcccgctgcgcaacccgaggtcgagaagc
 ctcaagaagaaacgggtgatcaacccctgacagaggacagcaagaaacgcagtacaacctaaagcaatgacagcacttcaaccag
 accgcagctggtaccttgcatacaactacggcgacccctcagaccggaatccgctcatggacctgttgcactcctgacgttaacctgcgcg

ttggagcaggtctactcgtgctgctcagacatgaatgcagaccgcccgtagcttccgcctccacgcccagatcagcaacttccgggtggtggtg
gcgccgagctgtgtgccggtgacaccaagagcttctacacgaccagggcgctcactccaaatcctccgccagttlaactctctgaccac
gtgttcaatcgcttccggagaaccagatttggcgccgcccagccccaccatcaccaccgctcagtgaaaaacggttctgctctacagat
cacgggacgctacccgctgcgcaacagcatcgaggaggtccagcgagtgaccactactgacgcacagacgcccagcttgcctacggtta
caaggccctgggcalagctctcgccgcgctcctatcgagccgcactttttaggcaagcatgtccatccttatactgccagcaataaacag
gctggggcgctgccttccaaagcaagatgttggcgggggccaagaagcgctccgacctaacaccagtgccgctgcccgggcactaccc
cgcgcccttggggcgcgcaaaacgcggcgccactggggcgccaccacgctcagtgacgccatcgcacgcgggtggtgagggagggcgca
actaacgccccacgcggccaccagtgctcacagtggacgcggccatcagaccctgtggtgcggcgagccccggcgctatgctaaaaatgaag
agacggcgaggggcgctagcacgtgcgcacccgcccgcacccggcacttgcgcgccaaacgcggcgggcgccggtcgttaacccgcg
acgtcgcacccggccgacggggcgcccatgcggggcgctcgaaagcttgcccgccggttatgttcactgtgccccccaggtccagggcagga
cgggcgccgcgacgagccggcgccattagtctatgacacagggctcgagggggcaacgtgtatgtggcgcgactcgggttagcgccgt
gcgcgtgccccgtgcgcacccgcggccccgcgcaactagattgcaagaaaaactactttagactcgtactgtgtatgtatccagcgccggcg
gcgcgcaacggaagctatgtccaaegcgcaaatcaagaagagatgtctccaggtcaltgcgcgcggagatctatggcccccgaaagaaggaa
agagcaggatfacaaagccccgaagctaaagcggggtcaaaaagaaaaagaaagatgatgatgaacttgcagcagaggttggaaactgc
tgcacgctaccgcggccagggcgacgggtacagtggaaggtgcagcgctaaaaacgtgttttgcgacccggcaccaccgtagctttacgc
ccggtagcgctccaccgcgcaactaacggcgcggtatgatgaggtgtlaccggcgacgaggaaccgtcttgcagcggccaacgagcgctc
ggggaggttgcctacggaaagcggcataaggacatgctggcggttgcgcctggacgagggcaacccaacaccttagcttaaaagccgtaac
actgcagcaggtgtctgcccgcgcttgcacgcgtcgaaagaaaaagcgcgccctaaagcgcgagctgtgtgacttggcaccaccgtgcagc
tgtgtgtatcccaagcgccagcgactgggaagatgtcttggaaaaaatgacctgtgaacctgtgggttggagcccgagggtccgcgttgcggcca
alcaagcaggttggcgccggggcgactggcggtgcagaccgtlggacgttcagatgccactaccagtagccacagtgatgtgccaccgccacaga
gggcatggagacacaaacgtccccggttgcctcagcggttggcggtatggcgcggttgcagggcggtcgtgcggccgctccaagacctct
acggaggtgcgaacggacccgttgatgtttcgcgttcagccccccggcgccccgcgcgggttcgagggaagtacggcgcccgccagcgcc
tactgcgggaatatgccctacatccttcattgcgctacccccgggctatcgttgcctacacctaccgccccagaagacgagcaactacccga
cgccgaaccacacactggaaacccgcggcgccgtcgcgtlccagccccgtgtctggccccgatttccgtgcgacgggttggctcgcgaaag
gaggcaggacccttgggtgtgcgaacagcgcgctaccaccccagcatcgttaaaaagccgggtcttttgggttcttgcagataatggccctcacc
tgcgcctcccggttcccggttgcgggattccgaggagaagatgcaccgtaggagggggcatggccggccacggcctgacggggcgccatgc
gtcgttgcgcacacaccggcgggcgggcgcgctgcaccgttcgatgcggcgcggtatcttgcgccctcttattccactgattgcgcggcgga
ttggcgccgttgcgggaattgcacccgttggccttgcaggcgccagagacactgaataaaaacaagtgtcatgtggaaaaatcaaatataaaa
gtctggactctcacgctcgcttggctgttaactattttagaagtggaaagacatcaacttgcgtctcttgcgccccgcgacagggctcgcgcc
gttcatgggaaaatcggcaagataltccgcacragcaalatgaucggttggcgcttcacgctgggctcgttggagcgccatlaaaaatttc
ggttccaccgttaagaactatggcagcaaggcctggaaacagcagcacaggccagatgtctgagggataagttagaaagacaaaatttcaa
caaaaaggtgtgatgtggccttggcctctggcattagcgggggtgtggacctggcccaaccagggcagtgcaaaaataagattaacagtaagcttg
atcccgccctcccgtagaggagcctccaccggcggttggagacagtgcttcagagggggcggttgggaaaaagcgctccggccccgcagc
ggaaagaaactcgtgtgacgcaaatagacagcctccctgtatcagggagggaactlaaagcaaggccctggccaccaccggctccatcgcg
ccatggctaccggagtgctgtggccagcacacaccgtaacgctggacgttgcctcccccgccgacaccagcagaaaacctgtgctgcca
ggcccgacccgctgtgttgaaccgcgtcctagccgcgcgtccctgcgcgcgcgcgcagcggtccgcgactcgttgcggcccgtagccagt
ggcaacttggcaaaagcacactgaacagcatcgttgggtcgggggtgcaatccctgaagcgccgacgactctctgaatagctaacgttctgt
atgtgtgtcaltgtatgcgtccatgtgcggccagaggagctgctgagccgcgcgcgcgcgttcccaagatggctaccccttcgatgtatgc
cgcagtgcttcatatgcacatctcggccaggacgctcggagtagcttgcacccgggctgtgtgagtttgcggccgccaccgagacgt
acttcagcctgaalaacaagttagaaaacccacggttggcgctacgcgacgacgctgaccacagaccggctccagcggttagcgctgcgtt
catccctgttgaaccgtlaggatfactgcgtactcgtlaaaggcgcggttacccttagctgtgggtgataaccgtgtgtgtggacatggcttcca
cgtactttagatccgcggcggtgctgtggacaggggccctactttaaagccctactctggcacgtgcctacaacgcccttgggtcccaagggtgccc
ccaaatccttgcgaatgggatgaagctgctactgtcttgaatfaaacctagaagaagaggacgatgacaacgaaagacgaagtagacgag
caagctgagcagcaaaaaactcacgtatttgggcaggcgccctatcttggatanaatatcaaaaggagggtatcaaataggtgtcgaaggt
caaacacctaataatggcgataaaacattcaacctgaacctcaaataggagaatctcagtggttacgaactgaatlaaatcaltgcagctggg
agagtcctfaaaaagactaccccaatgaaaacacgttacggttcatatgcaaaacccacaatgaaaaatggaggggcaaggcattctgtfaaa
gcaacaaaatgtgaagctagaagaatgaatggaaatgaatgttcaacttgaagcggttctcgtactcctggagccttggccagtgactg
ccgctgttccggaagcagatacatuacggaacaaatgtcccaagtttgccttcttgcctccataaagtgtatgtacagtaaaatgtat

gafatagaaccagacacacatatttctacatgccaciatlaaggaaggtaactacgagaactaatgggccaacaatctatgcccaac
 aggectaattacatgcttttagggacaattttatggctaaatgattacacagcagcggttaataatgggtglttggcgggccaagcagca
 gttgaatgctgtgtgagatttgcagacagaaacacagagcttccataccagcttttgccttgatccattgggtgatagaaccaggtactttctatgt
 ggaatcaggctgttgcagcgtatgacagatgttagaattatgaaatcattggaactgaagatgaacttccaaattactgcttccactggga
 ggtgtgattatagagagactctaccaggtaaaaacctaanaacaggtcaggaataatggatgggaaaaagatgctacagaatttccagataa
 aatgaaataagagttggaaaataatttggcatggaaaalcaatcctaaatgccaacclgtgggaaaatttccctgactccaacatagcgctgtat
 gcccagacaagctaaaglacagctccaccgtaaaaatttctgataacccaacacactacgaciacatgaacaagcyagttgggtgctcccg
 gggtgagtgactgctacattaacctggagcagcgtggctgcttgaataatgggacaacgtaacccatttaaccaccaccgcaatgctggcct
 ggcctacccgctcaatgttgcctgggcaatggctgctatgtgcccctccacatccaggtgctcagaagttcttgcattaaaaacctctctct
 gccgggctcctacacactacgagttggaaactcaggaaggatgttaacatggttctgcagagctccctaggaaatgacctaaagggtgacgga
 gccagcaltaaattttagatgctttgcttaccgacacttctcccaaggccacacaccgctccacgcttgaggccatgtctagaacag
 acaccaacgaccagctcttaacgactatctctccgcccacacatgctctacccataccgccaacgctacacacgctgcccaltccatcc
 cctcccgcaactggggcgcttccgctggctggctcctcagcgccttaagactaaggaaacccatcactgggctcgggctacgacctta
 ttacacactactgctgctctataccctacatagatggaaacttttaccctcaacacacactttaaagaggctgcttacccttgccttctgctgact
 ggcttggcaatgaccgctgcttacccecaacgagttgaaaatgaagcgtcagttgacggggagggttacaacgttggccagtgaacatg
 accaaagactggttctggttacaatgctagctaaactataacatggctaccagggcttctatctccagagagctacaaggacgcgcatgtac
 tcttctttagaaacttccagcccatgagccgctcaggtgggtgagatgatactaaatacaaggactaccaacagggtgggctccctacacacac
 acaactctggtattgttggctaccttggccccacatgcgcgaaggacaggccctacccctgctaaacttccctatccgcttattaggcaagacc
 gcagttgacagcattaccagaaaaagtttcttgcgctcgcaccccttggcgatcccttctcagtaacttattgtccatggggcgactcac
 agactggggccaaaaccttctacgccaactccgcccactccctagacatgactttgaggtggatccatggagacagcccaccccttctat
 gtttcttgaagtctttgacaaggctcgtgtgacacagccgacccgctcagcgaacccgtgactcgtcagcccttctcggccggc
 aacgcccacaacataaagaagcaagcaacalcaaacacagctgcccgcctatgggctccagtgagcaggaactgaaagccattgtcaagat
 ctgtgtgtggggcatttttgggcaactatgacaagcgttccaggttcttctccacacagctcggctgcgcatagatcaatacggcc
 ggtcgcgagactggggcgctacactggatggccttggcctggaaacccgactcaaaaacatgctacctttagcccttggcttctgac
 cagcgactcaagcaggttaccagttgagtagcaggtcactctgcgcgctagcgccttgccttcttcccccagccgctgataacgctggaa
 aagtcaccccaagcgtacaggggccaactcggccgctgtgactatctctgctcagtttctccacgcttggccaactggccccaaact
 cccatggatcacaaccccacatgaaccttattaccggggtaccacaiccatgctcaacagctccaggtacagcccacccctgctgca
 accaggaacagctctacagcttctggagcgccactcgccttctccgagccacagtgctgcagattaggagcgccacttcttctgact
 tgaanaacatgtaaaaataatgtactagagacacttcaataaaggcaaatgttttattgtactctcgggtgattatttccccacccctg
 cgtctgcggcggttaaaaalcaaaagggttctgcccgcgcatcgtatggccactggcagggacacgttgcgacatgggtttagtgcctca
 cttaaacctcaggcacaacaccccgccgagcctcgggtgaagtcttactccacaggtcgcgacccatcccaacgcgtttagcaggtcgggc
 gccgatatcttgaaagtcagtttggggcctccgcccctgcgcgcgaggttgcgatacaggggtgagcactgggaacactatcagcgcc
 ggggtgctcagcgtggccagcagcttcttgcggagatcagatccgctcaggtcctcgcgctgctcagggcggaacggagtaacttgc
 gtagctgcttccaaaaaggcgctgcccaggctttaggttgcactcgcacccgtagtggcattcaaaaggtgaccgtgcccgggtctgggc
 gttaggaalacagccctgcataaaagccttgatctgttaaaagccactgaagccttgcgcttgcagagaagaacatgccgaagacttgc
 cggaaaactgattggccggacagcccgctcgtgcacgcagcacttgcgtcgggttggagatctgcaaccacatttggccccacccggt
 ctacagatcttggccttgcctagactgctcctcagcgcgctgcccgttctgctcgtcacatccattcaatcaggtcctcttattatcataa
 tgcctcgtgtagacacttaagctcgccttgcattcagcgagcgggtgcagccacacacgcgcagcccggtgggctcgtgaltgctttaggtc
 acctctgcaaacgactgcaggtacgctgcaggaatgcgcccatatcgtcacaaggtcttctgctgggtgaaggtcagctgcaaccgc
 gggtcctcctgctcagccaggtcttgcatacggccgcagagcttccacttggtaggtaggttgaagttcgcctttagatcgttaccag
 tggacttgcctcagcgcgcgcgcagccctcctgccccttccacgcagacacgafggcacactcagcgggttcacacccgtatattca
 ctctccgcttgcctgggctcttctctcttcttgcgtcgcgatalaccagcgccactgggtgctcttcttctcagccgcgcactgctgcttact
 ccttgcctatgcttattagcaccgggtgggtgtgtgaaacccacacattttagcgccacatcttcttctctcgtgctccacgattactctg
 gtagtgccggcgctcgggttgggagaaggcgcttcttcttcttggggcgaatggccaatccgcgcgcgaggtcgtatggccggcg
 gctgggtgtgtcgggcacacagcgcttctgtgagtgagcttctctgctcggactgatacgcgcctcattccgcttcttggggcgcccg
 gggaggcgccggcgacggggacggggacgacgctcctcatggttgggggacgctcgcgcgcacccgcgtccgcgctcgggggtgg
 ttgcgctgctctcttccgacttggccatttcttctctalaggcagaaaaagatcaggtcagctcgaagaaggacagcctaaccg
 cccctctgagttgcacaccaccgctcaccagatgccccaacgcgccttaccacacttcccgctcagggcaccgccgctttagggaggag

gaagtgatitacgagcaygaccaygtttgtgaagcyaaagacgagggaccyctcagtaaccaacagaggatataaaagcaagaccagga
 caacgcagaggcacaacgaggaacaaagtcggggcggggggacgaaaggaatggcgactacctaagatgtgggagacgacgtgtgttgaa
 gcatctgcagcggcagtgccgcaatitctgcgaacgggttgcagagggcagcgatgtgcccctcggccatagcggatgtcagccctgacctac
 gaagccacattatctaccggcgtaaccgccaaacgcgaagaaaacgggcacatgcgagggccaaaccggcgccctcaacttctacccgta
 tttgcccgtgcccagaggtgtgtgccaacctatcacatcttttccaaaactgcgaagataccccctatccctgcccgtgccaaccggcagccgagcgga
 aagcagctggccttgcggcagggcgctgtcataccgatatcgccctgcgcacacgaagtgccaaaaatctttgagggcttggacgcgacg
 agaagcgcgcggcaaacgctctgcaacagggaaaacagcgaaaatgaaagtcacttggagtggttgggaactcgaggggtgacaacgc
 ggcctlagccgtactaaaacgcagcaicgaggtcaccacattgacctacccggcacttaacctaccccccaaggtaicagacagtcagt
 agtgagctgacgtgogccgtgcccagccctggagagggatgcaaaatggcaagaacaaacagagggagggccctacccgagtggtggca
 cgagcagctagcgcgtgcttcaaacgcgcgagccctgcccacttggagggagcgacgcaaaactaatgatggccgagtgctgtgtaccgt
 ggagcttgagtgcatgagcgggtcttctgtgacccggagatgcagcgcaagctagaggaaacattgcaactacaccttgcagagggctac
 gtacccagggcctgcaagatctccaacgtggagctctgcaacctgtgtctctaccttggaaatgtgacgaaaaccgcttgggcacaaactg
 gcttaccacgcctcaagggcgagggcgcccgcgactacgtccgcgactgctgttacttattctatgctacacctggcgagacggccatgg
 gcggttggcagcagtgcttggagggatgcaacctcaaggagctgcagaaactgctaaagcaaaactgaaaggacctatggagggccttcaa
 cgagcgtccgttggcggcgccacctggcgacatcatcttcccgaaacgctgtttaaacccttgcacaggggtctgcccagacttaccagt
 caaagcatgttgcagaactttaggaacttlatectagagcgctcaggaatcttgcgccaccctgctgtgcaacttccatgctgacttggccat
 taagtaccgcgaatgcccctgcggcgttggggccactgtactcttctgcagctagccaaactaccttgcctaccactctgacataatggaaaga
 cgtgagcgggtgacgggtctactgtgagtgactgtcgtgcaacctatgcaccccgacccgtccctggttgcattctgcagctgtttaaagga
 aagtcacaaatfatcggtactttagctgcaggggtccctgcctgacgaaaagtccggcctcgggggttgaactcacttccgggctgttggaa
 cgctggcttacttgcgaatgttacttggaggaactacacgccacagagattaggttctacgaagaccaatccccccgcaaaatgcggag
 cttaaccgctgcttacttaccaggggccacattcttggcaattgcaagccatcaacaagcccgccaagagtcttctgctacgaaggggacg
 ggggggttacttggaccgccagtcggcgagggagctcaacccaatcccccgctggcgagccctatcagcagcagccgcggggcccttgg
 ctcccgaggtatggcacccaaaaagaagctgcagctgcggcgccacccacggagcagggaggaacttgggacagtcaggcagagggag
 gtttggagcagggagggagggagacatgatggaagactgggagagccctagacgaggaagcttccgaggtcgaagaggtgtcagacgaaa
 caccgtcaccctcggctcatttccctgcggcgcccgcaaaaatcggaacccgttccagcaitggctacacctcgcctccacagggcgc
 cgccggcacttgcggcttgcggaccacaaccgtagatgggacaccacttggaaaccagggccggtaagtccaagcagccgcggcggttgc
 ccaagagcaacaacagcgccaaaggctaccgctcatggcggggcacaaagacgcacatagtgtgtgttgcgaagactgtgggggcaaca
 tctcttgcggcgccgttcttcttctacacacagggcggtggccttccccgtaacatctgtcattactaccgtcatctctacagccatactgc
 cggcgcgagcggcgagcggcgagcaacagcagcggccacacagaaagcaagggcgaccggatagcaagactctgacaaagcccaaga
 aatccacagcggcgagcagcagcagggagggagggagcgtctgctgtggcgcccaacuaaccgtaicgaccgcgagcttgaacacagga
 ttttccactctgtatgtatatttcaacagagcagggggccaaagaacagagctgaaaataaaaaacaggtctcttgcgatccctcaccggca
 gctgctgtatcacaanaagcgaagatcagcttccggcgacgcctggaagacggcgagggctcttctcagtaataactgcggctgactttaa
 gactagtgtgcggcccttctcaaatftaagcggaaaaactacgtcatctcagcggccacacccggcgccagcaactgtgtcagcgccat
 alagcaaggaatfcccacgccttcatgttggagtlaccagccacaatggggacttgcggctggagctgcccagactactcaacccga
 ataaactacatgagcggcgagccacatgataccgggicacgggaatccggcgccacccgaaaccgaaltcttggaaacagggcggct
 attaccacacacctcgtataataaccttaatccccgtagtggcccgctgcccgtgtgtacaggaagtcggctcccacactgtgtgacttc
 ccagagacggccagggcgaaggtcagatgactaaactcagggggcgacgttgcggcgggcttctgtcagaggggtgcggctgcgggggca
 ggggtataactcacttgaacatcagagggcgaggtattcagctcaacgacaggtcgggtgagctcctcgttgggtctcgtcgggacgggaca
 tttcagatggcgggcgccggcgcttcttactcagccctcgtcaggaatcctaacttgcagaactcgtctctgtgagccgcgtctggagg
 catlggaaactctgcaatttattgaggagtttggccatcgggtctactttaaacccttctcgggacctccccggccactatccggatcaatttactct
 aactttgacggcggtaaaggactcggcgagcgctacgactgaatgttaagtgagagggcagagcaactgcgcclgaaacaccttggctcac
 tgtcggcgccacaagtgcttggcccgacgtccgtgaggttctacttgaattggccgaggatcatacgaaggcccgcgacggcggt
 cgggttaccggccagggagaggttgcggtagcctgtatggggaggttaccacagcgcccgctgtagtggagcgggacaggggacgtg
 tgttctcactgtgttggcaactgttccaaacttggattacatcaagatcttgggttccatctctgtgtgtgtatataaataacagaatftaaat
 actggggctcctatcgcacatctgttaaagccacggcttccacggcgccaaagcaaaacgaagggcaacttaccgtgtttaaactctctcc
 ctctgtgattacaacagtttcaaccagacggagtgagctacgagagaacctctccgagctcagctactcatcagaaaaaacaccacct
 ccttacttgcggggaacgtacgagtgctacccggcgctgcaccacactaccccggtacccgtaaacagacttctcgggacagacctc
 aataactctgttaccagaacagggaggtgagcttagaaaacccctagggtataggccaaaggcgagctactgtgggggtttagaacaatc

[illegible]

[illegible]

[illegible]

gggaagtcacccatgctccacaaagcgggtggtatgcgcctggtgtaggtgtaagtcagttggccataacggaccagitaacgggtctggga
 cccggctgagagagcctgggtgacccagagcgcagtaagccctcagagcaaatagctggtgcaagtcgcaccaggtactggatc
 ccaccaaaaagtcggcgagcggctggcggtagagggggccagcgtaggggtggcggggctcggggggcagatcttccaacataaggc
 gatgataleccgtagatgacccgacatccaggtgatccggcgggcgggtgggtggggcgcgcggaaagtcggcgacgcgggtccagatg
 ttggcgagcggcaaaaagtcctccatgggtgggacgctctggcgggtcagggcgcgccgaatcgtgacgtctagaccgtgcaaaaagg
 gagcctgttaagcgggacacccctgggtggtggtgataaaitcgaaggggtatcatggcgagacgggggttcgagcccgatccggc
 cgtccggcgtgatccatgagggtaccggccgctgtgcgaaccagggtgtgcgacgtcagacaacgggggagtgctcctttgggtccttc
 agggcgggcggtgctgctgctagctttttggccactggccggcgagcgttaagcgggttaggtggaaagcgaaagcattaagtggtc
 gctcctgttagcggaggggtttttccaaggttgatgcgggaaccccggttcgagtcctggaccggcggtactgcggcgaaacgggg
 gtttgcctcccgctatgcaagaccggcttgcgaatctccggaaacaggggacagggccctttttgtcttcccaagatgcatccgggtg
 cggcagatgcggcccccctcctagcagcggcaagagcaagagcagcggcgagacatgcagggcaccctccctcctcctaccggtcag
 gggggcgacatccgggtgacgcggcagcagatgggtgattcgaacccccggcgggcgggggccggcactacctggacttggagg
 agggcgagggcgctggcgggcctaggagcgcctctcctgagcgggtaccgaaggggtcagcgtgaagcgtgataccggtgaggcgtacgt
 gccggcgagaaacgttctgcgaccgcggggagaggagcccgaggagatgcggggtcgaaggtccacgcaggcgcgagctgc
 ggcatggcctgaatccgagcgggttgcctggcgaggaggacgttgcggcgacgcggcgaaacggggttagtcccgcgcgacacgt
 ggccggccggcaccgtgtaaccgcatacagcagcagcgggtgaaccagggagattacgttcaaaaaagcgttcaaacaccaggtgcgtacgtt
 gtggcgcgagaggaggtggtatagagctgatgcctgtgggacgttgaagcgcgctggagcgaaccccaatagcaagcgcgtcatg
 ggcagcgtgtccttatagtgtagcagcagcagggacaacgagggcattcagggatgcgctgctaaacatagtagagcccgaggcgcgctg
 gctgctcgtatgataaacatcctgcagagcagatgtgtgtagggagcgcagcgttgagcctggctgacaagggtggccgcatcaactatcca
 tgcctagccctgggcaaglttaccggcgcaagatataccatcccttaccgttccatagacaaggagggtaaagatcaggggggttctacatgc
 gcatggcgctgaaggtgcttacctgagcagcagcctggggcgttaccgaacgagcgcacccacaaaggccgtgagcgttggccggcg
 cgcgagctcagcagccgcgagctgatgcacagcctgcaaaaggccctggctggcagcggcgagcggcgatagagagggcgagictac
 ttgacgcgggcgttgaacctgcgtgggccccagcgcagcgcggcctggaggcagctggggccggacctggcgtggcggtggcacc
 ggcgcgctggcgaacgtggcgggcgtggagggaatagcagggagcgtgagtagcagggcagagggaaggcgagtagtaagcgtggtg
 ttctgatcagatgatgaagagcgaacggaccggcggtggcgggcgggcgctgagagccagccgctcggcgcttaactccacggagac
 tggcgccaggtcatggaccgcatcgtgctgagcgtgcgcaatctgacgcgttccggcagcagcccgaggccaacggcgctcgc
 aattctggaagcgggtcccgggcgcgcaaacccacgcacgagaagggtgctggcgtatcgtaaacgcgctggcggaacagggcc
 atccggccgagcggggcgccgtggtctacgagcgcgtgcttccagcggtggtgctgttacaacagcggcaacgtgcagaccaacctgga
 cggctgggtggggatgtggcgaggccgtggcgagcgtgagcggcgagcagcagggcaacctgggctccatggttgcactaaa
 cggcttctgtagtacacagcccgcaacgtgcccgggggacaggaggactacaccaactttgtgagcgcactgcggctaatgtgtagtga
 gacaccgcaaaagtgggtgtaccagcttggggccagactattttccagaccagtagacaaggccctgcagaccgtaaacctgagccaggct
 tcaaaaacttgcaggggctgtgggggggtggggctccacaggcgaccggcgaccgtgtctagcttgcgtgacggccaactgcgcctg
 ttgctgctgtaaatagcgccctcacggacagtggcagcgtgtccggggacacatacctaggtcacttgcgtgacactgacgcgaggccat
 aggtcaggcgcatgtggagcagcacttccaggagattacaaggtgcagccggcgctggggcaggaggacacggggcagcctggag
 gcaaccttaaaactaccgtgacaaacggcgggcagaagatccctcgtgcacagtttaaacagcagggaggagcgcatgttgcgtacg
 tgcagcagagcgtgagccttaacctgatgcgcgaagggtaacggccagcgtggcgtgacatgaccggcgcaacatggaacgggg
 catgtatgcctcaaacggcggtttatcaacggcctaatggactacttgatcgcgcggcgccgtgaacccccagatgttccaatgccat
 ctgaaacccgactggctaccggcccttgggttctacacggggggattcgaggtgcggagggttaacgatggattcctctgggacgacata
 gacgacagcgtgttttcccgcaaccgcagaccctgtagatgtgcaacagcgcgagcagggcagggcgctgcaaaaggaaagct
 lccgagggccaagcagctgtgctgagctggcggcccgcggtcagatgctagtagccatitccaaagcttgatagggtctcttacc
 agcactgcacaccggcgccggcctgctggcgaggaggagtagcctaacaactcgtgctgcagccgcagcgcaaaaaaacctgc
 ctccggcatttcccaacaacgggatagagagcctagtggacaagatgagtagatggaagacgtacgcgcaggagcagagggacgtgcc
 agggccggcgcccgccaccggctgtaaaaggcagcagcgtcagcggggctgtgtgtgggaggacgtgactggcgagcagcagcag
 cgttctgtgatttgggaggaggtggcaacccgtttgcgcaccttgcggccaggcgtggggagaaatgtttaaaaaaaagcagatgcaaa
 aataaaaaactcaacaaggccatggcagcagcgtgtgttctgttattccctttagatgcggcgcgcgcgcgatgtaggaaaggtctc
 ctccctctacagaggtgtgtgagcggcgccaggtggcgggcgctgggttctcccttgcgtgctccctggaccggcggttgtgtcc
 cggcggttactcgggctaccgggggggaagaacagcatccgtactgtgagttggcaccctatttcgacaccaccgtgtgtactggtgg
 acaacaagtaacggatgtggcatccctgaactaccagaacgaccacagcaacttctgaccacgggcatcaaaacatgactacagccc

[illegible]

atggtgtgcatgtaicgclccatgtgcccagagaggagctgctgagccgcccgcgcgcgcgtttccaaagatggctaccccctcgaigatgc
cgcagtggtccttacatgcacatctcgggcccaggagcgcctcggaglacctgagccccgggctgggicaggttgcgcgcgcaccaggagacgt
actcagcctgaataacaagtttagaaaccccacgggtgcccactacgcacgacgtgacacagaccgggtccagcgtttgacgctgcggt
catccctgtggaccgtgaggatactgctactcgtacaaggccgggttaccctagctgtggtgataaccgtgtgctggacatggcttcca
cgtactttagatccggcgtgtgctggacaggggcccacttitaagccctactcgtggcactgcttacaacgcctgggtcccaagggtgcc
ccaaalccttgcgaalgggaigaaagctgctactgccttgaataaaccctagaagaagaggacgatgacaacgaagacgaagtagacgag
caagctgagcagcaaaaaactcagctatttgggcaggcgccttaltctggatataaatattacaagggaggggtattcaaataggtgcgaaggt
caaacacctaaatatgcccataaaacattcaacctgaacctcaaataggagaatctcagtggttacgaaactgaataatcatgcagctggg
agagtccttaaaaaagactaccccataaaccatgttacgggtcataitgcaaaaccccaaatgaaaatggagggcaaggcattcttctaaa
gcaacaaaatggaagctagaaagtaagtggaatgtcaattttctcaactactgaggcgaccgagggcaatgggtataactgactccta
aagtgtattgtacagtgaaagttagatagaaacccagacacicalatttctacatgccactaitaagggaaggttaactcaogagaact
aatgggccaacaacttatgcccacaggcctaattacattgcttttagggacaattttattgggtctaattgtattacaacagcaegggtaatatggg
tgttctggcgggccaagcatcgcagttgaatgtgtgttagatttgaagacagaaacacagagcttccatccagcttttgccttgaattccattg
gtgtagaaccagggtactttctatgttggaatcaggctgtgtgacagctatgaccagatgttagaattattgaaaatcatggactgaagatgaa
cttccaaattactgttccacitgggagggtgtgatttaatacagagactcttaccgaaggtaaaacctaaaacagggtcaggaaaatggatgggaa
aaagatgctacagaatttccagataaaaatgaaataagagttggaataatttgcctatggaaatcaatctaaatgccaaactgtggagaaattt
cctgtactccaacatagcgtgtatttcccgcacaagctaaagtacagtccttccaacgttaaaaatttctgataacccaaacacctacgactac
atgaacaagcaggtgtgtgctccgggttagtggactgtacattaacccgggagcagcgtgtgtcccttgaactatattggaacagctaacce
atttaaccaccacgcgaatgtgtgctgtgctacccgtcgaatgtgtgtgtggcaatgggtcgtatgtgtcccttccacatccagggtgcctcaga
ggttcttggccatlaaaaaaccttcttcttcttgcgggctacacacctacgagtggaactcagggaaggatgtaacatgggtctgcagagctccc
taggaatgaactaagggttgaacggagccagcattgaatttgaatgaacttaccgaaccttcttcccatggcccacacaccgctc
cacgttggagggcattgataaacgacaccaacgaccagtccttaacgactatcttccgcgcccaacatgtcttaccctataccgcga
cgttaccacagtgccatataccatcccttccgcgaacttggcgggttccgcgggtggccttccagcgccttaagactaaggaaacoccca
tcacttgggtcgggctacgaccttattacacctactcttggccttataccctacctagatggaaacttttaccctaacccacaccttgaagaaggc
tgcattacactttagacttctgtcagctggcctggcaalgacgcctgtcttaccaccaacagagttgaaatgaagcgtcagtgacggggag
gggtacaacggttgcagtgtaacatgaccaagactgtgttcttggtagaaatgcttagctaaactataacattggctaccagggtcttctatccc
agagagctacaaggacgcgactgtactcctttagaaacitccagcccatgagccgtcaggtgtgtggtgataactaaatacaaggactacc
aacagggtgggcatctacaccaacacacaactctggaatttgggtaccttgcctcccaacctgcgcgaaggacaggccttaccctgctaac
ttcccctatccgcttattaggcaagaccgagttgacagcattacccagaaaaagtttcttgcgactgcaccccttgggcgactccattctccag
taacttattgtccatgggcgcactacagaccttgggccaacaccttctacgcgaactccgcctccctagacatgaactttgaggttgaat
cccatggagagcccaccttcttattgtttgtttgaagctttgacaagggtcgtgtgcaccagccgcaccgcgggctcaltgaaaacggtgt
acctgcgcagcccttctcggccggcaacgccacaataaagaagcaagcaacatcaacaacagctgccgcatgggtcctcagtgagc
aggaaactgaagccattgtcaagacttgggtgtgggcatatttttgggacattatgacaagcgttccaggttcttctccacacaagc
tcgctgcgcctatgtaataacggcgggtcgcgagactgggggctacacttggatggccttgccttggaaacccgcactcaaaaacatgta
cctctttgagcccttgggttttctgaccagcactcaagcaggttaccagtttagtagtagagtaactcctgcgcctgagcgcattgtctctc
cccgagcgtgtataacgttggaaaagtcacccaaagcgtacaggggccaactcggcgcctgtggactatctgctgcaigtcttcc
acgcttttgcgaacttggcccaactccatggatcaaacccaccatgaaccttattaccgggtgtaaccaactccatgtctcaacagtc
caggtagcagcccaacctgcgtgcgaaccagggaacagctctacagcttcttggagcgcacctcgccttactcgcagccacagtgccgag
attagggagcgcaccttcttcttgcacttgaacaaatgtaaaaaataatgtactagagacacttcaataaaggcaaatgttltttagacactc
cgggtgtattatttccccacaccttgcgtgtgcgcgttlaaaaaatcaagggttcttgcgcgcgcatcgtatgcgccacttggcaggga
cgttgcgatactgtgttagtgccttcaaaactcaggcacaaccatccgcggcagctcgggtgaagtcttactccacaggtcgtgcacca
tcaccaacgcgtttagcaggtcgggcccgaatattgaagtcgagttggggcctccgcctcgcgcgcgaggtgcgatacacagggtt
gcagcacttgaacactatcagcgcgggtgtgtgcagctggccagcagcttcttgcggagatcagatccgcgtccaggtcctccgctt
gtcagggcggaacggagtaacttggtagcttgccttccaaaaaggggcgcgttgcagggctttaggttgcactcgcacaggtagtggaatc
aaaaggtgacctgtcccgggttgggcttggatagcagcgtgcataaaagccttgaatcgtttaaagccacctgagccttggccttcc
agagaagaacatccgcgaagacttccgaaaactgattggccggacagccgcgtcgtgcagcagcacttgcgtcgggttggaga
tctgcaccacatttggcccccacgggttcttcaagatcttggccttctagactgtcttccagcgcgcgtcgcgttggcttgcgttcaatcc
attcaatcacgtgtcttatttataatgttcttctttagacacttaagctcgccttctgaatctcagcgcagcgttgcagccacaacggca

[illegible]

ctgccttggtctccgctccggacgggacattfcagatcggggcgccggccgtccctcaticacgcccctgcaggcaafccfaactctgcaga
 cctcgtccctcagccgctcctcggaggcatctgaaactctgcaattatcaggagtttgtccalcggctactttaacccctctcgggaacctc
 ccggccactatccggatcaattatctctaactttgacgcggtaaggactcggcgacggctacgactgaatgttaagtggagaggcagag
 caactgcccctgaaacaccctggccactgctcgcgcacaaagtgctttgcccgcgactccggtagttgttctactttgaattgcccaggat
 catacagaggcccgccgcacggcgctccggcttaccggccaggggagagcttgccttagcctgaltcgggagtttaccagcgcccccctg
 ctatgttagcggggacaggguuacccctgtgtctcactgtgalttgcaactgtcctaaccctggattacaatcaagatcttgttgcctatctgtgtg
 agtataataaatacagaaatfaaaatatactggggctcctatcggcctcctgttaaaccgccaccgtctcaccgcggcccaagcaaaaccaaggcg
 aaccttaccttggtacttttaacatctctccctctgtgatttacaacagtttcaaccagacggagtgagttctacagagaaacctctccgagctca
 gctactccatcagaaaaaacaccacctctctactctcggggaacgtacgagtgctcaccggcgctgcaccacacctaccgctgacc
 gtaaacagactttttccggacagacctcaataactctgtttacagaaacaggaggtgagcttagaaaaaccttaagggtattagccaaaggc
 gcagctactgtgggtttatgaacaaticaaagcaactctaccggctatcttaattcagggttctctagaatcgggggttgggttattctctgtctgt
 gattctctttatcttatactaacgcttctctgcctaaggctcgcggctgtctgtgtgcacatttgcaatttattgtcagcttttaaacgcttgggtctg
 ccaccaagatgattaggatcataatctaggtttactcacccttgcgtcagccacgggtaccaccaaaagggtgattttaaggagccagcc
 tgtaatgttaccattgcagctgaagctaatgtagtgaccactcttataaaatgcaccacagaaacatgaaaagctgcttattcgcacaaaaaca
 aaatggcaagtatgctgtttatgctatttggcagccagggtgacactacagagataatgttacagtttccagggttaaaagctcaaaaactttat
 gtatactttccattttatgaatgttgcgacattaccatgtacatgagcaaacagtataaattgttggcccccacaaaattgttggaaacactgg
 caattctgtcgcactgctatgctaaftacagtgctcgtttggctgtgtaccctactctataaatacaaaaagcagacgcagcttattgaggaa
 aagaaaatgccttaattactaagttacaaagctaatgtcaccactaaactgtttactcgtcgttgcacaaacaaattcaaaaagtttagcattataa
 ttagaataggatttaaacccccggctattctcgtcctaataccattccctgaacaaftgactctatgttgggataatgctccagcgctacaacctt
 gaagtcaggcttccctggatgtcagcaltgactttggccagcactgtcggcggaattgttccagtcacactacagcgaccaccctaacag
 agatgaccaacacaaacacgcggcgcccgctaccggacttaccatctaccacaaataccaccaagtttctgcttltgcaataactgggat
 aacttgggcaigtgtgtgtctccatagcgctatgttgtatgtccttattatattgtgtgtcctcgtcgtcctaaagcgcaaacgcggccgacca
 cccatctatagctccatcattgtgctacacccaaacaaatgatggatccatagattggagcgactgaaacacatgttcttctctacagatgat
 taaatgagacatgattctcaggttttataactgacctgtgtgcgtttttgtgcgtgtccacattggctgagggttctcacatcgaagtaga
 ctgcaatccagccttccagcttattgttcttaccggattgtgacccctacgcctacgtcagcctcactgttggctatgccttattccagtgca
 ttgacttgggtctgtgtgtgcgttgcatactcagacaccatccccagctacagggacaggactalagctgagcttcttgaatcttataatgatga
 atttactgtgacttttctgctgattattgtcacccctatctgcgtttgttgcggacctccaagcctcaagacatafatcatgagattcactgfat
 atggaatattccagttgctacaatgaaaaagcgatcttccgaagcctgggtatattgcaatcctctctgttatgggtgtctgctgagttaccatctta
 gccctagcttatatccctaccttgacattggctggaaacgaatagatgccatgaaccaccaacttcccgcggccgctatgcttccactgc
 aacaagttgttgcggcgcttcttccagccaatcagcctcggcccaacttctcccaccccaactgaaacagctacttataatcaacaggag
 gagatgactgacacccctagatctagaatgtgacgggaattattacagagcagcgccctgctagaagacgcaggggcagcgccggagcaaca
 ggcgaatgaatcaagagctccaaagacatggttaacttgcaccagtgcaaaaaggggtatcttctgttcttgaagcaggccaaagtcactacg
 acagtaatafaceaccggacacccgcttagctacaagttgccaaacaaagcgtcagaaatgtgtgtgctatggtgggagaaaaagcccattaccat
 aactcagcactcggtagaaacogaaggctgcactcactcacttgtcaaggacctgaggatctctgcaccttattaaagacctgttgggtctc
 caaagatcttattcccttaactaataaaaaaaataaagacatcacttacttaaaatcagttagcaaafttctgtccagttattcagcagcacc
 tcttgcctctcctcagcttggatttgcagcttctccttggctgcaaaacttctccacaatctaaatggaatgtcagtttctcctgttctgtcc
 atccgcacccactatcttctatgttctgagatgaagcgcgcaagacgcctgaagataacctcaaccccgcttatccatagacacggaaac
 cggctctccaaactgtgcttcttctactcctccttcttctatccccaatgggttcaagagagctcccttgggttactcttcttgcgctatccgaa
 cctctagttaacctcaatgtgatgttgcgtcctcaaaatgggcaacggcctctctctgagcagggccggcaaccttaccttccaaaatgttaacc
 actgtgagccaccctcctcggaggagacaagtcacaaataaacttggaaatactcgcacccctcacagttacctcagaagccctaacctgttggc
 tgcggccgcacctctaatgttgcgggcaacacactcaccatgcaatcacaggcccgctaacctgtcagcagctccaaacttagcattgoc
 acccaaggacccctcacagtgctcagaaggaaagctagccctgcaaacatcagggcccccacacaccagatagcagtaeccctactatca
 ctgctcaccctcttaactactgccaactgttagcttgggcatgtgactgaaagagccatttatacacaataatggaaaactaggaactaaagta
 cggggctccttgcattgaacagacgacctaaacacttgcagtagcaactgggtccagggtgacttataataatcttcttgcacaaactaaag
 ttactggagccttgggttggatcacaaggaatatgcaacttaattgtagcaggaggactaaggatgattcctcaaaacagacgcttatactt
 gatgttagttatcgtttgtgctcacaacaaactaaatctaagactaggacaggggcccttcttataaactcagcccacaaacttggatattaact
 acaacaaaggcccttacttctttagcgttcaacaatccaaaagcttgagggttaacctaaagcactgcgaaggggttgaattgtgagctaca
 gccatagccattatgcaggagatgggttgaatttgggttcaactaattgcaccaaacacaaatccctcaaaacaaaatggccatggcctta

aaattgatticaaacaaggctatggttctctaaactaggaactggccttagtttgcacagcacaggttgcattacagttaggaacacaaaaataatg
ataagcttaactttgtggaccacaccagctccatctcctaaactgtagactaaatgcagagaaaagtgttaaacctactttggcttaacaaaatgt
ggcagctcaaaacttctacagtttcaagtttggctgtttaaaggcagtttggctccaatatcttgaacaggttcaaaagtgtcatcttattataagatt
tgacgaaaaatggagtgctactaaacaattctctctggacccagaatatttggaaactttagaaatggagatcttactgaaggccacagcctataca
aacgtgtgttgatttattgectaaectatcagcttaaccacaaatctcaccggtaaaactgcocaaaagttaacattgtcagtcacagtttacttaaacggga
gacaaaactaaacctgttaacactaaccattacactaaacgggtacacagggaaacaggagacacaaactccaaagtgcatactctatgtctatttcat
gggactggctctggccacaactacattaaatgaanaatttggccacatctctacacttttcalacatttgcaccaagaataaagaatcgtttgtgtatg
tttcaacgtgtttattttcaattgcagaaaatttcaagtcatttttctatcagtagtatagcccccacacacatagctttatacagatcaccgtacctt
aatcaaaactacagaaacctagtttcaacctgtccacctccctcccaacacacagagttacacagttcttctccccgggttggccftaaaaagc
atcataatcatgggtaacagacatatattttaggtgttatattccacacgggttctctgtctgagccaaacgctcatcagtgattataataaaactccccg
ggcagctcacttaagttcatgtctgtctccagctgtctgagccacaggtctgtctgtccaaacttgcgggttgcataacggggcgggcgaaaggagaagt
ccacgctcatatgggggtagagtcataatctgtcatcaggataggcggtgtgtgtctgaucagcgccgcaataaaactctgtccgccgcc
gtctcgtctctcaggaatacaacatggcagttgggtctctcagcagatgttctgacccggccgagcataaggcgcccttgcctccgggcaca
gcagcgccacccgtatctacttaaaacagcacagtaactgcagcacagcaccacaatatttgcataaaatccacagtgcaaggcgctgtatc
caaagctcatggcgggggaccacagaaacccagctggccatcataaccacaaggcgaggttagattaaagtgccgacccctcataaacacgctg
gacataaacattaccttfttggcatgttgttaattcacacacctccgggtaccatataaacctctgattaaacatggcgccatccaccacatccta
aacacagcttggccaaaaccttgcgcgcgggtatataactgcaggggaacccgggacaggaaacaatgcagttggagagccaggactcgtaac
catggatcatcatgtctgtcatgatacaattgttggcacacacaggccacacgtgtcatcaccttctcaggattacaagctctctccgcgttag
aacataatccagggaacaacccatctctgaatcagcgttaaatccacactgcaggggaagacctcgcacgttaactcacgtttgtcattgtca
aagtggttacattcgggcagcagcgggatgattctccagttatggtagcgcggttctgtctcaaaaggagggtagacgaltccctactgtacggga
gtgcgcgcagacaaacagagatcgtgttggctgtgtgtcatgccaaatggaaacgcccggacgtatcatatttctgaaggcaaaaccaggtg
cgggcgtgacaaaacagatctgcgtctccggctctgcgcggttagatcgctgtgtgttagttgttagtatatccactctctcaaaagcatccaggc
gccccctggcttgggttctatgttaaactcttctcatgtgcgcgctgtccctgtataacatccaccaccgcagaataaggccacaccagccaaact
acacattcgttctcggagtcacacacggggaggagcggggaagagctgggaagaacctgttttttttttattccaaaagattatccaaaacctca
aaatgaagatctattaagtgaacgcgtctccctccgggtggcggtggtaaaactctacagccaaagaacagataatggcatttgttaagatgttgc
ataatggcttccaaaaggcaaacggccctcagctcaaaagtgagctaaaggctaaaccttcagggtgaatctctctataaacattccagc
accttcaaccatgccaaataattctatctcgtccacaccttctcaatatatctctaaagcaaatccgaatattatagtcggccattgtaaaaatctgc
tocagagcgccctccaccttcagcctcaaggcagcgaatcatgttgcataaaatcagggttctctacagacctgtataagattcaaaaggcgga
cattaaacaaaaatacccgcatcccgtaggttcccttgcaggggccagctgaacataatctgtgcaggtctgcacgggaccagcgcgggccacttc
cccgccaggaacatlgacaaaagaaacccacactgattatgacacgcatactcggagctatgttaaccagcylagccccgatgtaagcttgtt
gcatggcgcgcatataaaatgcaagggtgtctctcaaaaatcaggcgaaggctcgcgcataaaaagaaagcacatcgtatgtcatgtctcat
gcagataaaaggcaggttaagctcggaaacccacagaaaaagacaccattttctcacaacatgtctcgggttctgcataaacacaaaat
aaaataacaaaaaaacatttaaacattagaagcctgtcttacaacaggaaaaaaacaccttataagcataagacggactacggccatgcggg
cgtgacccgtaaaaaaacctggctacccgtgattaaaaagcaccaccgcagactctctcgggtcatgtcgggagtcataatgtaagactcggtaaac
acalcagggtgattcacatcgtgtcagtgctaaaaagcgcagcgaataagccccgggggaatacacataaccgcagggcgtagagacaacattaca
gccccataggagggtatacaaaaattatagggaagaaaaaacacataaacacctgaaaaaaccttctgccttaggcaaaaatagcaccctccc
gtctcagaacaacalacagcgtcttccacagcgggcagccataacagtcagccttaccagtaaaaaagaaaaacctattaaaaaaacaccactc
gacacggcaccagctcaatcagtcacagtgtaaaaaagggccaaagtcagagcgagttatataaggactaaaaaatgacgttaacgggttaa
agttccaaaaaacaccagaaaaacgcagcggaaacctacgccagaaacgaaagccaaaaaacccacaacttctcaaatcgtcacttc
cgtttccacgtttacgtcacttccatttaagaaaaactacaatttcccaacacatactagttactccgccctaaaaacctacgtcaccggccccgt
tcccacgccccgcgcacgtcacaaaatccacccccctattatcatatttggcttcaalccaaaataagggtatattatgatgtgt

SEQ ID NO: 6 – inserción gp100-tyr con enlazadores

ggaagcgtttctcgtacctggagcctggccagtgactgocgctggttcggaagcagatacatggacggaacaatgtccagggtgc
gtttcgcctcc

5

SEQ ID NO: 7 – inserción gp100-tyr con enlazadores

GSGSRYLEPGPVTAAGSGSRYMDGTMSOVAGSGS

SEQ ID NO: 8 – Hexón wt

atggctaccccccttgcgatgatgcgcgcagctgggtcttacctgacacatctcgggcccaggacgccctcgggagfacctlgagccccggggtctggctcagtt
tgcctccgcgccaccgagacgctacttccagccctggaataacaagtttagaaaccccacgggtggcgctacgcacgacgtagccacagaccgggtc
ccagcggttgacgctgctgggttccctctgtagaccgtgaggatactgcgtactcgtacaaaggcgcggttccacctagctgtgggtgataaacc
gtgtgctggacatggtctccacgctacttggacatccggcggtgctgtggacaggggccctacttlaagccctactctggcactgcttacaacg
cccctggctccccagggttgcctccaaatcccttgcgaatgggatgaagctgctacttctcttgaataaaccttagaagaaggagacgatgacaa
cgaagacgaagtagacgagcaagctgagcagcaaaaaactcacgtatttggucagggcccttacttctgtatataaataftacaaggaggggt
attcaaatagggtgtcgaaggtcaaacacctaaatatgcgataaaacatttcaaacctgaaccicaaalaggagaatctcagttggtagaaact
gaaatfaatcatgcagcttggagagctccttaaaaagactacccccaatgaaaccatgttacgggttcatafgcataaacccacaaatgaaatgga
gggcaaggccattctgttaasgcacaanaatggaaagctagaaaatgcaagtggaatgcaattttctcaactactfaggcgagccgcaggcca
atgggtgataacttggactcctaaagtgggtatgtacagtgaagatgtatgatatagaaaccccgacacatcaatttctacatgccacctatataagg
aaggtaactcacgagaactaatgggccaacatctatgcccacaggccctaattacattgtcttttagggacaattttattgggtctaatgtattaca
acagcacgggttaataatgggtgttcttggcgggcccaagcatcgcahtgaatgctgtgttagatttgcagacagaaacacagagctttacacc
agcttttctgttattccattgggtatagaaccagggtacitttctatgttgaatcaggcgtgtgacagcctatgacccagatgttagaattattgaaaat
catggaactgaagatgaacttccaaattactgcttccactggggagggtgtgattataacagagacicttaccaggtaaaacctaaacagggtc
aggaaaaatggatgggaaaaagatgctacagaatttgcataaaaatgaaataagagttggaataattttgccatggaatcaatctaattgc
caactctgggagaaatttctgtactccaaatagcgcgtgtatttggccgacaagclaaagtacagtccttccaacgtaaaaatttctgataacc
caaacacctacgactacatgaacaaggcaggtgggtgggtccgggttggtagtggactgctacattaaccttggagcacgctgggtcccttgcactata
tggacaacgtcaacccattaaaccaccaacgcgaatgctggcctgctacccgctcaatgttggctgggcaattgggtcgtatgtgccccttcaca
tcagggtgctcagaaagttcttggcatlaaaaaccttctctcctggcggtcctacacacctacgagttggaacttcaggaaggatgttaacat
gtttctgcagagctccctaggaaatgacctaaagggttagcggagccaggcaataagttgtatagcaatttgcctttacgccaccttcttccccatg
gcccacaaacaccgctccacgctttaggccatgcttagaaacacacaaacgacacagtcctttaacgactatctctccggcccaacatgct
ctacctatacccgccaacgctaccaacgtgcccataatccatccctcccgcaactggggcggttcccgcggtgggttcccttccagcgccctta
agactaaaggaaaccccacactggggctcgggtctacgaccttattacacactactctgggtctataccctacactagatggaacctttacctcaa
ccacaccttaagaaggttggccattacctttagctcttctgtcagctggcctggcgaatgaccggcctgttaccctccacaggttgaataaagc
gctcagttgacggggagggttacaacgttgcacagtgtaacalgaccaaaagactgggttcctgggtacaaatgctagctaactacaacaltggct
accagggtgttctatatcccgagagagctacaaggaccgcatgtactccttcttagaaacttcagcccatgagccgtcagggtgggtggtatgata
ctaataacaggagctaccaacaggtgggcatcctacaccaacaacaactcttggatttgggttaaccttggccccaccatgctcgcaaggga
caggcctaccctgttaacttccctatccgttaaggcgaagaccgagttgacagcaattaccagaaaaagttcttctgcatcgcacctt
ggcgcatccatttccagtaactttatgtccatggggcgaactcacagacctgggccaanaaccttctctacgccaaactcggcccacggccta
gacatgacttttaggttggatcccatggagagcccaaccttcttattgttttgaagctttgacgttggtccgtgtgcaccagccgcacgc
cgggtctatcgaacacgtgtacctgcgaacgccccttctggcgcgcaacgccacaataaa

SEQ ID NO: 9 – Hexón wt

MATPSMMPQWSYMHISGQDASEYLSPLVQFARATETYFSLNNKFRNPTVAPTHDVT
DRSQRLTLRFIPVDREDTAYSYKARFTLAVGDNRLVDMASTYFDIRGVLDGRPTFKPYS
GTAYNALAPKGAPNPCEWDEAATALEINLEEEEDDDNEDEVDEQAEQKTHVFGQAPYS
GINITKEGIGVEGQTPKYADKTFQPEPQIGESQWYETEINHAAGRVLKKTTPMKPCY
SYAKPTNENGGOGILVKQQNGKLESQVEMQFFSTTEATAGNGDNLTPKVVLVYSEDVDIE
TPDTHISYMPTIKEGNSREL MGQOSMPNRPNYIAFRDNFIGLMYYNSTGNMGVLAGQAS
QLNAVVDLQDRNTELSYQLLLDSIGDRTRYFSMWNQAVDSYDPDVRHJENHGTEDEL
PNCYCFPLGGVINTETLTKVKPKTGQENGWEKDATEFSKNEIRVGNNFAMEINLNANLWR
NFLYSNIALYLPDKLKYSPSNVKISDNPNPTYDYMNKRNVVAPGLVDCYINLGARWSLDY
MDNVNPFNIHHRNAGLRYSMLLGNTRYVPFHIQVPQKFFAIKNLLLLPGSYTYEWNFR
KDVNMVQLQSSLGNDLRVDGASIKFDSICLYATFFPMAHNTASTLEAML RNDTNDQSFND
YLSAANMLYPANATNPISIPSRNWA AFRGWAFTRLKTKETPSLGSYGDPYYTYS
GSI PYLDGTFYLNHTFKKVAITFDSSVSWPGNDRLLTPNEFEIKRSVDGEGYNVAQC
NMTKD WFLVQMLANYNIGYQGFIYESYKDRMYSFFERNFQPMRQVVD DTKYKDYQ
QVGILHQ HNSGFGVGYLAPTMREGQAYPANFPYPLIGKTA VDSITQKKFLCDRTL
WRIPSSNFMS MGALTDLGQNLLYANSAHALDMTFEVDPMDEPTLLYVLFEVFDV
VRVHQPHRGVIETV YLRTPESAGNATT-

SEQ ID NO: 10 – epítopo Hex713

tacctcaaccacaccttaagaagggtg

	SEQ ID NO: 11 – epítopo Hex713 YLNHTFKKV
5	SEQ ID NO: 12 – epítopo V721A tacctcaaccacaccttaagaaggct
	SEQ ID NO: 13 – epítopo V721A YLNHTFKKA
10	SEQ ID NO: 14 – epítopo Hex892 cttctctacgcccaactccgccacggc
	SEQ ID NO: 15 – epítopo Hex892 LLYANSAHA
15	SEQ ID NO: 16 – epítopo A900S cttctctacgcccaactccgccacicc
	SEQ ID NO: 17 – epítopo A900S LLYANSAHS
20	SEQ ID NO: 18 – epítopo Hex917 tatgttttgttgaagtccttgacgtg
25	SEQ ID NO: 19 – epítopo Hex917 YVLFEVFDV
	SEQ ID NO: 20 – epítopo V925K tatgttttgttgaagtccttgacaag
30	SEQ ID NO: 21 – epítopo V925K YVLFEVFDK
	SEQ ID NO: 22 – epítopo Hex512 gggttagtggactgctacattaacctt
35	SEQ ID NO: 23 – epítopo Hex512 GLVDCYINL
40	SEQ ID NO: 24 – epítopo L520P gggttagtggactgctacattaacctt
	SEQ ID NO: 25 – epítopo L520P GLVDCYINP
45	SEQ ID NO: 26 – sitio de unión a sulfato de heparina glucosaminoglicano (HSG) KKTK
	SEQ ID NO: 27 – motivo de unión a integrina RGDK
50	SEQ ID NO: 28 – enlazador flexible QSGSR
55	SEQ ID NO: 29 – enlazador flexible AGSGSR
	SEQ ID NO: 30 – enlazador flexible AGSGS
60	

SEQ ID NO: 31 – epitopo gp100-280
YLEPGPVTA

5 SEQ ID NO: 32 – epitopo Tyr369(3D)
YMDGTMSQV

SEQ ID NO: 33 – epitopo E1A19
LLDQLIEEV

10 SEQ ID NO: 34 – epitopo Hex63
RLTLRFIPV

SEQ ID NO: 35 – epitopo Hex548
MLLGNGRYV

15 SEQ ID NO: 36 – epitopo Hex652
MLYPIPANA

20 SEQ ID NO: 37 – epitopo Hex914
TLLYVLFEV

SEQ ID NO: 38 – epitopo gp100-209
IMDQVPFSV

REIVINDICACIONES

1. Un adenovirus oncolítico, en donde dicho adenovirus oncolítico es capaz de replicarse en una célula tumoral, en donde dicho adenovirus se selecciona del grupo que consiste en:
 - (i) un adenovirus que comprende una mutación V721A en el epítipo Hex713 (YLNHTFKKV) (SEQ ID NO: 11), una mutación A900S en el epítipo Hex892 (LLYANSAHA) (SEQ ID NO: 15) y una mutación a V925K en el epítipo Hex917 (YVLFEVFDV) (SEQ ID NO: 19); y
 - (ii) un adenovirus que comprende una mutación L520P en el epítipo Hex512 (GLVDCYINL) (SEQ ID NO: 23), una mutación V721A en el epítipo Hex713 (YLNHTFKKV) (SEQ ID NO: 11), una mutación A900S en el epítipo Hex892 (LLYANSAHA) (SEQ ID NO: 15) y una mutación a V925K en el epítipo Hex917 (YVLFEVFDV) (SEQ ID NO: 19).
2. El adenovirus oncolítico de la reivindicación 1, en donde el adenovirus comprende una mutación L520P en el epítipo Hex512, una mutación V721A en el epítipo Hex713, una mutación A900S en el epítipo Hex892, y una mutación a V925K en el epítipo Hex917.
3. El adenovirus oncolítico de cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, que además comprende una o más secuencias de ácido nucleico heterólogo que cada una codifica un antígeno o epítipo tumoral capaz de ser reconocido por células T.
4. El adenovirus oncolítico de la reivindicación 3, en donde dicho antígeno o epítipo tumoral se inserta en una región hipervariable de la proteína hexón del adenovirus.
5. El adenovirus oncolítico de cualquiera de las reivindicaciones 3 o 4, en donde dicho antígeno o epítipo tumoral está flanqueado por enlazadores flexibles que comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: GSGSR (SEQ ID NO: 28), AGSGSR (SEQ ID NO: 29), y AGSGS (SEQ ID NO: 30).
6. El adenovirus oncolítico de cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, en donde dicha una o más secuencias de ácido nucleico heterólogo codifica un antígeno o epítipo tumoral gp100, o un antígeno o epítipo tumoral tirosinasa.
7. El adenovirus oncolítico de cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, en donde dicha una o más secuencias de ácido nucleico heterólogo comprenden (a) una secuencia de ácido nucleico heterólogo que codifica un antígeno o epítipo tumoral gp100 o que comprenden la secuencia de aminoácidos YLEPGPVTA (SEQ ID NO: 31), y (b) una secuencia de ácido nucleico heterólogo que codifica un antígeno o epítipo tumoral tirosinasa que comprende la secuencia de aminoácidos YMDGTMSQV (SEQ ID NO: 32).
8. El adenovirus oncolítico de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde el adenovirus es adenovirus humano de serotipo 5.
9. El adenovirus oncolítico de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde el adenovirus además comprende un promotor específico de tejido o específico de tumor para lograr replicación selectiva en tumores o en donde el adenovirus además comprende al menos un gen seleccionado del grupo que consiste en: un gen que activa un profármaco, un gen supresor tumoral, y un gen inmunoestimulador.
10. El adenovirus oncolítico según la reivindicación 1 que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 3 o 4 o 5.
11. Una composición farmacéutica que comprende una dosis farmacológicamente eficaz del adenovirus oncolítico de cualquiera de las reivindicaciones 1-10 y uno o más soportes o excipientes farmacéuticamente aceptables.
12. El adenovirus oncolítico de cualquiera de las reivindicaciones 1-10 para uso como un medicamento.
13. El adenovirus oncolítico de cualquiera de las reivindicaciones 1-10 para uso en el tratamiento o la prevención de cáncer o una enfermedad premaligna que lleva a cáncer en un mamífero.
14. El adenovirus oncolítico para uso según la reivindicación 13, en donde el mamífero es un ser humano.
15. Un polinucleótido aislado que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 3, 4 y 5.

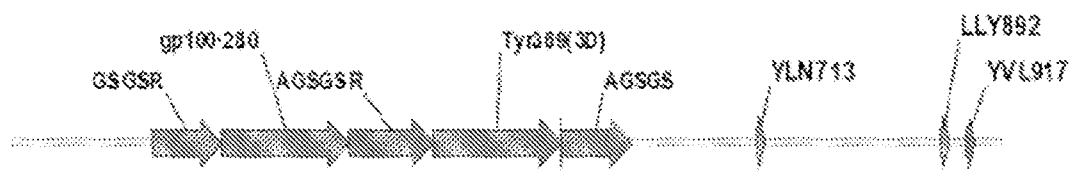


FIG. 1

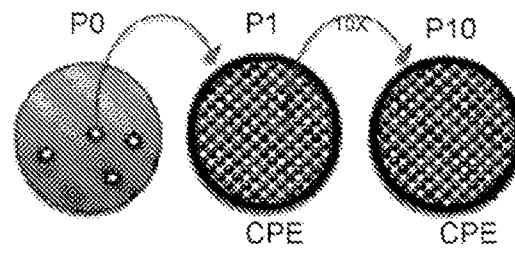


FIG. 2

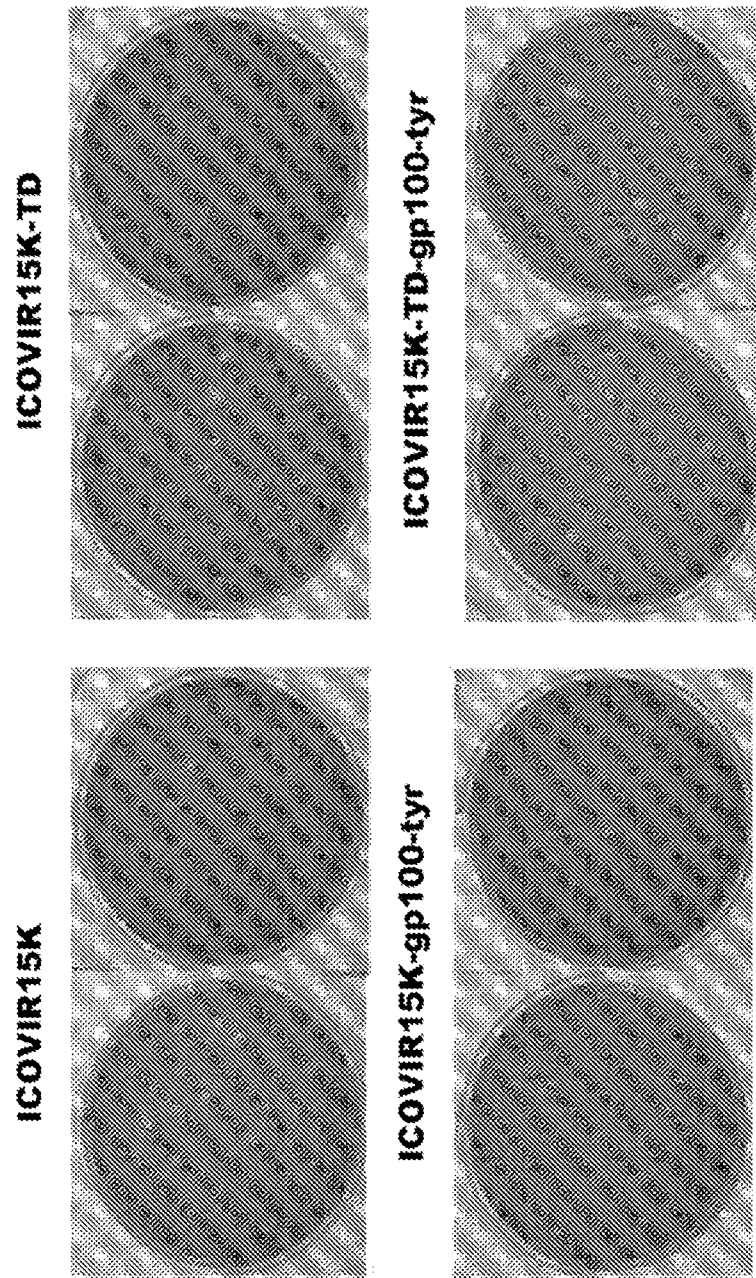


FIG. 3

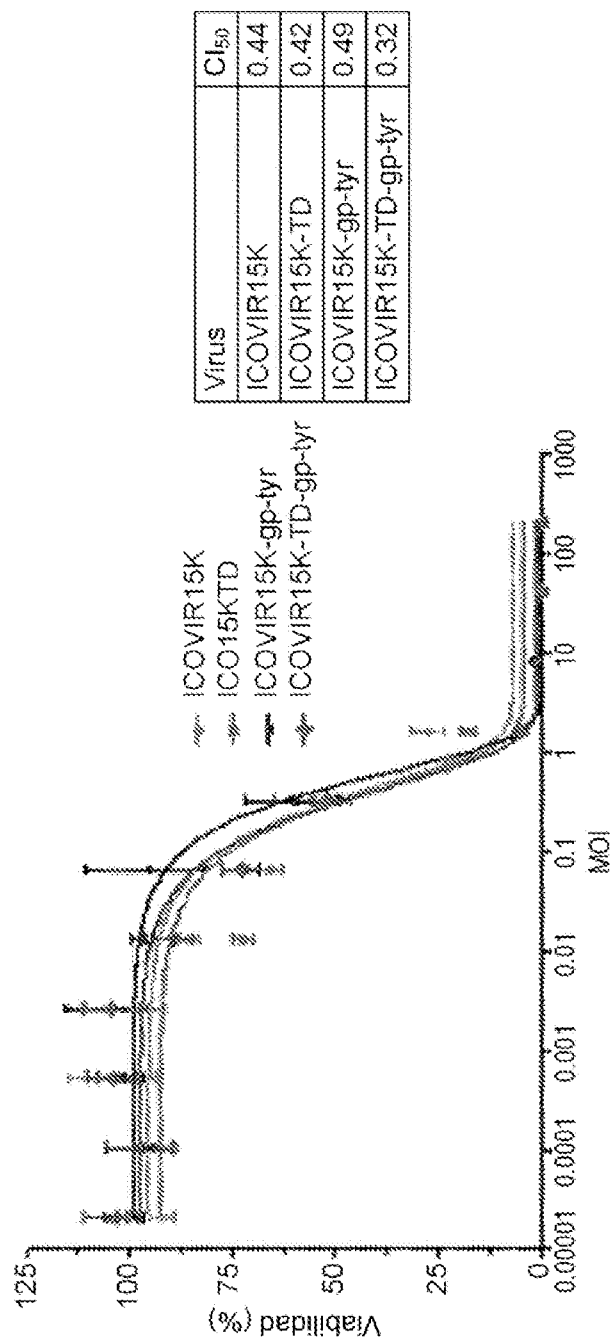


FIG. 4

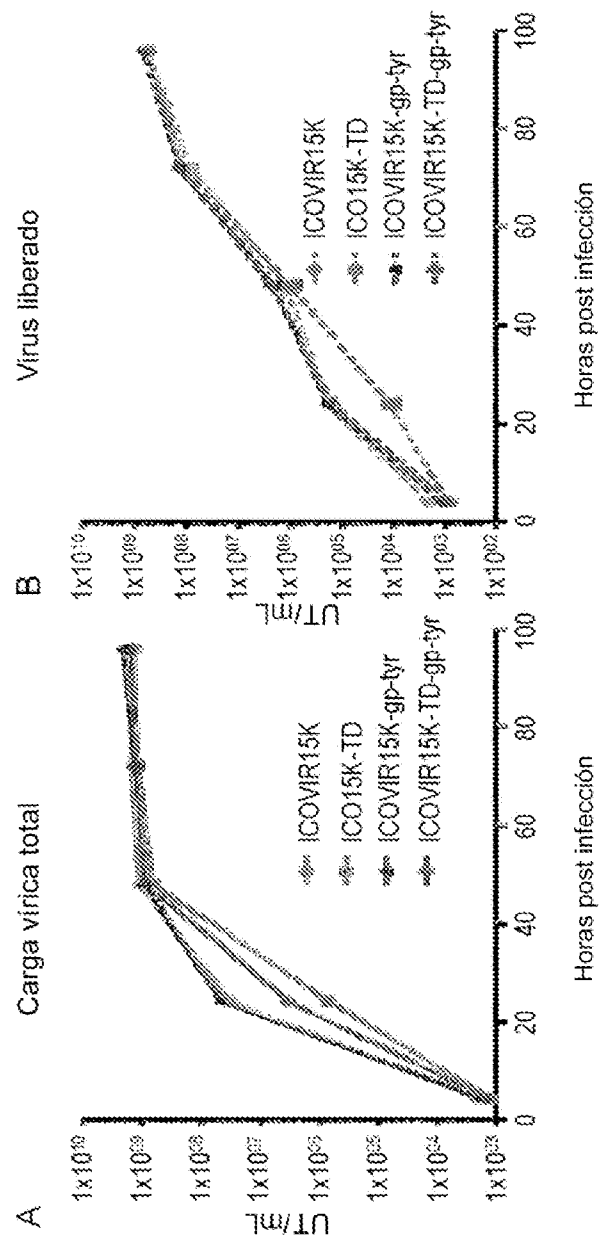


FIG. 5

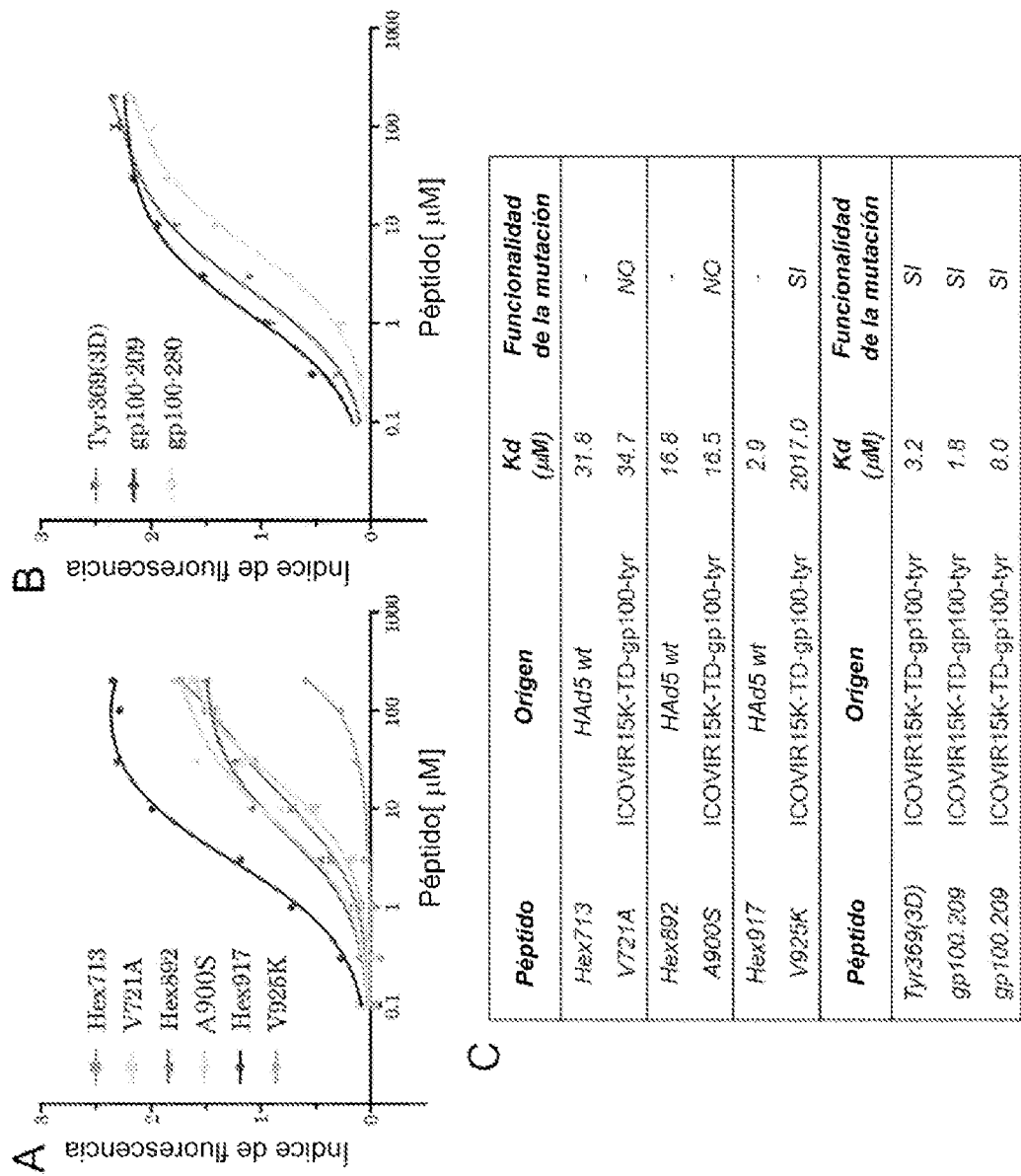


FIG6

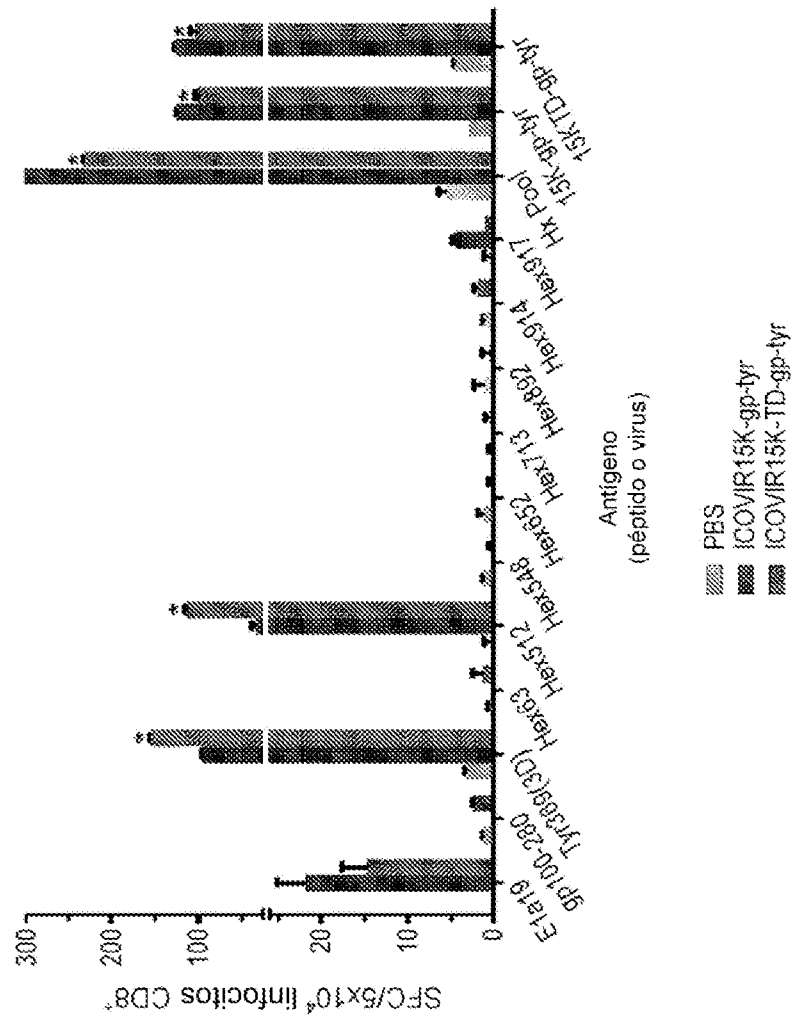


FIG. 7

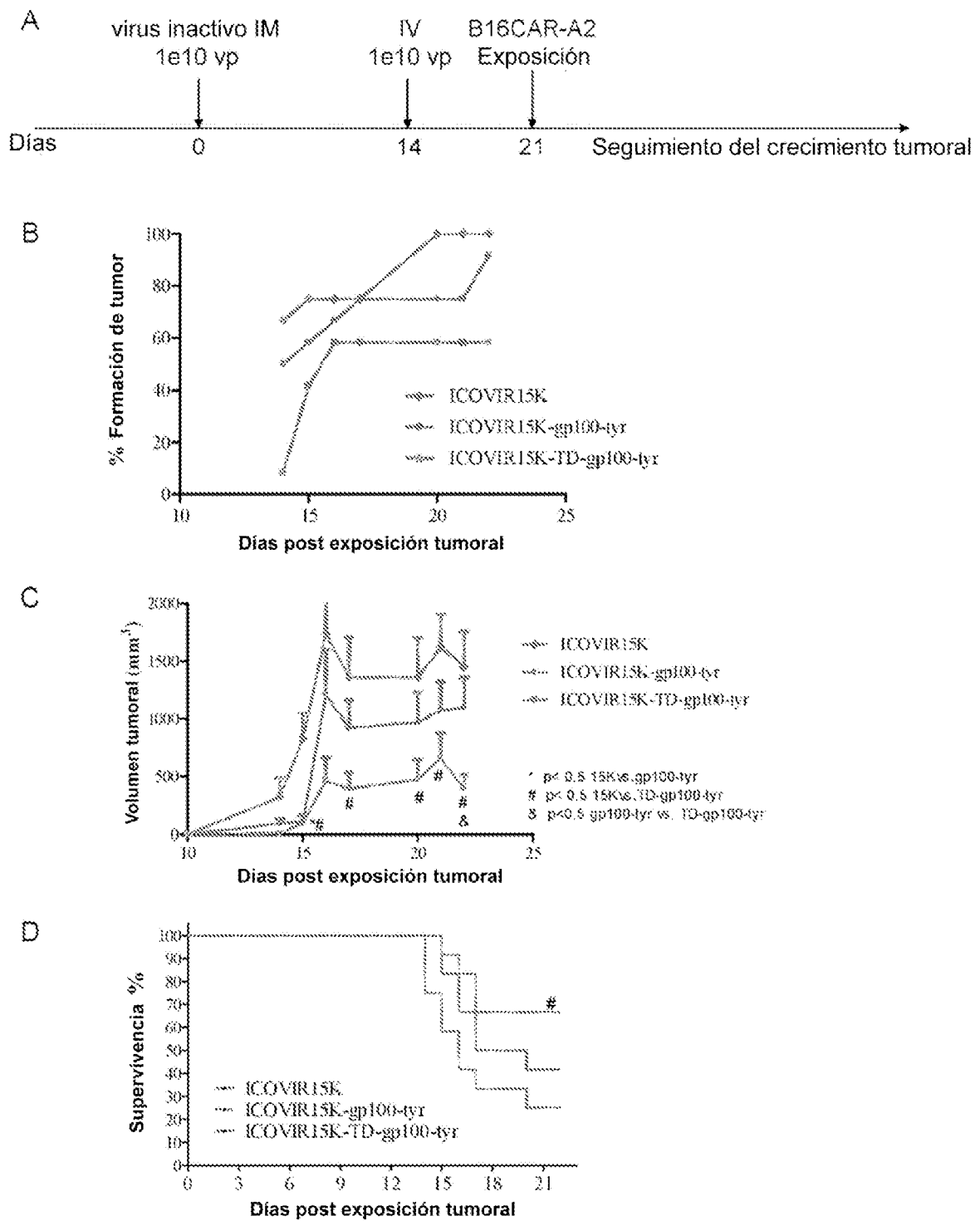


FIG. 8

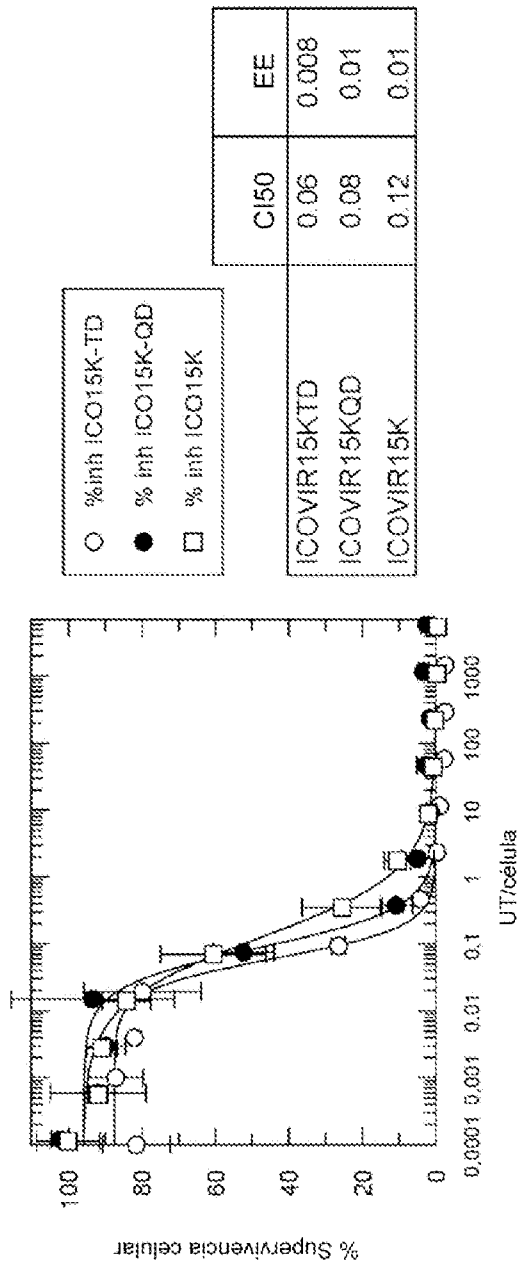


FIG. 9

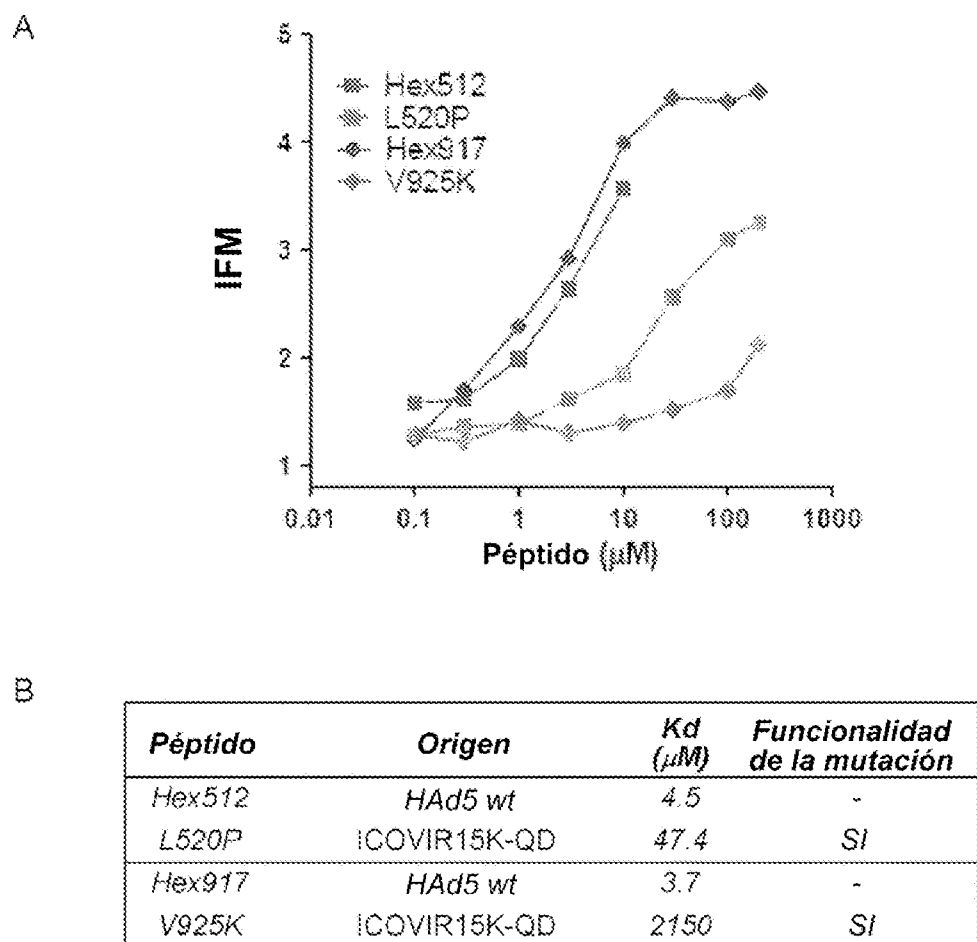


FIG. 10

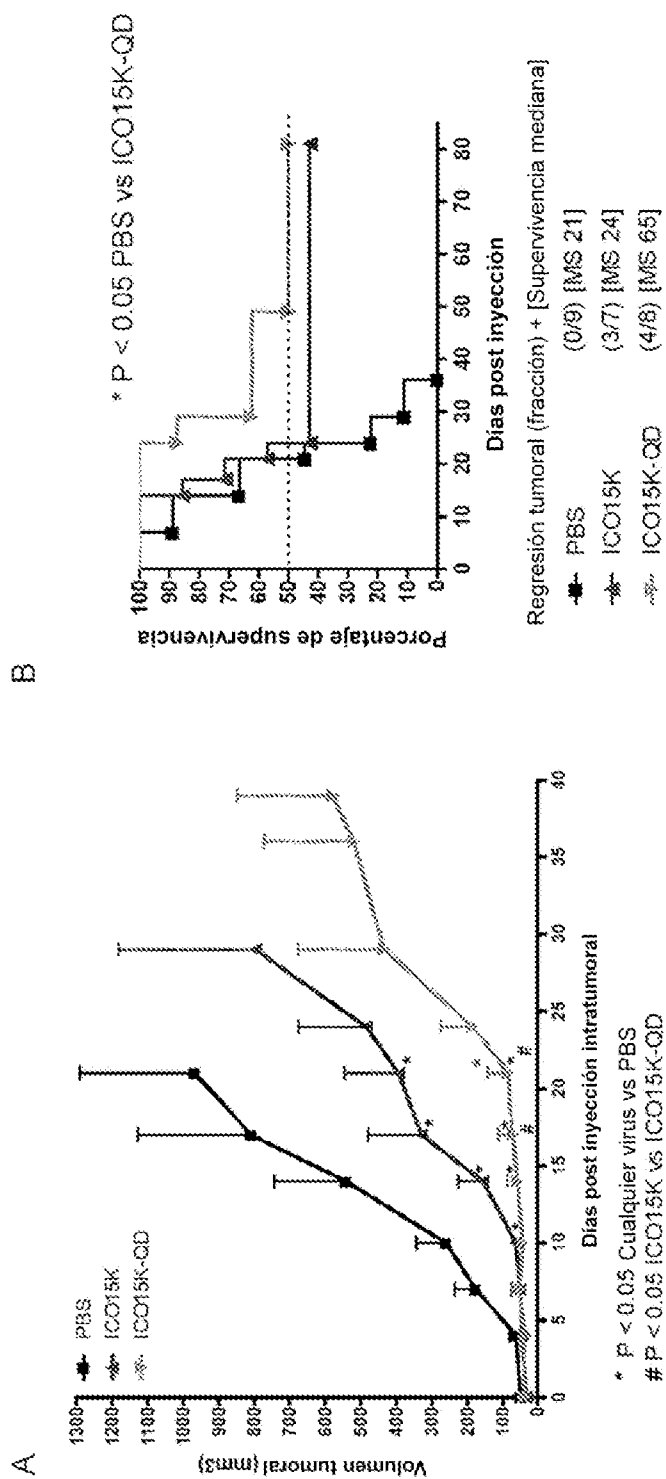


FIG. 11

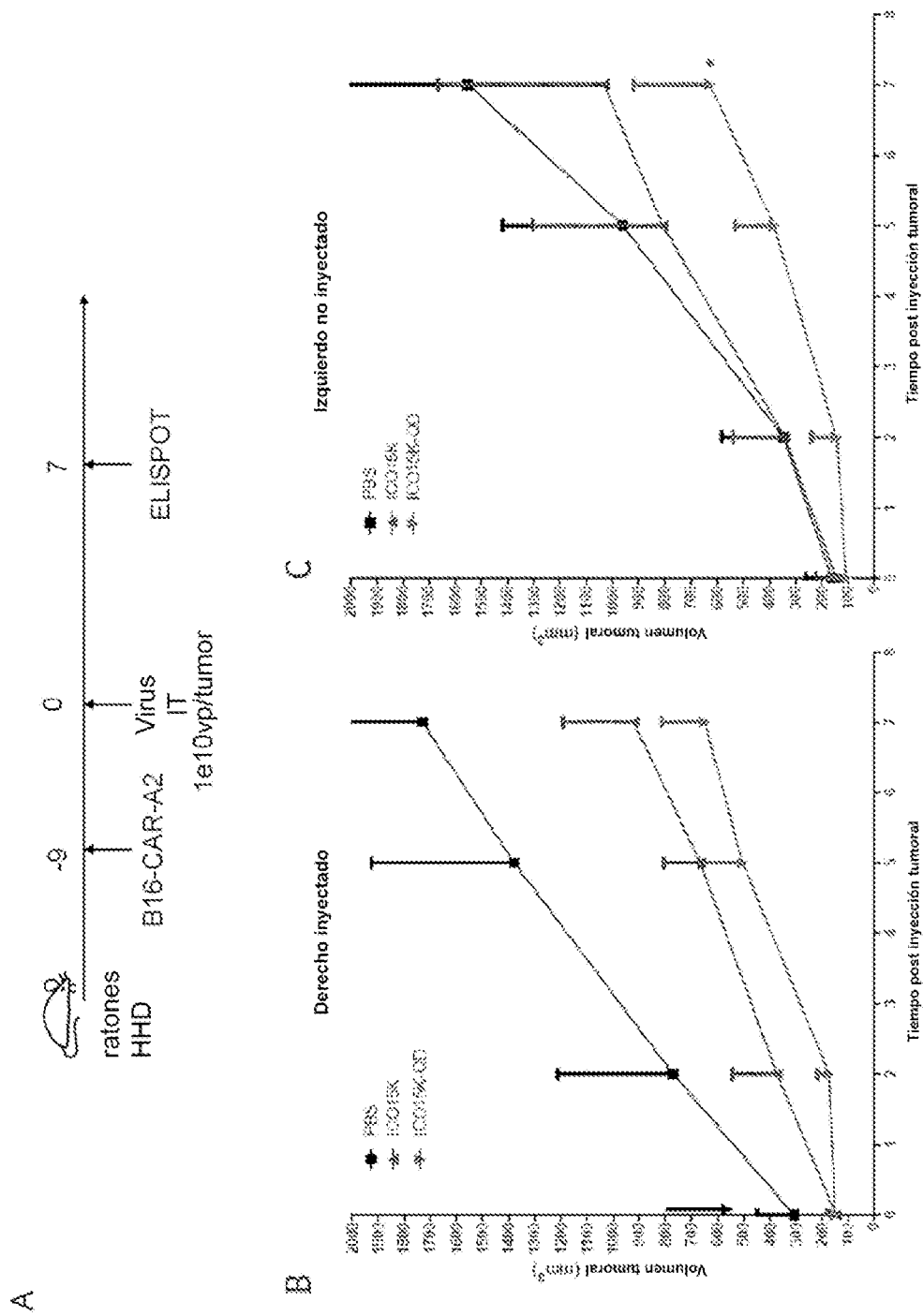


FIG. 12

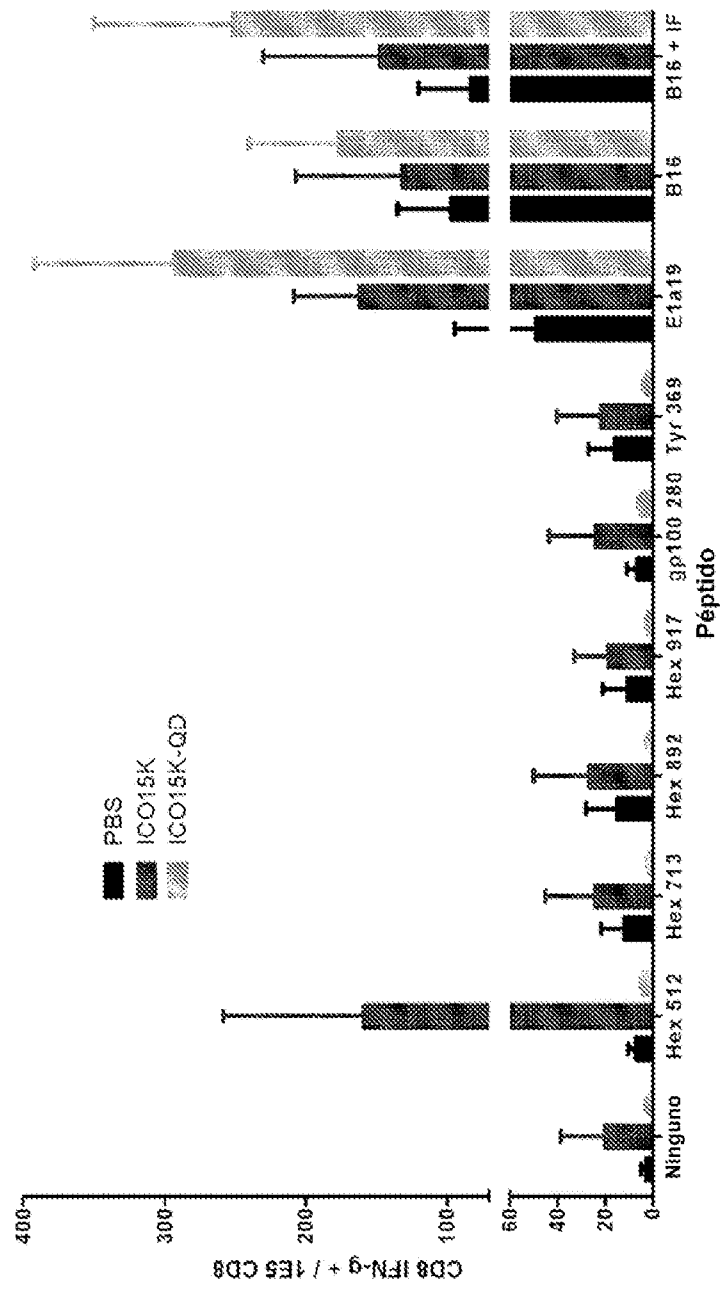


FIG. 13