(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 466 415**

(51) Int. CI.:

***C12N 15/34*** (2006.01)
***C12N 15/861*** (2006.01)
***A61K 39/235*** (2006.01)
***A61K 48/00*** (2006.01)
***A61P 35/00*** (2006.01)
***A61P 37/02*** (2006.01)
***A61K 35/76*** (2006.01)
***C12N 7/00*** (2006.01)
***A61K 38/19*** (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.11.2004 E 04797352 (4)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.04.2014 EP 1767642**

(54) Título: **Construcción de recombinante de adenovirus oncolítico que expresa específicamente el factor inmunomodulador GM-CSF en células tumorales y usos del mismo**

(30) Prioridad:

**07.06.2004 CN 200410046237**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
**10.06.2014**

(73) Titular/es:

**CHENGDU KANGHONG BIOTECHNOLOGIES CO., LTD. (100.0%)**
**NO. 36 SHUXI RD JINNIU DISTRICT**
**CHENGDU CITY 610036, SICHUAN, CN**

(72) Inventor/es:

**KE, ZUNHONG**

(74) Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

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

Construcción de recombinante de adenovirus oncolítico que expresa específicamente el factor inmunomodulador GM-CSF en células tumorales y usos del mismo

**Campo de la Invención**

La presente invención se refiere a una terapia génica para tumores. Más específicamente, la invención se refiere a adenovirus oncolíticos recombinantes, que se replican preferentemente en células tumorales y expresan factores imunoestimulantes para inducir respuestas inmunes específicas de tumor en el cuerpo humano.

**Antecedentes de la Invención**

Hace más de un siglo desde que se utilizó por primera vez un virus para tratar una enfermedad neoplástica. Algunos médicos observaron que ocasionalmente un paciente se curaba después de una infección por virus. Este rompecabezas no se resolvió hasta el comienzo de los años 1920, y desde entonces ha atraído la atención de los científicos y médicos de clínica. Éste fue el comienzo de la viroterapia (utilización de virus para tratar el cáncer). Hacia los años 1950, habían sido ensayados más de 50 virus respecto a actividad antitumoral en animales o pacientes (*Mullen y Tanabe (2002) The Oncologist 7:106-119; McCormick F (2001) Nature Review Cancer 1:130.141*). En 1956, el doctor Smith y su equipo trataron más de 30 pacientes de cáncer cervical con lisado de células HeLa o células KB que estaban infectadas con 10 serotipos de adenovirus de tipo salvaje por inyección intratumoral, inyección arterial intrahepática o inyección intravenosa. No se observó efecto secundario grave alguno, excepto síntomas de gripe en la mayoría de los pacientes; por el contrario, los tumores de varios pacientes se contrajeron y se volvieron necróticos. Lamentablemente, debido a la limitación de la producción y purificación de los virus, este trabajo no progresó ulteriormente. El trabajo del doctor Smith había estimulado a muchos científicos a explorar la posibilidad de utilizar virus para tratar cánceres (*Chiocca EA (2002) Nature-Review Cancer 2:938-950*).

Junto con el proceso realizado en biología molecular e ingeniería genética, en particular, con mejores conocimientos en virus en relación con el ser humano, los científicos han logrado manipular genéticamente el genoma viral desde finales del pasado siglo, lo que incluye el éxito en la creación de mutantes de virus que pueden replicarse específicamente en células tumorales (*McCormick F (2001) Nature Review Cancer 1:130-141*). Por ejemplo, el mutante del virus del herpes simple específico de glioma G207 (*Martuza et al., (1991) Science 252:854-856*), el adenovirus Add11520 (Onyx-015), un mutante de adenovirus que se replica preferentemente en células tumorales deficientes en p53 (*Bischoff et al., (1996) Science 274:373-376*) y CV706, un mutante de adenovirus específico de las células de cáncer de próstata (*Rodriguez et al. (1997) Cancer Research 57: 2559-2563*). Este trabajo ha sentado las bases para la formación de un nuevo campo: La Viroterapia del Cáncer. En la actualidad, existen más de 20 variantes de virus en pruebas clínicas (*Mullen y Tanabe (20002) The Oncologist 7:106-119).*

Existen varios enfoques para la producción de virus oncolíticos específicos de células tumorales. Un enfoque para producir una variante de virus que se replica selectivamente en células tumorales consiste en la utilización de elementos reguladores específicos de células tumorales tales como promotores e intensificadores que controlan la expresión de genes virales esenciales, por ejemplo, los genes E1A, E1B, E2 y E4 de adenovirus (*DeWeese et al. (2001) Cancer Research 61:7464-7472*). Por este enfoque, genes virales esenciales y en última instancia la replicación de los virus podrían ponerse bajo control de elementos reguladores específicos de células tumorales; tales elementos reguladores incluyen el promotor e intensificadores del antígeno específico de próstata (PSA), el promotor e intensificadores de la alfa-feto-proteína (AFP), el promotor de E2F-1 humano, etc. (*McCormick F (2001) Nature Review Cancer 1:130-14*).

La telomerasa en una enzima importante para controlar la longitud del extremo de los cromosomas celulares, capaz de regular la longitud del extremo del cromosoma durante el proceso de la fisión celular. La telomerasa está constituida principalmente por las tres partes, en donde RNA y el gen de la transcriptasa inversa de telomerasa (hTERT), que tiene actividad catalítica, controlan la actividad de telomerasa, mientras que el promotor hTERT determinará la expresión y actividad de la telomerasa.

Investigaciones ulteriores han indicado que la telomerasa tiene actividad nula o muy baja en las células normales adultas. *(Kim N W et al. Science. 1994 Dec. 23*; 266(5193):2011-5; Shay J W et al. European Journal of Cancer 1997, 33;271-282), en tanto que tiene un alto nivel de suministro en más de 90% de las células tumorales (Hahn y Weinberg (2002) Nature Review Cancer 2:331-341; Shay y Wright (1996) Current Opinion Oncology 8:66-71). Basándose en estas características de hTERT, los científicos han generado con éxito varios vectores en los cuales el promotor hTERT se incorporaba en el genoma viral para suministro de genes, con inclusión de los trabajos publicados recientemente que describen el uso del promotor hTERT para replicación condicional de adenovirus oncolíticos (*Lanson et al. (2003) Cancer Research 63:7936-7941; Kawashima et al., (2004) Clinical Cancer Research 10:285-292; Kim et al. (2003) Oncogene 22: 370-380; Irving et al. (2004) Cancer Gene Therapy 174-185)*.

Existen un pequeño número de elementos reguladores endógenos en el genoma adenoviral, que regula la expresión de genes virales, por ejemplo, el promotor e intensificador del gen E1A, entre estos elementos reguladores endógenos, la secuencia del intensificador E1A se solapa con la señal de empaquetamiento viral. Con objeto de minimizar el impacto de los elementos reguladores endógenos sobre la regulación de un promotor heterólogo, los

científicos han reubicado la señal de empaquetamiento a la rama derecha desde el sitio nativo en el extremo de la izquierda (*Bristol et al. (2003) Molecular Therapy 7(6):755-764; Jakubczak et al. (2003) Cancer Research 63:1490-1499)*. Lamentablemente, esta clase de reubicación de la señal de empaquetamiento viral desde el sitio nativo al extremo de la derecha ha desestabilizado el genoma viral, dando como resultado la generación de muchos mutantes virales (*WO 02/067861; ASGT 2003 Annual Meeting, Molecular Therapy*). Por tanto, la reubicación arriba indicada de la señal de empaquetamiento viral no es un enfoque viable para minimizar el impacto de los elementos reguladores endógenos. ¿Cómo minimizar el impacto de los reguladores virales endógenos sobre los elementos heterólogos y prevenir la generación no deseada de muchos mutantes virales, en tanto que se mantiene estable el genoma viral?

Con respecto al nivel de expresión de la telomerasa en humanos, durante el desarrollo y la diferenciación del embrión, los científicos han llegado a reconocer también que existe un determinado nivel de actividad de telomerasa en algunas células que incluyen células del miembro cervical, progenitores, y células madre (*Wright et al. (1996) Development Genetics 18:173-179; Sharma et al. (1995)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:12343-12346; Kolquist et al. (1996) British Journal of Cancer 80:1156-1161; Tahara et al. (1999) Oncogene 18:1561-1567; Tanaka et al. (1998) American Journal of Pathology 153:1985-1991*). El bajo nivel de la actividad de expresión de telomerasa ha aconsejado a los científicos cuando los mismos utilizaban el promotor hTERT para suministrar un gen terapéutico en el vector de terapia génica, o para generar adenovirus oncolíticos específicos de células tumorales por control de genes virales esenciales (*Hahn WC (2004) Clinical Cancer Research 10: 1203-1205*). Debido al bajo nivel de expresión de telomerasa en las células distintas de la diana, tales como los progenitores, los adenovirus oncolíticos controladores del promotor hTERT pueden replicarse masivamente en las células progenitoras, dando como resultado efectos secundarios graves (*Huang et al. (2004) Clinical Cancer Research 10:1439-1445; Hahn WC (2004) Clinical Cancer Research 10:1203-1205; Masutomi et al. (2003) Cell 114: 241-253*). Por tanto, el aumento de la especificidad de células tumorales del promotor hTERT es uno de los proyectos fundamentales en la generación de adenovirus oncolítico utilizando el promotor hTERT.

Varios documentos consideran la generación y uso de vector de adenovirus oncolítico. Li *et al.* (*Cancer Research, 2001, 61, p. 6428-6436*) dan a conocer una variante de adenovirus específico de carcinoma hepatocelular, CV890, que elimina los tumores hepáticos humanos distantes cuando se administra en combinación con doxorrubicina. Green *et al.* (*Int. J. Cancer, 2003, 104, p. 104-112*) dan a conocer un vector de adenovirus bicistrónico y su uso para intensificación inmune de la citotoxicidad inducida por nitrorreductasa. Kawashima *et al.* (*Clinical Cancer Research, 2004, 10, p. 285-292*) construyen un vector número 5 de adenovirus en el cual el elemento promotor hTERT impulsa la expresión de genes E1A y E1B para viroterapia selectiva de replicación. WO 03/013555 da a conocer un método para amplificación de la expresión de un promotor específico de células tal como hTERT que puede proporcionar método de terapia del cáncer. WO 02/067861 se refiere a vectores oncolíticos de adenovirus y su uso en métodos de terapia génica, vectores que comprenden un promotor sensible a E2F. WO 2005/112541 se refiere a un vector de expresión génica de adenovirus híbrido que comprende una secuencia promotora específica de tejido así como usos de la misma. CN-A-1.381.582 da a conocer un adenovirus recombinante para expresión de GM-CSF humano y su uso para inmunoterapia. La Patente US número 6.627.190 describe vectores de adenovirus que sobreexpresan una proteína de muerte de adenovirus y que están preferiblemente restringidos en replicación a células que expresan telomerasa. WO 96/09399 describe un adenovirus quimérico capaz de transducir células de mamífero con DNA, adenovirus que puede ser útil para tratamiento de enfermedades y trastornos genéticos de mamífero. La Patente US número 6.348.450 se refiere a técnicas de terapia génica no invasiva direccionada a la piel, en donde el vector es un vector de adenovirus que codifica un gen de interés. CN-A-1.382.218 describe un adenovirus oncolítico que destruye preferentemente las células neoplásticas pero no las normales, comprendiendo preferiblemente el vector un promotor sensible a E2F. La Patente US número 6.713.055 se refiere a vectores, que pueden ser vectores adenovirales, que comprenden una secuencia codificante de una glicosil-transferasa bajo el control de un elemento de control de la transcripción específico de tumor o de tejido. WO 99/46371 se refiere a vectores adenovirales que contienen genes proapoptóticos y el uso de tales vectores en terapia del cáncer.

**Sumario de la Invención**

En un aspecto, la presente invención proporciona un recombinante de acuerdo con la reivindicación 1.

Adenovirus oncolíticos específicos de células tumorales pueden obtenerse por combinación del adenovirus oncolítico con un elemento regulador específico de una célula tumoral por un método de ingeniería genética, y el recombinante puede construirse por incorporación del promotor específico de células tumorales de SEQ ID NO: 2 y el gen inmunorregulador en el genoma del adenovirus por tecnología de clonación de DNA, obteniéndose así una secuencia fusionada capaz de replicarse en las células tumorales y expresar el gen inmunorregulador en las células tumorales.

En otro aspecto, esta invención proporciona un uso del recombinante de adenovirus oncolítico reivindicado en la fabricación de un medicamento para prevención y/o tratamiento de un tumor.

En otro aspecto, esta invención proporciona una composición farmacéutica que comprende el recombinante reivindicado, v.g. como un medicamento para prevención y/o tratamiento de un tumor.

En otro aspecto, esta invención proporciona un promotor que tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 2.

El recombinante conforme a la presente invención puede utilizarse para controlar los adenovirus en tal grado que estos adenovirus se repliquen únicamente en las células tumorales. Por modificación genética del promotor hTERT, el recombinante de la invención tiene una especificidad sustancialmente mejorada del promotor hTERT para las células tumorales.

El recombinante del virus oncolítico que tiene especificidad de células tumorales, conforme a la invención, se puede preparar por ingeniería genética de un gen de factor inmuno-estimulante, que es capaz de inducir una respuesta inmuno-estimulante específica del cuerpo humano a las células tumorales, con el genoma viral replicante específico de las células tumorales. El recombinante de virus resultante puede replicarse selectivamente en una población específica de células y puede replicarse y propagarse en células tumorales, y por consiguiente destruir las células tumorales, por lo que el recombinante puede utilizarse para tratar el cáncer y prevenir el tumor.

En la técnica anterior, la construcción y propagación de adenovirus oncolítico replicante condicionalmente o vectores virales modificados por ingeniería genética se encuentra en líneas de células modificadas por ingeniería genética, tales como la línea de células 293. Una línea de células de este tipo expresa proteínas adenovirales E1 para complementar la función del vector adenoviral delecionado en E1 y deficiente en replicación o un recombinante de adenovirus oncolítico replicante condicionalmente en el cual el gen E1 viral se encuentra bajo el control de un elemento regulador selectivo de células tumorales. Lamentablemente, el recombinante producido en una línea de células de este tipo contiene usualmente cierta cantidad de adenovirus de tipo salvaje o recombinados (a los que se hace referencia como adenovirus competente en replicación, RCA). La razón para la generación de RCA en el producto recombinante es que en las células de generación tales como la clase de línea de células 293, se contiene la secuencia génica del adenovirus; esta pieza de secuencia de adenovirus “tipo salvaje” se recombinará en la célula con el adenovirus delecionado en E1 o intensificado en E1, dando como resultado un adenovirus “tipo salvaje” o un adenovirus recombinante. Un producto de este tipo puede no cumplir las especificaciones de producto y puede causar efectos secundarios inesperados con problemas de seguridad. La célula utilizada para construcción del recubrimiento reivindicado puede seleccionarse de modo que no contenga secuencia alguna de gen adenoviral y por consiguiente puede evitar el RCA y resolver el problema de seguridad como se ha mencionado arriba.

En una realización, la invención proporciona un recombinante de adenovirus oncolítico de replicación condicional como se reivindica en esta memoria en el cual la proteína de la cápsida se ha mejorado para aumentar la afinidad de fijación del recombinante a las células tumorales, dando como resultado un aumento de infectividad del recombinante para la célula tumoral. Muchos estudios recientes han demostrado una expresión baja o nula del receptor 5 de adenovirus (el receptor del virus B de Coxsackie y el receptor de adenovirus, CAR) en células tumorales. No obstante, todas las células tumorales expresan un alto nivel de CD46 (Shayakhmetov et al., 2002. Cancer Research 62:1063-1068). Estudios ulteriores han demostrado que el receptor del serotipo 35 de adenovirus es la molécula de proteína CD46 (Sirena et al. (2004) Journal of Virology 78(9):4454-4462). Por tanto, los autores de esta invención proponen reemplazar el botón de fibra de la secuencia proteínica en el recombinante del virus serotipo 5 de adenovirus con el de serotipo 35 de adenovirus, el último de los cuales es capaz de fijar el receptor de la proteína CD46, a fin de construir un recombinante que tiene un adenovirus fusionado capaz de fijar el receptor. Se cree que un recombinante de este tipo tendrá infectividad mejor en un espectro más amplio de células tumorales.

El virus oncolítico de replicación condicional de acuerdo conforme a la invención puede ser uno cualquiera de los serotipos de adenovirus que incluyen el serotipo 5, 2, 35, 41, etc., preferiblemente el serotipo 5 o un adenovirus mejorado. Por ejemplo, un recombinante de adenovirus en el cual el gen E1A y el gen E1B están ligados uno a otro por el sitio de entrada de cromosoma interno (IRES); un recombinante de adenovirus en el cual el botón de fibra del adenovirus tipo 5 está reemplazado con el del serotipo 35 de adenovirus; un recombinante de adenovirus en el cual está insertada una secuencia terminal de la transcripción aguas abajo de la ITR viral y el sitio de empaquetamiento y aguas arriba del promotor hTERT; estando delecionado el adenovirus con su secuencia codificante para 10,4 K, 14,5K y 14,7K en la región E3. Dicha secuencia terminal de la transcripción puede terminar la transcripción génica mediada por cualquier RNA-polimerasa, tal como la secuencia señal temprana SV40 poli(A); tal como el recombinante de adenovirus con sus secuencias para codificación de 10,4K, 14,5K y 14,7K en el fragmento E3 estando delecionadas.

Dicho elemento regulador de genes que es específico de las células tumorales es el promotor hTERT mejorado de SEQ ID NO: 2, y este promotor tiene un sitio de fijación para el factor de transcripción E2F-1.

Dicho elemento inmunorregulador puede ser cualquier gen o sus variantes que puedan simular o inducir respuesta inmune, seleccionado de IL-2, IL-10, IL-12, IL-15, IL-24, IL-25, GM-CSF, G- CSF e INF-alfa, INF-beta, con preferencia

GM-CSF, con inclusión de sus formas secretadas y fijadas a la membrana, así como sus variantes.

Un recombinante de adenovirus preferible de acuerdo con la invención es un recombinante de este tipo, en el cual el vector del virus esencial es un adenovirus mejorado tal que, en la secuencia del adenovirus, está insertada una secuencia terminal de la transcripción aguas abajo de la ITR viral y el sitio de empaquetamiento, pero aguas arriba

del promotor hTERT de SEQ ID NO: 2, el gen inmuno-estimulante es GM-CSF que tiene una secuencia representada en SEQ ID NO: 3 (KH-901) o que se encuentra en un GM-CSF fijado a la membrana (KH-902).

Otro recombinante de adenovirus preferible conforme a la invención es un recombinante de este tipo en el que el vector del virus esencial es un adenovirus mejorado tal que, en su secuencia, el botón de fibra es del serotipo 35 de adenovirus en sustitución del serotipo 5 de adenovirus, y el elemento regulador específico de células tumorales es el promotor hTERT que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 2, y el gen inmunoestimulador es GM-CSF (KH-904), preferiblemente un GM-CSF fijado a la membrana (KH-905).

En otra realización preferida, el gen E1A y el gen E1B están unidos por IRES, el botón de fibra es de serotipo 35, está insertado un elemento terminal de la transcripción aguas abajo de la ITR y el sitio de empaquetamiento y aguas arriba del promotor hTERT de SEQ ID NO: 2, en el cual el gen inmunoestimulador es GM-CSF, preferiblemente en su forma fijada a la membrana.

Otro recombinante preferible de adenovirus conforme a la invención es uno de este tipo, en el cual el vector de virus esencial es un adenovirus mejorado tal que, en la secuencia de adenovirus, una secuencia terminal de la transcripción está insertada aguas abajo de la ITR viral y el sitio de empaquetamiento pero aguas arriba del promotor hTERT; estando delecionado el adenovirus con su secuencia codificante para 10,4K 14,5K y 14,7K en la región T3; el elemento regulador específico de células tumorales es el promotor hTERT de SEQ ID NO: 2, el gen estimulante del tumor es GM-CSF, preferiblemente el GM-CSF fijado a la membrana (KH-903).

Otro recombinante de adenovirus preferible de acuerdo con la invención es uno de este tipo en el cual una secuencia terminal de la transcripción está insertada aguas abajo de la ITR viral y el sitio de empaquetamiento de aguas arriba del promotor hTERT, y el gen adenoviral E1A y el gen E1B están unidos por IRES, el elemento regulador específico de células tumorales es el promotor hTERT de SEQ ID NO: 2, y el gen inmunoestimulador es GM-CSF (KH-906).

Los recombinantes de adenovirus conforme a la invención incluyen, pero sin carácter limitante, KH-901, KH-902, KH-903, KH-904, KH-905 y KH-906, en los cuales la secuencia para KH-901 se muestra en SEQ ID NO: 3, en donde

1) 1-103: ITR izquierda adenoviral {serotipo 5 de adenovirus de secuencia representado en Genbank No. BK000408};

2) 194-358: secuencia de empaquetamiento de adenovirus y la secuencia intensificadora para E1;

3) 362-534: secuencia señal SV40 poli(A) y el enlazador (la secuencia de serotipo 5 de adenovirus de la que se han delecionado los np 362 a 551);

4) 525-811: la secuencia del promotor hTERT mejorado genéticamente y el enlazador;

5) 812 a la derecha: secuencia de adenovirus que incluye E1A, E1B, E2, etc.;

6) 28995-29436: gen inmunoestimulador GM-CSF;

7) 29437 a la derecha: secuencia de adenovirus del gen E4 y el extremo de la derecha.

La secuencia de KH-200 es similar a la secuencia representada en SEQ ID NO: 3, mientras que su secuencia del promotor hTERT se encuentra en el tipo salvaje sin transversión de bases (se ruega referirse a SEQ ID NO: 1 y 2). No existe secuencia señal SV40 poli(A) alguna entre el sitio de empaquetamiento y el promotor hTERT.

La secuencia de KH-902 es similar a KH-901, pero el gen inmunoestimulador GM-CSF está reemplazado por su forma fijada a la membrana con la secuencia representada en SEQ ID NO: 4.

La secuencia de KH-903 es similar a KH-901, excepto que la secuencia codificante para 10,4 K, 14,5K y 14,7K ha sido delecionada, siendo la secuencia delecionada la parte del genoma adenoviral desde NT21804 a 30857. Las proteínas de estas secuencias codificantes inhiben la respuesta inmune, particularmente la respuesta inmune mediada por el factor de necrosis tumoral (TNF). Por tanto, la deleción de estas regiones codificantes mejorará las respuestas inmunes direccionadas al tumor inducidas por los adenovirus oncolíticos que se replican condicionalmente.

La secuencia de KH-904 es similar a KH-901, excepto que el botón de fibra está cambiado del serotipo 5 adenovirus al serotipo 35, representándose la secuencia en SEQ ID NO: 5. Investigaciones ulteriores han revelado que muchas células tumorales no expresan la proteína receptora CAR del serotipo 5 de adenovirus, pero expresan un alto nivel de molécula CD46. La molécula CD46 es el receptor del serotipo 35 de adenovirus. Por tanto, la presencia del botón de fibra del serotipo 35 de adenovirus mejorará la infectividad de los recombinantes de adenovirus oncolítico que se replican condicionalmente.

KH-905 es similar a KH-904 excepto que el gen inmunoestimulador GM-CSF se ha cambiado de la forma secretada a la forma fijada a la membrana.

KH-906 se produce a partir de KH-901 por reemplazamiento del promotor endógeno E1B con un sitio de entrada de ribosoma interno (Li et al., (2001) Cancer Research 62; Zhang et al. (2002) Cancer Research 62: 3743-3750).

Se proporciona también la secuencia del promotor hTERT mejorado de SEQ ID NO: 2, teniendo este promotor sitio de fijación para el factor de transcripción E2F-1.

El promotor hTERT mejorado arriba indicado se generó como sigue. Se sintetizaron dos cebadores basados en la secuencia del promotor hTERT como se muestra en la Figura 1:

A. 5'-GTCTGGATCCGCTAGCCCCACG-3'

B. 5'-CGACCGGTGATATCGTTTAATTCGC-3'

El promotor hTERT se amplificó por PCR con DNA genómico humano activado como el molde, y los cebadores fueron los arriba indicados. La condición para la reacción PCR es como sigue: para el primer ciclo, 94ºC durante 5 minutos para desnaturalización, 81ºC durante 1 minuto para reasociación, 72ºC durante 2 minutos para extensión; para cada uno de los 35 ciclos siguientes: 93ºC durante 1 minuto para desnaturalización, 68ºC durante 1 minuto para reasociación, 72ºC durante 2 minutos para extensión. El producto PCR se analizó en gel de agar y el fragmento del promotor hTERT se recuperó para confirmación por secuenciación. La secuencia se confirmó como se ha publicado (Figura 1). El DNA del fragmento PCR purificado se clonó al vector pUC19. Con el método de mutagénesis descrito por Stratagene (mutagénesis orientada), la secuencia del promotor hTERT se cambió a la representada en la Figura 2.
Esta invención proporciona también por tanto el promotor hTERT mejorado con la secuencia de SEQ ID NO: 2, que puede obtenerse por dicho método anterior.

En el promotor hTERT conforme a la invención, no existe ningún par de bases TATA conservado, pero existen dos secuencias semejantes a la caja E de CACGTG y regiones de fijación de Sp-I ricas en GC. Estas secuencias conservadoras son cruciales para la expresión de la telomerasa, dado que la transcripción de la telomerasa está regulada por el promotor hTERT a través de C-Myc/Max y Sp-I (Cong et al (1999) Human Molecular Genetics 8(1):137-142; Kyo et al (2000) Nucleic Acids Research 28(3):669-677). Muchos estudios han revelado que Myc juega un papel importante en la proliferación celular y el ciclo celular, por lo que la modificación arriba indicada del promotor hTERT causará impacto ulterior en la transcripción y expresión de la telomerasa.
Con objeto de minimizar la actividad del promotor hTERT en las células normales tales como las progenitoras y aumentar su selectividad para las células tumorales, los inventores han analizado en detalle los sitios de fijación del factor de transcripción en el promotor hTERT por modelización mediante computadora. Basándose en la modelización por computadora, los inventores han realizado análisis sobre una serie de mutagénesis, entre las cuales identificaron un mutante en el que la cuarta Sp-I se había cambiado al sitio de fijación E2F-1, habiéndose cambiado la secuencia desde '...TTTCCGCGGCCCCGGCC...' (Figura 1) a '...TTTCCGCGGCAACGCCC...' (Fig. 2).
El estudio in vitro demostró que el promotor hTERT mejorado mantiene la actividad en las células tumorales y reduce significativamente la actividad "promotora" en las células normales. Por tanto, el promotor mejorado tiene una actividad de trasncripción significativamente reducida en las células normales con inclusión de las células progenitoras. Se demostró en un experimento de transfección transitoria que utilizaba el gen consignado que, en las células tumorales, el promotor hTERT mejorado tiene una actividad aproximadamente 5 a 10 veces mayor que la del promotor hTERT de tipo salvaje, mientras que en las células normales, el promotor hTERT mejorado tiene una actividad muy reducida (Figura 6). Se construyó luego un adenovirus oncolítico de replicación condicional por control del gen viral esencial con el promotor hTERT mejorado, careciendo el virus oncolítico resultante de toxicidad para las células madre (Figura 7); por tanto el adenovirus oncolítico resultante tiene una seguridad notablemente mejorada para aplicación clínica.

Dado que el promotor E2F-1 es activo en las células tumorales deficientes en el camino pRb/E2F/p16, el mismo ha sido ampliamente utilizado en terapia génica, particularmente en la construcción de adenovirus oncolítico de replicación condicional (Parr et al. (1997) Nature Medicine 3(10):1145-1149; Jakubczak et al. (2003) Cancer Research 63:1490-1499; Bristol et al. (2003) Molecule Therapy 7(6):755-763). El promotor hTERT mejorado tiene no sólo sitios de fijación para los factores de transcripción E2F-1, sino también sitios de fijación Sp-I y NF-1 que están poseídos en el promotor E2F-1, por lo que el promotor hTERT mejorado es activo en células tumorales que están reguladas en sentido creciente por la telomerasa y son deficientes en el camino Rb. Por tanto, el promotor hTERT mejorado es activo en estas dos clases de células tumorales, pero inactivo en células normales tales como las células madre; esto representa una alta especificidad tumoral.
En una realización, la invención proporciona un recombinante de adenovirus oncolítico de replicación condicional como se reivindica en esta memoria en el cual el gen E1A y el gen E1B están ligados por un sitio de entrada de ribosoma interno (IRES) y por tanto lleva la transcripción de los dos genes importantes E1A y E1B del recombinante de adenovirus bajo el control del promotor hTERT mejorado tal como KH-906.

En una realización adicional, la invención proporciona un recombinante de adenovirus oncolítico como se reivindica en esta memoria en el cual una señal de terminación de la transcripción está ubicada aguas abajo de la ITR y el sitio

de empaquetamiento viral y aguas arriba del promotor hTERT específico de las células tumorales. La señal de terminación de la transcripción tal como SV40 poli(A) temprana puede bloquear cualquier transcripción mediada por RNA-polimerasa. Estudios in viro han demostrado que, debido a la presencia de la señal de terminación de la transcripción tal como SV40 poli(A) temprana, la ITR y la secuencia, que está solapada en el sitio de empaquetamiento y tiene efecto como intensificador, tiene sólo un impacto menor sobre el promotor hTERT.

Los recombinantes de adenovirus oncolíticos conforme a la invención tienen genes inmunorreguladores. En varios recombinantes de adenovirus oncolíticos conocidos, el gen GM-CSF se utilizó como gen inmunoestimulador, conteniendo también los recombinantes de adenovirus oncolíticos descritos en esta invención el gen GM-CSF como gen inmunoestimulador, aunque sin estar limitados al gen GM-CSF, y podrían utilizarse también otros genes inmunoestimuladores tales como citoquinas. Sin embargo, es bien conocido que GM-CSF es un inductor de respuestas inmunes de larga duración (Dranoff et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:3539-3543). Se trata de una glicoproteína secretada que puede estimular la diferenciación de granulocitos, monocitos, macrófagos y células dendríticas, y aumentar la expresión de MHC y la molécula co-estimulante B7 en las células presentadoras de antígeno. El GM-CSF puede intensificar también la infiltración de células inmunes en los tejidos y la diferenciación de las células B. Debido a la propiedad de GM-CSF arriba descrita, los científicos han utilizado en los últimos años GM-CSF en combinación con quimioterapia para el tratamiento de cánceres. Muchas vacunas tumorales constituidas por células de tumor capaces de expresar GM-CSF se encuentran actualmente en pruebas clínicas (Armitage (1998) Blood 92:4491-4508; Mach et al. (2000) Cancer Research 60:3239-3246; Gilboa (2004) Nature Reviews Cancer 4:401-411). Un adenovirus oncolítico de replicación condicional que expresa GM-CSF puede no sólo destruir las células del cáncer, sino expresar también GM-CSF en células tumorales para inducir respuestas inmunes específicas de células tumorales, dando como resultado efectos de inmunoterapia del cáncer. Por consiguiente, este proceso de establecimiento de una vacuna tumoral autóloga no sólo ha eliminado el proceso complicado de preparación de una vacuna tumoral, sino que mantiene también la alta integridad de las células tumorales sin manipulación in vitro, con inclusión de la expresión de antígeno, que ha hecho más eficaz la vacuna del cáncer in situ. Por consiguiente, el virus oncolítico arriba descrito puede destruir las células tumorales en el sitio en el que se suministra el virus y destruirá también al mismo tiempo las células tumorales distantes por respuestas inmunes mediadas por GM-CSF. El método de la invención descrito en esta memoria es un enfoque singular de producción de virus oncolíticos mejores.

Dos recombinantes de adenovirus oncolíticos, entre los que están conformes con la invención, contienen y expresan el GM-CSF fijado a la membrana (mbGM-CSF). Estudios previos han revelado que GM-CSF fijado a la membrana puede mejorar la interacción con células dendríticas e inducir respuestas inmunes mejores que el GM-CSF secretado. (Soo Hoo et al. (1999) Journal of Immunology 169:7343-7349; Yei et al. (2002) Gene Therapy 6:1302-1311). No se ha publicado que el GM-CSF fijado a la membrana se exprese en un recombinante de adenovirus oncolítico de replicación condicional a fin de obtener un ingrediente activo recombinado genéticamente.
Esta invención proporciona también un método de producción de recombinantes de virus oncolíticos como se reivindica en esta memoria, que comprende los pasos siguientes:

a) construir la rama izquierda de adenovirus que contiene la secuencia promotora hTERT de SEQ ID NO: 2;

b) construir la rama derecha de adenovirus que contiene el gen inmunorregulador; y

c) co-transfectar los plásmidos que contienen la rama derecha y la rama izquierda del genoma adenoviral en células 293, células HeLa, células HeLa-S3 o células A549, generándose el recombinante por recombinación homóloga.

El recombinante de la invención puede obtenerse por el proceso siguiente: se produce el recombinante viral en células de mamífero por recombinación homóloga. En primer lugar, el promotor endógeno del gen E1A se deleciona de pXC.1 (un plásmido que contiene el extremo izquierdo del serotipo 5 de adenovirus, adquirido de Microbix, Canadá) y se reemplaza con la señal de terminación SV40 poli(A) y el promotor hTERT mejorado por técnicas de clonación comunes, dando como resultado pKH-901ª. Entretanto, la secuencia codificante de gp19K en pBHGE3 (un plásmido que contiene la porción derecha de adenovirus, adquirido de Microbix, Canadá) se reemplaza con el gen GM-CSF, dando como resultado un plásmido denominado pKH-901b.

El DNA plasmídico de pKH-901ª y pKH-901b se somete a co-transfección en células HeLa, seleccionándose un clon individual de la formación de placas y designándose KH-901. Siguiendo el mismo procedimiento, se construyeron los recombinantes KH-900, KH-902, KH-903, KH-904, KG-905 y KH-906.

De hecho, los recombinantes pueden producirse en cualesquiera células de mamífero o de animal no mamífero.

Siguiendo el plan arriba reseñado, un fragmento de DNA de nucleótido se amplificó por PCR a 362 hasta 551 de pXC.1 respectivamente con las endonucleasas de restricción SspI y PinAI (AgeI). El fragmento de DNA del promotor hTERT se amplificó a partir de DNA genómico humano por PCR, ligado a poli(A). Se añadieron dos endonucleasas de restricción SspI y PinAI a los dos extremos del fragmento de DNA. El fragmento de DNA se digirió con SspI y PinAI y se ligó a pXC.1 que se digirió con la misma enzima. La ligación se transformó en células de E. coli DH5-alfa

(Invitrogen EE.UU.). Se seleccionaron 10 colonias, y se cultivaron en una incubadora durante 24 horas. Se extrajo el DNA y se analizó con enzimas de restricción, y el plásmido se confirmó por secuenciación y se designó pKH-901ª.

Utilizando los cebadores de 5'-ATAACCATGTGGCTGC-3' y 5'-AAATTACTCCTGGACTGG-3', se amplificó un fragmento de DNA que codificaba GM-CSF por PCR a partir del cDNA molde extraído de macrófagos activados. El gen GM-CSF de longitud total se clonó en pUC19 y se confirmó por secuenciación. Subsiguientemente, el fragmento de cDNA del gen GM-CSF se clonó en pBHGE3 en la región codificante para gp19k, y el plásmido resultante, designado HK-901b, se secuenció y se confirmó por análisis con enzimas de restricción.

El DNA plasmídico de pKH-901ª y pKH-901b se co-transfectaron en células HeLa para recombinación homóloga. Antes de la transfección, el DNA plasmídico se linealizó por ClaI y se transfectó en células HeLa mediadas por Lipofectina (USA, Invitrogen). Diez días después de la transfección, se cosecharon las células, y se realizaron tres ciclos de congelación-descongelación, tomándose 100 ml para extensión en placas sobre células HeLa. Ocho días después de la formación de las placas, las placas aisladas eran visibles bajo el agar. Se seleccionaron 6 placas, y se inocularon en células HeLa. El lisado de células se cosechó 4 a 6 días después de la inoculación. Se extrajo el DNA adenoviral a partir del lisado de células (kit de Qiagen), y se confirmó la estructura viral por digestión con enzimas de restricción, PCR y análisis por transferencia Southern. El virus resultante se designó KH-901.

El recombinante vírico conforme a la invención puede utilizarse para preparar una composición farmacéutica para el tratamiento de cánceres y/o para prevención de cánceres. El recombinante vírico puede utilizarse en combinación con radiación y quimioterapia para conseguir mejor eficacia terapéutica.

El recombinante vírico conforme a la invención puede formularse en composiciones inyectables para administración intravenosa, inyección intratumoral, inyección intramuscular, inyección subcutánea, inyección intra-orgánica, inyección intraperitoneal, etc.

Para preparación en gran escala, el recombinante vírico de la invención puede fabricarse en células HeLa, células HeLa-S3 o células A549 por cultivo de células, infección de virus, propagación, concentración, y purificación. El recombinante vírico fabricado por este proceso puede utilizarse como materia prima para formulación en composiciones clínicamente inyectables, junto con portadores farmacéuticamente aceptables por tecnología convencional de formulación.

Experimentos que muestran la aplicación potencial y los efectos favorables de la presente invención se describen a continuación:

**Experimento 1:** Actividad del promotor hTERT y comparación de la especificidad de células tumorales entre el tipo salvaje y los promotores hTERT mejorados

Para testar la especificidad de la versión mejorada del promotor hTERT, se ligaron el promotor hTERT de tipo salvaje (telo) y el promotor hTERT mejorado (Mtelo) a una Luciferasa de gen informador (luc), y los plásmidos resultantes se transfectaron a un panel de células de cáncer humanas y células humanas normales. Las células se cosecharon 48 horas después de la transfección y se utilizaron los lisados de células para determinar el nivel de expresión de luciferasa. Durante la transfección, se utilizó un plásmido informador LacZ de gel informador secundario para normalizar la eficiencia de transfección entre diferentes tipos de células. El resultado presentado en Fig. 6 demostró que (1) en las células tumorales, el promotor mejorado Mtelo exhibía una actividad de luciferasa mucho mayor que lo hacía el promotor hTERT de tipo salvaje (telo). Por ejemplo, en células Hep3B (telomerasa regulada en sentido creciente y deficiente en el camino Rb), Mtelo producía una actividad de luciferasa 6 veces mayor que la de telo, y en células LNCaP (telomerasa regulada en sentido creciente y deficiente en el camino Rb), Mtelo producía 0una actividad de luciferasa 18 veces mayor que la del promotor hTERT de tipo salvaje; (2) en las células humanas normales, el promotor hTERT de tipo salvaje conducía a un nivel bajo de actividad de transcripción, mientras que el promotor hTERT mejorado Mtelo tenía sustancialmente un nivel de actividad de transcripción básico. Por ejemplo, en células MRC-5 (negativas a la telomerasa y normales para el camino Rb), el promotor Mtelo exhibía una actividad 6 veces menor que la del promotor hTERT telo de tipo salvaje. Este resultado indicaba que la adición de los sitios de fijación E2F tiene una selectividad para las células tumorales y capacidad de transcripción notablemente incrementadas del promotor hTERT.

Esta conclusión se confirmó ulteriormente por los tests, en los cuales la selectividad mejorada del promotor hTERT mejorado, la actividad de transcripción del promotor se determinó en las células infectadas con recombinantes por medida del número de copias del mensaje E1A. Se incluyeron en el estudio cuatro virus: adenovirus de tipo salvaje como control positivo, adenovirus deficiente en replicación d1312 (delecionado de E1A) como control negativo, KH-900 (con el promotor hTERT de tipo salvaje) y KH-901 (con el promotor hTERT mejorado). Se utilizaron para los tests queratinocitos de prepucio humano (hFKs) y kFKs-E6, las células hFK transformadas con el gen E6 del virus del papiloma humano tipo 16 (HPV-16). Se había demostrado previamente que hFKs-E6 tenían actividad de telomerasa regulada en sentido creciente (Horikawa et al. (2001) Journal of Virology 75 (9): 4467-4472). Las células se infectaron con los virus a una multiplicidad de infección (MOI) de 1 unidad formadora de placa (pfu) por célula y se determinó el número de RNA de mensaje E1A por PCR de transcripción inversa (RT-PCR). El resultado presentado en Fig. 7 demostró que no se detectaba cantidad alguna de mRNA de mensaje E1A en las células hFKs

infectadas con d1312 y hFKs-E6; se detectaron aproximadamente 4000 copias de RNA de mensaje E1A en células infectadas con Ad5 y no había diferencia significativa alguna en las copias de mRNA entre las células hKFs y las células hFKs-E6. En cambio, en las células infectadas con KH-900, se detectó un pequeño número de copias de mRNA E1A en las células hGKs, mientras que se detectaron 20 veces más copias de mRNA E1A en las células hFKs-E6. Y lo que es más interesante, se detectó una cantidad más de 100 veces mayor de mRNA E1A en las células hKFs-E6 infectadas con KH-901 que en las células hFKs. Entretanto, el número de copias de mRNA E1A era aún menor en las células hFKs infectadas con KH-901 que en las células hFKs infectadas con KH-900. Considerado en su conjunto, se demuestra que el promotor Mtelo, cuando está enlazado con un gen informador, tiene un nivel mayor de actividad y selectividad para las células tumorales que la del promotor telo; al mismo tiempo, la selectividad tumoral mejorada es real cuando el promotor se inserta en el genoma del adenovirus. El promotor Mtelo tiene mejor especificidad tumoral que el promotor de tipo salvaje cuando aquél se utiliza para controlar los genes virales esenciales.

Este resultado se confirmó adicionalmente en células de médula ósea humana cultivadas. En un ensayo de viabilidad celular, se utilizaron KH-900 y KH-901 para infectar células 293 y células madre mesenquimáticas de médula ósea humana (hBMsc) a MOI de 1. El resultado presentado en Fig. 8 demostró que KH-901 destruía las células 293 tan eficientemente como KH-900; sin embargo, KH-900 tenía cierto nivel de destrucción celular en células hBMsc, mientras que KH-901 no tenía actividad de destrucción alguna.

**Experimento 2:** Comparación de la Capacidad de Destrucción de Células Tumorales de Cuatro Recombinantes de Adenovirus Oncolíticos que se Replicaban Condicionalmente

Se utilizó la línea de células de cáncer de pulmón A549 para comparar la capacidad de destrucción de cuatro adenovirus oncolíticos que se replicaban condicionalmente. Se sembraron las células en cápsulas de 6-cem y se aplicaron los virus a una MOI de 1 cuando las células se dejaron crecer hasta 85% en confluencia. Se determinó la viabilidad celular en diversos momentos después de la infección (*Hallenbeck et al. (1997) Human Gene Therapy 11:1172-1179*). El resultado presentado en Fig. 9 demostró que KH-904 destruía las células más eficientemente que KH-901 y KH-902, mientras que KH-900 era el más débil.

Este resultado indicaba que el promotor hTERT mejorado tiene actividad más fuerte que el promotor hTERT de tipo salvaje. Indicaba también que el reemplazamiento del botón en el gen de fibra del serotipo 35 puede tener mejor inefectividad que el serotipo 5. Esta conclusión se confirmó en un panel de células de cáncer y células humanas normales (Tabla 1). Un panel de células humanas tumorales y normales se infectó con variantes diferentes de adenovirus durante 72 horas y se midió la viabilidad celular como se ha descrito arriba. Se calculó la EC50 para la cantidad de virus requerida para destruir el 50% de las células. Cuanto menor es la EC50, tanto más eficiente es un virus para destruir las células. El resultado presentado en la Tabla 1 indicaba que (1) KH-901 destruía las células tumorales más eficientemente que KH-900, lo que confirmaba adicionalmente que el promotor hTERT mejorado tiene mejor especificidad tumoral; (2) KH-902 y KH-903 destruían las células análogamente a KH-901, mientras que KH-904 era el más fuerte. En contraste, el promotor Mtelo mejorado que contenía los virus (KH-901, KH-902, KH-903 y KH-904) destruía menos células normales comparado con KH-900, teniendo el virus el promotor hTERT de tipo salvaje. Para KH-906, en el cual el gen viral E1B estaba enlazado a E1A por el IRES, tenía una especificidad satisfactoria para las células tumorales, aunque la capacidad de destrucción era relativamente menor.

Tabla 1. Expresión de GM-CSF en células infectadas con KH-901

| Célula | Unidad infectada con KH-901/célula | ELISA (ng/$10^6$ células/24horas) | Bioensayo (ng/$10^6$ células/24horas) |
|---|---|---|---|
| LNCaP | 10 | 231±21 | 195±34 |
| LNCaP | 1 | 30±9 | 15±4 |
| Hep3B | 10 | 422±13 | 355±44 |
| Hep3B | 1 | 94±6 | 85±12 |
| SW680 | 10 | 527±19 | 325±44 |
| SW680 | 1 | 214±4 | 135±21 |
| A549 | 10 | 748±17 | 625±94 |
| A549 | 1 | 83±2 | 55±24 |
| HeLa | 10 | 120±11 | 105±56 |
| HeLa | 1 | 9±1 | 2±0,3 |
| hFKs | 10 | 5±0,25 | 3,5±0,4 |

| Célula | Unidad infectada con KH-901/célula | ELISA (ng/$10^6$ células/24horas) | Bioensayo (ng/$10^6$ células/24horas) |
|---|---|---|---|
| hFKs | 1 | indetectable | indetectable |

Tabla 2. EC50 de KH-900, KH-901, KH-902, KH-903, KH-904, y KH-906

| Célula | KH-900 | KH-901 | KH-902 | KH-903 | KH-904 | KH-906 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| LoVo | 1,25 | 0,92 | 0,85 | 0,97 | 0,35 | 1,01 |
| A549 | 0,58 | 0,19 | 0,28 | 0,49 | 0,08 | 0,39 |
| LNCaP | 2,31 | 0,22 | 0,36 | 0,15 | 0,01 | 1,75 |
| Hep3B | 4,03 | 0,31 | 0,53 | 0,71 | 0,03 | 1,71 |
| HeLa | 3,85 | 0,62 | 0,55 | 0,73 | 0,25 | 0,89 |
| SW620 | 2,04 | 0,20 | 0,34 | 0,23 | 0,04 | 2,53 |
| CA-33 | 3,40 | 1,15 | 1,17 | 0,75 | 0,20 | 3,15 |
| HepG2 | 0,91 | 0,37 | 0,41 | 0,97 | 0,21 | 1,17 |
| SCC4 | 9,21 | 2,10 | 3,28 | 2,30 | 0,61 | 8,10 |
| HUVEC | 27,9 | 99,3 | 130,4 | 83,5 | 70,6 | 268,3 |
| BJ | 60,8 | 295,4 | 260,5 | 75,4 | 1801,8 | 435,4 |
| RPE | 35,4 | 231,7 | 295 | 431,7 | 295,3 | 531,7 |
| WI38 | 46,5 | 92,33 | 79,5 | 82,33 | 69,2 | 192,33 |
| MRC5 | 51,54 | 121,20 | 135,84 | 91,20 | 61,74 | 266,23 |

Es sumamente interesante que, para la célula humana normal, los recombinantes virales que se han modificado por ingeniería genética para incluir el promotor Mtelo genéticamente mejorado, que incluyen KH-901, KH-902, KH-903, KH-904, muestran todos ellos una capacidad de destrucción mucho más débil (indicada por una EC50 mayor) que KH-900, que se ha modificado genéticamente para incluir el promotor hTERT de tipo salvaje.

Adicionalmente, los recombinantes de adenovirus KH-906, en los cuales se había insertado un sitio de entrada de ribosoma interno entre los genes E1A y E1B, y por consiguiente la transcripción de los genes E1A y E1B se encuentra bajo el control del promotor Mtelo mejorado, han demostrado una mayor selectividad para las células tumorales que los otros recombinantes virales, aunque su capacidad de destrucción frente a las células tumorales era algo más débil que la de los otros.

**Experimento 3:** KH-901 produce un alto nivel de GM-CSF biológicamente activo en células tumorales

Se infectaron 5 líneas de células tumorales y una línea de células humanas normales con KH-901 a una MOI de 1 ó 10. 48 horas después de la infección, se cosecharon las células para determinación de la concentración de GM-CSF por ELISA y el ensayo TF-1 como se ha descrito previamente (*Li et al. (2001) Cancer Research 61: 6428-6436)*. El resultado presentado en Fig. 14 demostraba que 5 células tumorales infectadas con KH-901 producían un nivel elevado de GM-CSF. Por ejemplo, en células LNCaP infectadas con KH-901, la cantidad de MG-CSF detectada en las células era 231 ng/$10^6$ células/24 horas. En contraste, había un nivel muy bajo de GM-CSF detectable en las células humanas normales infectadas con KH-901. El bioensayo reveló adicionalmente que el GM-CSF expresado en las células tumorales era biológicamente activo (véase por favor la **Tabla 2**).

**Experimento 4:** Eficacia anti-tumoral de los recombinantes de adenovirus oncolítico en modelos de tumor

Se evaluó la eficacia antitumoral de adenovirus oncolíticos en el modelo de tumor LNCaP de cáncer de próstata del ratón lampiño. Se inocularon 6 millones de células LNCaP subcutáneamente en ratones lampiños y se inyectaron los virus 3 veces por vía intratumoral los días 1, 5 y 9 a una dosis de 3 x $10^{10}$ partículas de diversos virus (KH-901, KH-904 y add11520, un adenovirus oncolítico delecionado en E1B-p55) cuando el volumen del tumor alcanzó 200 $mm^3$ en el transcurso de 4 semanas. El volumen del tumor se midió dos veces por semana y el resultado se presenta en Fig. 10.

En este test, se utilizaron tres recombinantes, a saber, KH-901, KH-904 y KH-907 (no representado, el mismo que KH-901 pero sin el gen GM-CSF), para inyección del tumor; se testó también Add 1520 como control.

Como puede verse por Fig. 10, el tumor crecía muy rápidamente para el tratamiento con placebo, alcanzando el volumen del tumor en 48 días 1200% de la línea base. En el grupo tratado con KH-901, el tumor se mantiene igual que la línea base, mientras que los tumores tratados con KH-904 se reducían en volumen hasta el 15% de la línea base. Durante el mismo periodo de tiempo, los tumores tratados con add 11520 habían crecido hasta el 850% de la línea base.

Este resultado indicaba que KH-901 y KH-904 tenían mejor actividad antitumoral que Add 11520 (Onyx-015). Es interesante, como se demostró en el estudio in vitro, que KH-904 tenía mejor eficacia anti-tumor que KH-901.

En el mismo estudio, se documentó también la expresión de GM-CSF. No se detectó cantidad alguna de GM-CSF en los animales tratados con KH-907 y add 11520, mientras que era detectable un nivel elevado de GM-CSF en los animales tratados con KH-901 o KH-904. Por ejemplo, el día 14, la cantidad de GM-CSF detectada en los animales tratados con KH-901 o KH-904 era 2322 g/ml o 2776 g/ml, respectivamente. Este resultado sugería que el virus oncolítico KH-901 y afines producían GM-CSF no sólo en células tumorales, sino también una alta expresión in vivo en los animales portadores de tumor.

Los resultados de estos estudios muestran la replicación de KH-901 y afines en una diversidad de células tumorales que se detectan niveles elevados de expresión de GM-CSF después de la infección.

Los otros adenovirus oncolíticos arriba descritos se caracterizaron también siguiendo un procedimiento similar, y se describirán con mayor detalle en los ejemplos respectivos.

Los adenovirus oncolíticos recombinantes replicantes descritos en esta memoria tienen las características siguientes:

1. Características estructurales

Estos recombinantes son virus vivos, y pueden replicarse y propagarse en células tumorales. Los mismos son diferentes de los medicamentos sintetizados y modificados por ingeniería genética. Son capaces de replicarse en células tumorales, expresan genes extraños y tienen actividad biológica y actividad antitumoral elevadas. Estos recombinantes tienen genes inmunoestimuladores, por lo que el gen inmunoestimulador puede expresarse en las células infectadas por el virus e inducir respuestas inmunes específicas de las células tumorales. Los mismos son seguros debido a la presencia de un elemento regulador específico del tumor.

2. Posibles Aplicaciones

Los elementos reguladores específicos de tumor en los virus recombinantes son activos en más del 90% de las células tumorales, es decir, en la mayoría de las células tumorales, el gen crítico de estos virus recombinantes se encuentran bajo el control del promotor específico del tumor, por lo que estos virus recombinantes pueden replicarse en la mayoría de las células tumorales y destruirlas. Así, estos virus recombinantes tienen diversas aplicaciones potenciales, que incluyen el tratamiento de cáncer de cabeza y cuello, cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer de próstata, cáncer de vejiga, cáncer de estómago, y cáncer de hígado, etc.

Dado que estos virus recombinantes tienen el gen inmunoestimulador como se ha descrito arriba, los virus no sólo tendrán efectos oncolíticos por destrucción de las células tumorales, sino que estimularán también las respuestas inmunes específicas del tumor después de la expresión de la citoquina en las células tumorales. Así, estos virus no sólo serán eficaces para tumores locales, sino que serán eficaces también para células tumorales distantes.

Los virus recombinantes descritos en esta memoria tienen las características siguientes: 1) son más específicos para las células tumorales, mientras que no son infecciosos para las células somáticas normales, y las células madre; por tanto, estos virus pueden tener menos efectos secundarios en aplicación clínica; 2) expresan el gen inmunoestimulador, con inclusión de las formas secretadas y fijadas a la membrana. Esta citoquina estimulará respuestas inmunes específicas del tumor, por lo que los mismos pueden ser eficaces también para tumores distantes; 3) por la modificación a la cápsida viral, estos adenovirus tienen mejor inefectividad celular, por lo que pueden tener mejor actividad antitumoral.

Esta invención aporta la contribución siguiente:

1) Por modificación mediante mutagénesis direccionada, el promotor hTERT del elemento regulador específico del tumor tiene mayor actividad de transcripción y especificidad tumoral, el promotor resultante tiene mejor capacidad de direccionamiento, tiene una actividad de transcripción significativamente reducida del gen enlazado en las células somáticas normales, especialmente en las células sexuales, los progenitores y las células madre. Los adenovirus oncolíticos, cuyo gen crítico se encuentra bajo el control del promotor hTERT mejorado, no pueden replicarse en las células de la médula ósea, pero es sumamente potente en muchas células tumorales.

2) El GM-CSF inmunoestimulador se ha modificado por ingeniería genética en los adenovirus recombinantes, de tal modo que GM-CSF se expresará únicamente en las células infectadas por el virus. Un virus de este tipo puede destruir las células tumorales por efectos oncolíticos después de inyección intratumoral, entretanto, después de la lisis oncolítica, las células infectadas por el virus expresan GM-CSF, que estimula respuestas inmunes fuertes contra las células tumorales. Particularmente, GM-CSF que expresa un adenovirus oncolítico tendrá también efecto de prevención debido a que el virus instruirá el sistema inmune del paciente por la combinación de efecto oncolítico (destrucción de las células y presentación de antígeno) y respuesta inmune por instrucción de las células inmunes del paciente. Por tanto, un virus de este tipo puede ser capaz de prevenir la recurrencia de tumores en el paciente.

3) Por la modificación de la cápsida, el adenovirus oncolítico recombinante resultante tiene mejor infectividad tumoral. Debido a la expresión nula o baja del receptor de adenovirus CAR del serotipo 5 de adenovirus, es muy frecuente que el Ad5 no pudiera infectar satisfactoriamente la célula tumoral. En cambio, cuando el genoma de Ad5 se incorpora con el sitio de fijación y la secuencia para el receptor del serotipo 35 de adenovirus, la infectividad para la mayoría de las células tumorales puede incrementarse notablemente. Estudios in vitro e in vivo han confirmado esta observación.

**Descripción de las secuencias en el Listado de Secuencias**

SEQ ID NO: 1 es un fragmento de pb que contiene secuencias del promotor TERT humano, que tiene varios sitios de fijación de factores de transcripción que incluyen SP-1 (cajas GC), Cajas E (el sitio de fijación para Myc), NF-1 (el sitio para fijación del factor NF).

SEQ ID NO: 2 es un promotor TERT humano mejorado por mutagénesis, que tiene una mayor selectividad y actividad de transcripción para las células tumorales; E2F-1: sitio de fijación del factor de transcripción E2F.

SEQ ID NO: 3 es una secuencia para la longitud total de KH-901, en la cual

1) 1-103: ITR del lado izquierdo de adenovirus {secuencia del serotipo 5 de adenovirus, representada en GenBank NO. BK000408};

2) 194-358: secuencia de empaquetamiento de adenovirus y la secuencia intensificadora para E1;

3) 362-534: secuencia señal de SV40 poli(A) y enlazador (la secuencia del serotipo 5 de adenovirus de la que se han delecionado los nucleótidos 362 a 551);

4) 525-811: las secuencias del promotor hTERT mejorado y el enlazador;

5) 812 a la derecha: secuencia de adenovirus que incluye E1A, E1B, E2, etc.;

6) 28995-29436: gen GM-CSF inmunoestimulador humano;

7) 29437 a la derecha: secuencia de adenovirus que incluye el gen E4 y el extremo de la derecha;

SEQ ID NO: 4 es un elemento inmunorregulador GM-CSF en forma fijada a la membrana (mbGM-CSF), contenido en el genoma del recombinante.

SEQ ID NO: 5 es una secuencia de proteína de fibra quimérica en el genoma del recombinante KH-904, en la cual el botón de fibra del gen de fibra es el serotipo 35 de adenovirus humano.

**Breve Descripción de los Dibujos**

**Fig. 1** representa la secuencia del promotor de transcriptasa inversa de la telomerasa humana y sitios de fijación para factores de transcripción. SP-1 (cajas GC): sitios de fijación de SP1, cajas E: sitio de fijación Myc, NF-1: sitio de fijación NF.

**Fig. 2** representa el promotor TERT humano mejorado por mutagénesis, que tiene una mayor selectividad para las células tumorales y actividad de transcripción inversa; E2F-1: sitio de fijación del factor de transcripción E2F.

**Fig. 3-1** y **Fig. 3-2:** representan las estructuras de los recombinantes conforme a la invención.

**Fig. 4-1, Fig. 4-2 y Fig. 4-3**: representa el proceso de generación de la variante de adenovirus recombinante KH-901.

**Fig. 5** muestra los detalles de construcción del recombinante KH-901.

**Fig. 6** muestra la actividad promotora para el promotor hTERT de tipo salvaje (telo) y los promotores mhTERT mejorados (Mtelo).

**Fig. 7** muestra la expresión de RNA del mensaje E1A del adenovirus recombinante en células hFK y hKFs-E6, que es capaz de transformar el gen HPV E6.

**Fig. 8** muestra la actividad citolítica de adenovirus recombinantes para las células madre mesenquimáticas normales de la médula ósea humana.

**Fig. 9** muestra la actividad citolítica de adenovirus recombinantes en células A549 (% de viabilidad celular).

**Fig. 10** muestra la eficacia anti-tumoral en el modelo de xenoinjerto LNCaP de cáncer de próstata después de inyección intratumoral de adenovirus recombinantes.

**Realizaciones Específicas**

Se proporcionan los ejemplos siguientes que sirven para describir adicionalmente los detalles de la invención, lo cual no representará limitación alguna de esta invención.

**Ejemplo 1:**

1. Construcción del recombinante KH-901 de adenovirus oncolítico replicante y su análisis (Figura 4 y Figura 5).

2. Conforme a la secuencia del promotor hTERT representada en Figura 1, se sintetizaron los dos cebadores siguientes:

A. 5'-GTC TGG ATC CGC TAG CCC CAC G-3'
B. 5'-CGA CCG GTG ATA TCG TTT AAT TCG C-3'

Para la amplificación del promotor hTERT por el método PCR, en el que se utilizó como molde RNA humano activado. Las condiciones para la reacción PCR eran como sigue: para el primer ciclo, desnaturalización a 94ºC durante 5 minutos, reasociación a 81ºC durante 1 minuto y 72ºC para extensión durante 2 minutos. Para cada uno de los ciclos sucesivos, desnaturalización a 93ºC durante 1 minuto, seguido por sometimiento a análisis en gel de agar y recuperación del fragmento promotor hTERT. Se indicó por secuenciación que el fragmento promotor obtenido es el mismo que el descrito (Fig. 1). Este fragmento de DNA se clonó luego en el vector pUC19, y se modificó el mismo a la secuencia que se muestra en Fig. 2 por mutagénesis con ayuda de un kit de Stratagene (Stratagene, CA).

3. La secuencia señal poli(A) se amplificó por PCR con los cebadores siguientes:

A. 5'-TAATATTTGTCTAGGGCCGCGGGGGATCTCTGC-3'
B. 5'-GGATCCAGACATGATAAGATACATTGAGAG-3'

en donde se utilizó Pcmv/CERO (Invitrogen, EE.UU.) como molde, y las condiciones para la reasociación durante la reacción PCR eran las mismas que anteriormente. El fragmento PCR se purificó y confirmó por secuenciación.

4. El fragmento promotor hTERT purificado y el fragmento de DNA poli(A) se desnaturalizaron juntos a 95ºC durante 5 minutos y se enfriaron a la temperatura ambiente como molde. Un fragmento de DNA que tenía aproximadamente 500 pares de bases se amplificó con los cebadores A y D, y el fragmento PCR purificado y secuenciado se digirió con SspI y AgeI, y el fragmento ulteriormente purificado que contenía la secuencia señal poli(A) y el promotor hTERT se utilizó para el proceso de clonación subsiguiente.

5. Se utilizó pXC.1 (adquirido de Microbyx, Canadá) como molde y se añadieron dos sitios de enzima en el nucleótido 339 (SspI) y 551 (PinAI) por mutagénesis. El pXC.1 mutado se digirió con SspI y PinAI y se purificó, con el fragmento grande como vector. El fragmento poli(A)/hTERT tal como se insertó se ligó con el vector pXC.1, y se transformó en E. coli DH5 por técnicas comunes de clonación después de 20 horas. Después de una incubación a 4ºC durante 30 minutos, choque térmico a 42ºC durante 30 segundos, e incubación ulterior a 4ºC durante 2 minutos, se cultivó luego el mismo a 37ºC durante 45 minutos con 1 ml de solución de cultivo LB. Se desplazó luego a una placa de cultivo de agar que contenía ampicilina para cultivo durante 24 horas; se seleccionaron las bacterias individuales utilizando palillos de dientes esterilizados y se desplazaron a un frasco de cultivo limpio que contiene 1 ml de LB durante 24 horas. El DNA plasmídico se purificó a partir de E. coli cultivado y confirmó la estructura por digestión enzimática, designándose pKH-901ª. Este proceso contiene la ITR del lado izquierdo, la señal de empaquetamiento, la secuencia poli(A), el promotor hTERT (Mtelo), E1A, y E1B parcial.

6. Construcción del extremo derecho del adenovirus

Vector pGEM-7 (disponible de la sociedad Promega). Se utilizaron luego los dos pares de cebadores para amplificar dos fragmentos de DNA:

C. 5'-AACCAAGGCGAACCTT-3'
D. 5'-CCACATGGTTATCTTGG-3'
E. 5'-CCAGTCCAGGAGTAATTTAC-3'
F. 5'-TGCGCTTTAGGCAGCAGATG-3'

Para clonar el gen GM-CSF, se utilizaron los cebadores siguientes:

M. 5'-CCACCCAAGATAACCATGTGGCTGC-3'

N. 5'-AACTTAGTAAATTACTCCTGGACTGG-3'.

Una gran cantidad de fragmento de cDNA del GM-CSF se amplificó a partir del molde de cDNA preparado partiendo de los macrófagos activados por PCR con una condición de amplificación similar a la arriba descrita. La secuencia del cDNA se confirmó por secuenciación subsiguiente a purificación, el fragmento de cDNA se mezcló con dos fragmentos de DNA amplificados a partir de pBHGE3 como molde para amplificación ulterior por PCR con los cebadores E y H a fin de producir un gran fragmento de DNA. La secuencia de este fragmento de DNA resultante se confirmó por secuenciación, y el fragmento de DNA se clonó en el vector pGEM-7 después de digestión con BsiWI y NotI, se ligó subsiguientemente a pBHGE3, dando como resultado un plásmido pKH-901b. Este plásmido del extremo izquierdo contiene la mayor parte del gen E1B, el gen E2 entero, los genes E3 enteros, el gen GM-CSF y el gen E4.

7. Construcción del adenovirus recombinante KH-901

Se linealizaron DNAs plasmídicos pKH-901ª y pKH-901b con las endonucleasas de restricción NdeI y ClaI, y se co-transfectaron en células HeLa (con transfectina de Invitrogen) después de purificación del DNA plasmídico. Las células se cosecharon después de incubación a 37ºC durante 10 días. Se tomaron 100 µl de sobrenadante para ensayo en placa después de 3 ciclos de congelación/descongelación. Se observaron las placas individuales bajo agar de punto de fusión bajo 8 a 12 días después de la adición del sobrenadante. Se seleccionaron 10 µl de líquido bajo el agar por 10 µl de auto-pipeteman y se añadieron a las células HeLa previamente sembradas. Se observó el lisado de células y se recogió 4 a 8 días después de la inoculación. Se utilizaron 200 µl del lisado de células para extracción del DNA. La estructura viral se confirmó por PCR y transferencia Southern. Las placas individuales se purificaron ulteriormente en células HeLa y se cultivaron en células HeLa para stock de virus. El stock de virus se guardó a -80ºC en un congelador. Se tomó una parte alícuota de stock de virus para confirmación de la secuenciación, y el virus se designó KH-901.

El método para producción en gran escala de KH-901 se describirá por separado; sin embargo, se indica aquí abreviadamente. Se cultivaron células HeLa-S3 (las células HeLa se adaptaron para ser capaces de crecer en medio exento de suero) en un biorreactor de 3 litros, cuando el número de células alcanza 3 millones por litro, se infectaron las células con KH-901, y se continuó el cultivo durante 2-3 días. Se cosecharon luego las células y se purificó el virus por purificación en gradiente de CsCl2 o columna de intercambio iónico. El producto purificado se guardó en tampón apropiado tal como PBS y glicerol.

**Ejemplo 2 (ejemplo comparativo)**

Se construyó KH-900 siguiendo una rutina similar a la empleada para KH-901, excepto que no estaba contenida cantidad alguna de poli(A) en el plásmido pKH-901ª ni cantidad alguna de mutante en el fragmento promotor hTERT; la secuencia es la misma que la de SEQ. ID NO: 1. El plásmido resultante se designa pKH-900ª; se co-transfectó pKH-900ª con pKH-901b en células HeLa para generar KH-900.

**Ejemplo 3**

Para la construcción de KH-902, el cDNA de GM-CSF en pKH-901b con la versión fijada a la membrana como se muestra por SEQ. ID NO: 4, dando como resultado pKH-902b. Se co-transfectaron pKH-901ª y pKH-902b en células HeLa para generar KH-902.

**Ejemplo 4**

Para producción de KH-903, se delecionaron las regiones codificantes para 10,4 k, 14,5 k y 14,7 k en pKH-901b por método convencional de ingeniería genética, dando como resultado un plásmido denominado KH-903b. Se co-transfectaron pKH-901ª y pKH-903b en células HeLa para generar KH-903.

**Ejemplo 5**

Para producción de KH-904, el botón del gen de fibra, es decir el serotipo 5 de adenovirus se reemplazó con el botón del serotipo 35 de adenovirus, como se muestra en SEQ. ID NO: 5, dando como resultado un plásmido designado pKH-904b.

**Ejemplo 6**

Para producción de KH-905, el cDNA del gen GM-CSF en pKH-904b se reemplazó con la versión fijada a la membrana, como se muestra en SEQ. ID NO: 4, dando como resultado un plásmido designado pKH-905b. Se co-transfectaron pKH-901ª y pKH-905b en células HeLa para generar KH-905. La estructura viral se confirmó por PCR y secuenciación.

**Ejemplo 7**

Para generar KH-906, el promotor endógeno para E1B se reemplazó con la señal de entrada de ribosoma interno, dando como resultado un plásmido designado pKH-906ª. Se co-transfectaron pKH-906ª y pKH-901b en células HeLa

para generar KH-906 (Li et al. (2001) Cancer Research 62: 2667-2674). La estructura viral se confirmó por PCR y secuenciación.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Chengdu Kanghong Biotechnologies Co., Ltd.

<120> Construcción de recombinante de adenovirus oncolítico que expresa específicamente el factor inmunomodulador GM-CSF en células tumorales y usos del mismo

<130> 489.48.93546

<140> 04797352.4
<141> 19-11-2004

<150> CN20041046237
<151> 07-06-2004

<160> 5

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1
<211> 252
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 1

ctagccccac gtggcggagg gactggggac ccgggcaccc gtcctgcccc ttcaccttcc 60

agctccgcct cctccgcgcg gaccccgccc cgtcccgacc cctcccgggt ccccggccca 120

gccccctccg ggccctccca gccccctccc ttcctttccg cggccccgcc ctctcctcgc 180

ggcgcgagtt tcaggcagcg ctgcgtcctg ctgcgcacgt gggaagccct ggccccggcc 240

accccgcga tg 252

<210> 2
<211> 253
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Promotor

<400> 2

ctagccccac gtggcggagg gactggggac ccgggcaccc gtcctgcccc ttcaccttcc 60

agctccgcct cctccgcgcg gaccccgccc cgtcccgacc cctcccgggt ccccggccca 120

gccccctccg ggccctccca gccccctccc ttcctttccg cggcaacgcc ctctccttcg 180

cggcgcgagt ttcaggcagc gctgcgtcct gctgcgcacg tgggaagccc tggccccggc 240

caccccgcg atg 253

<210> 3
<211> 36152
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Recombinante

<400> 3

catcatcaat aatatacctt attttggatt gaagccaata tgataatgag ggggtggagt 60

ttgtgacgtg gcgcggggcg tgggaacggg gcgggtgacg tagtagtgtg gcggaagtgt 120
gatgttgcaa gtgtggcgga acacatgtaa gcgacggatg tggcaaaagt gacgtttttg 180

gtgtgcgccg gtgtacacag gaagtgacaa ttttcgcgcg gttttaggcg gatgttgtag 240

taaatttggg cgtaaccgag taagatttgg ccattttcgc aggaaaactg aataagagga 300

agtgaaatct gaataatttt gtgttactca tagcgcgtaa tatttgtcta gggccgcggg 360

ggatctctgc aggaatttga tatcaagctt atcgataccg tcgaaacttg tttattgcag 420

cttataatgg ttacaaataa agcaatagca tcacaaattt cacaaataaa gcatttttt 480

cactgcattc tagttgtggt ttgtccaaac tcatcaatgt atcttatcat gtctggatcc 540

gctagcccca cgtggcggag ggactgggga cccgggcacc cgtcctgccc cttcaccttc 600

cagctccgcc tcctccgcgc ggaccccgcc ccgtcccgac ccctcccggg tccccggccc 660

agcccccctcc gggccctccc agcccctccc cttcctttcc gcggcaacgc cctctccttc 720

gcggcgcgag tttcaggcag cgctgcgtcc tgctgcgcac gtgggaagcc ctggccccgg 780

ccacccccgc gaattaaacg atatcaccgg tcgactgaaa atgagacata ttatctgcca 840

cggaggtgtt attaccgaag aaatggccgc cagtcttttg gaccagctga tcgaagaggt 900

actggctgat aatcttccac ctcctagcca ttttgaacca cctacccttc acgaactgta 960

tgatttagac gtgacggccc ccgaagatcc caacgaggag gcggtttcgc agatttttcc 1020

cgactctgta atgttggcgg tgcaggaagg gattgactta ctcacttttc cgccggcgcc 1080

cggttctccg gagccgcctc acctttcccg gcagcccgag cagccggagc agagagcctt 1140

gggtccggtt tctatgccaa accttgtacc ggaggtgatc gatcttacct gccacgaggc 1200

tggctttcca cccagtgacg acgaggatga agagggtgag gagtttgtgt tagattatgt 1260

ggagcacccc gggcacggtt gcaggtcttg tcattatcac cggaggaata cgggggaccc 1320

agatattatg tgttcgcttt gctatatgag gacctgtggc atgtttgtct acagtaagtg 1380

aaaattatgg gcagtgggtg atagagtggt gggtttggtg tggtaatttt ttttttaatt 1440

tttacagttt tgtggtttaa agaattttgt attgtgattt ttttaaaagg tcctgtgtct 1500

gaacctgagc ctgagcccga gccagaaccg gagcctgcaa gacctacccg ccgtcctaaa 1560

atggcgcctg ctatcctgag acgcccgaca tcacctgtgt ctagagaatg caatagtagt 1620

acggatagct gtgactccgg tccttctaac acacctcctg agatacaccc ggtggtcccg 1680

ctgtgcccca ttaaaccagt tgccgtgaga gttggtgggc gtcgccaggc tgtggaatgt 1740

atcgaggact tgcttaacga gcctgggcaa cctttggact tgagctgtaa acgccccagg 1800

ccataaggtg taaacctgtg attgcgtgtg tggttaacgc ctttgtttgc tgaatgagtt 1860

gatgtaagtt taataaaggg tgagataatg tttaacttgc atggcgtgtt aaatggggcg 1920

gggcttaaag ggtatataat gcgccgtggg ctaatcttgg ttacatctga cctcatggag 1980

gcttgggagt gtttggaaga tttttctgct gtgcgtaact tgctggaaca gagctctaac 2040

agtacctctt ggttttggag gtttctgtgg ggctcatccc aggcaaagtt agtctgcaga 2100

attaaggagg attacaagtg ggaatttgaa gagcttttga aatcctgtgg tgagctgttt 2160

gattctttga atctgggtca ccaggcgctt ttccaagaga aggtcatcaa gactttggat 2220

ttttccacac cggggcgcgc tgcggctgct gttgcttttt tgagttttat aaaggataaa 2280

tggagcgaag aaacccatct gagcgggggg tacctgctgg attttctggc catgcatctg 2340

tggagagcgg ttgtgagaca caagaatcgc ctgctactgt tgtcttccgt ccgcccggcg 2400

ataataccga cggaggagca gcagcagcag caggaggaag ccaggcggcg gcggcaggag 2460

cagagcccag gaacccgaga gccggcctgg accctcggga atgaatgttg tacaggtggc 2520

tgaactgtat ccagaactga gacgcatttt gacaattaca gaggatgggc aggggctaaa 2580

gggggtaaag agggagcggg gggcttgtga ggctacagag gaggctagga atctagcttt 2640

tagcttaatg accagacacc gtcctgagtg tattactttt caacagatca aggataattg 2700

cgctaatgag cttgatctgc tggcgcagaa gtattccata gagcagctga ccacttactg 2760

gctgcagcca ggggatgatt ttgaggaggc tattagggta tatgcaaagg tggcacttag 2820

gccagattgc aagtacaaga tcagcaaact tgtaaatatc aggaattgtt gctacatttc 2880

tgggaacggg gccgaggtgg agatagatac ggaggatagg gtggccttta gatgtagcat 2940

gataaatatg tggccggggt gcttggcatg gacggggtgg ttattatgaa tgtaaggttt 3000

actggcccca attttagcgg tacggttttc ctggccaata ccaaccttat cctacacggt 3060

gtaagcttct atgggtttaa caatacctgt gtggaagcct ggaccgatgt aagggttcgg 3120

ggctgtgcct tttactgctg ctggaagggg gtggtgtgtc gccccaaaag cagggcttca 3180

attaagaaat gcctctttga aaggtgtacc ttgggtatcc tgtctgaggg taactccagg 3240

gtgcgccaca atgtggcctc cgactgtggt tgcttcatgc tagtgaaaag cgtggctgtg 3300

attaagcata acatggtatg tggcaactgc gaggacaggg cctctcagat gctgacctgc 3360

tcggacggca actgtcacct gctgaagacc attcacgtag ccagccactc tcgcaaggcc 3420

tggccagtgt ttgagcataa catactgacc cgctgttcct tgcatttggg taacaggagg 3480

ggggtgttcc taccttacca atgcaatttg agtcacacta agatattgct tgagcccgag 3540

agcatgtcca aggtgaacct gaacggggtg tttgacatga ccatgaagat ctggaaggtg 3600

ctgaggtacg atgagacccg caccaggtgc agaccctgcg agtgtggcgg taaacatatt 3660

aggaaccagc ctgtgatgct ggatgtgacc gaggagctga ggcccgatca cttggtgctg 3720

gcctgcaccc gcgctgagtt tggctctagc gatgaagata cagattgagg tactgaaatg 3780

tgtgggcgtg gcttaagggt gggaaagaat atataaggtg ggggtcttat gtagttttgt 3840

atctgttttg cagcagccgc cgccgccatg agcaccaact cgtttgatgg aagcattgtg 3900

agctcatatt tgacaacgcg catgccccca tgggccgggg tgcgtcagaa tgtgatgggc 3960

tccagcattg atggtcgccc cgtcctgccc gcaaactcta ctaccttgac ctacgagacc 4020

gtgtctggaa cgccgttgga gactgcagcc tccgccgccg cttcagccgc tgcagccacc 4080

gcccgcggga ttgtgactga ctttgctttc ctgagcccgc ttgcaagcag tgcagcttcc 4140

cgttcatccg cccgcgatga caagttgacg gctcttttgg cacaattgga ttctttgacc 4200

cgggaactta atgtcgtttc tcagcagctg ttggatctgc gccagcaggt ttctgccctg 4260

aaggcttcct cccctcccaa tgcggtttaa aacataaata aaaaaccaga ctctgtttgg 4320

atttggatca agcaagtgtc ttgctgtctt tatttagggg ttttgcgcgc gcggtaggcc 4380
cgggaccagc ggtctcggtc gttgagggtc ctgtgtattt tttccaggac gtggtaaagg 4440
tgactctgga tgttcagata catgggcata agcccgtctc tggggtggag gtagcaccac 4500
tgcagagctt catgctgcgg ggtggtgttg tagatgatcc agtcgtagca ggagcgctgg 4560
gcgtggtgcc taaaaatgtc tttcagtagc aagctgattg ccaggggcag gcccttggtg 4620
taagtgttta caaagcggtt aagctgggat gggtgcatac gtggggatat gagatgcatc 4680
ttggactgta tttttaggtt ggctatgttc ccagccatat ccctccgggg attcatgttg 4740
tgcagaacca ccagcacagt gtatccggtg cacttgggaa atttgtcatg tagcttagaa 4800
ggaaatgcgt ggaagaactt ggagacgccc ttgtgacctc caagattttc catgcattcg 4860
tccataatga tggcaatggg cccacgggcg gcggcctggg cgaagatatt tctgggatca 4920
ctaacgtcat agttgtgttc caggatgaga tcgtcatagg ccatttttac aaagcgcggg 4980
cggagggtgc cagactgcgg tataatggtt ccatccggcc caggggcgta gttaccctca 5040
cagatttgca tttcccacgc tttgagttca gatgggggga tcatgtctac ctgcggggcg 5100
atgaagaaaa cggtttccgg ggtaggggag atcagctggg aagaaagcag gttcctgagc 5160
agctgcgact taccgcagcc ggtgggcccg taaatcacac ctattaccgg gtgcaactgg 5220
agttaagaga gctgcagctg ccgtcatccc tgagcagggg ggccacttcg ttaagcatgt 5280
ccctgactcg atgttttccc tgaccaaatc cgccagaagg cgctcgccgc ccagcgatag 5340
cagttcttgc aaggaagcaa agtttttcaa cggtttgaga ccgtccgccg taggcatgct 5400
tttgagcgtt tgaccaagca gttccaggcg gtcccacagc tcggtcacct gctctacggc 5460
atctcgatcc agcatatctc ctcgtttcgc gggttggggc ggctttcgct gtacggcagt 5520
agtcggtgct cgtccagacg ggccagggtc atgtctttcc acgggcgcag ggtcctcgtc 5580
agcgtagtct gggtcacggt gaaggggtgc gctccgggct gcgcgctggc cagggtgcgc 5640
ttgaggctgg tcctgctggt gctgaagcgc tgccggtctt cgccctgcgc gtcggccagg 5700
tagcatttga ccatggtgtc atagtccagc ccctccgcgg cgtggccctt ggcgcgcagc 5760
ttgcccttgg aggaggcgcc gcacgagggg cagtgcagac ttttgagggc gtagagcttg 5820
ggcgcgagaa ataccgattc cggggagtag gcatccgcgc cgcaggcccc gcagacggtc 5880
tcgcattcca cgagccaggt gagctctggc cgttcggggt caaaaaccag gtttcccccа 5940
tgctttttga tgcgtttctt acctctggtt tccatgagcc ggtgtccacg ctcggtgacg 6000
aaaaggctgt ccgtgtcccc gtatacagac ttgagaggcc tgtcctcgag cggtgttccg 6060
cggtcctcct cgtatagaaa ctcggaccac tctgagacaa aggctcgcgt ccaggccagc 6120
acgaaggagg ctaagtggga ggggtagcgg tcgttgtcca ctaggggtc cactcgctcc 6180
agggtgtgaa gacacatgtc gccctcttcg gcatcaagga aggtgattgg tttgtaggtg 6240
taggccacgt gaccgggtgt tcctgaaggg gggctataaa agggggtggg ggcgcgttcg 6300
tcctcactct cttccgcatc gctgtctgcg agggccagct gttggggtga gtactccctc 6360
tgaaaagcgg gcatgacttc tgcgctaaga ttgtcagttt ccaaaaacga ggaggatttg 6420

atattcacct ggcccgcggt gatgcctttg agggtggccg catccatctg gtcagaaaag 6480
acaatctttt tgttgtcaag cttggtggca aacgacccgt agagggcgtt ggacagcaac 6540
ttggcgatgg agcgcagggt ttggtttttg tcgcgatcgg cgcgctcctt ggccgcgatg 6600
tttagctgca cgtattcgcg cgcaacgcac cgccattcgg gaaagacggt ggtgcgctcg 6660
cgggcaccag gtgcacgcgc caaccgcggt tgtgcagggt gacaaggtca acgctggtgg 6720
ctacctctcc gcgtaggcgc tcgttggtcc agcagaggcg gccgcccttg cgcgagcaga 6780
atggcggtag ggggtctagc tgcgtctcgt ccgggggggtc tgcgtccacg gtaaagaccc 6840
cgggcagcag gcgcgcgtcg aagtagtcta tcttgcatcc ttgcaagtct agcgcctgct 6900
gccatgcgcg ggcggcaagc gcgcgctcgt atgggttgag tgggggaccc catggcatgg 6960
ggtgggtgag cgcggaggcg tacatgccgc aaatgtcgta aacgtagagg ggctctctga 7020
gtattccaag atatgtaggg tagcatcttc caccgcggat gctggcgcgc acgtaatcgt 7080
atagttcgtg cgagggagcg aggaggtcgg gaccgaggtt gctacgggcg ggctgctctg 7140
ctcggaagac tatctgcctg aagatggcat gtgagttgga tgatatggtt ggacgctgga 7200
agacgttgaa gctggcgtct gtgagaccta ccgcgtcacg cacgaaggag gcgtaggagt 7260
cgcgcagctt gttgaccagc tcggcggtga cctgcacgtc tagggcgcag tagtccaggg 7320
tttccttgat gatgtcatac ttatcctgtc cctttttttt ccacagctcg cggttgagga 7380
caaactcttc gcggtctttc cagtactctt ggatcggaaa cccgtcggcc tccgaacggt 7440
aagagcctag catgtagaac tggttgacgg cctggtaggc gcagcatccc ttttctacgg 7500
gtagcgcgta tgcctgcgcg gccttccgga gcgaggtgtg ggtgagcgca aaggtgtccc 7560
tgaccatgac tttgaggtac tggtatttga agtcagtgtc gtcgcatccg ccctgctccc 7620
agagcaaaaa gtccgtgcgc tttttggaac gcggatttgg cagggcgaag gtgacatcgt 7680
tgaagagtat ctttcccgcg cgaggcataa agttgcgtgt gatgcggaag ggtcccggca 7740
cctcggaacg gttgttaatt acctgggcgg cgagcacgat ctcgtcaaag ccgttgatgt 7800
tgtggcccac aatgtaaagt tccaagaagc gcgggatgcc cttgatggaa ggcaattttt 7860
taagttcctc gtaggtgagc tcttcagggg agctgagccc gtgctctgaa agggcccagt 7920
ctgcaagatg agggttggaa gcgacgaatg agctccacag gtcacgggcc attagcattt 7980
gcaggtggtc gcgaaaggtc ctaaactggc gacctatggc catttttttct ggggtgatgc 8040
agtagaaggt aagcgggtct tgttcccagc ggtcccatcc aaggttcgcg gctaggtctc 8100
gcgcggcagt cactagaggc tcatctccgc cgaacttcat gaccagcatg aagggcacga 8160
gctgcttccc aaaggccccc atccaagtat aggtctctac atcgtaggtg acaaagagac 8220
gctcggtgcg aggatgcgag ccgatcggga agaactggat ctcccgccac caattggagg 8280
agtggctatt gatgtggtga aagtagaagt ccctgcgacg ggccgaacac tcgtgctggc 8340
ttttgtaaaa acgtgcgcag tactggcagc ggtgcacggg ctgtacatcc tgcacgaggt 8400
tgacctgacg accgcgcaca aggaagcaga gtgggaattt gagcccctcg cctggcgggt 8460
ttggctggtg gtcttctact tcggctgctt gtccttgacc gtctggctgc tcgaggggag 8520

ttacggtgga tcggaccacc acgccgcgcg agcccaaagt ccagatgtcc gcgcgcggcg 8580
gtcggagctt gatgacaaca tcgcgcagat gggagctgtc catggtctgg agctcccgcg 8640
gcgtcaggtc aggcgggagc tcctgcaggt ttacctcgca tagacgggtc agggcgcggg 8700
ctagatccag gtgataccta atttccaggg gctggttggt ggcggcgtcg atggcttgca 8760
agaggccgca tccccgcggc gcgactacgg taccgcgcgg cgggcggtgg gccgcggggg 8820
tgtccttgga tgatgcatct aaaagcggtg acgcgggcga gcccccggag gtaggggggg 8880
ctccggaccc gccgggagag ggggcagggg cacgtcggcg ccgcgcgcgg gcaggagctg 8940
gtgctgcgcg cgtaggttgc tggcgaacgc gacgacgcgg cggttgatct cctgaatctg 9000
gcgcctctgc gtgaagacga cgggcccggt gagcttgagc ctgaaagaga gttcgacaga 9060
atcaatttcg gtgtcgttga cggcggcctg gcgcaaaatc tcctgcacgt ctcctgagtt 9120
gtcttgatag gcgatctcgg ccatgaactg ctcgatctct tcctcctgga gatctccgcg 9180
tccggctcgc tccacggtgg cggcgaggtc gttggaaatg cgggccatga gctgcgagaa 9240
ggcgttgagg cctccctcgt tccagacgcg gctgtagacc acgccccctt cggcatcgcg 9300
ggcgcgcatg accacctgcg cgagattgag ctccacgtgc cgggcgaaga cggcgtagtt 9360
tcgcaggcgc tgaaagaggt agttgagggt ggtggcggtg tgttctgcca cgaagaagta 9420
cataacccag cgtcgcaacg tggattcgtt gatatccccc aaggcctcaa ggcgctccat 9480
ggcctcgtag aagtccacgg cgaagttgaa aaactgggag ttgcgcgccg acacggttaa 9540
ctcctcctcc agaagacgga tgagctcggc gacagtgtcg cgcacctcgc gctcaaaggc 9600
tacaggggcc tcttcttctt cttcaatctc ctcttccata agggcctccc cttcttcttc 9660
ttctggcggc ggtgggggag gggggacacg gcggcgacga cggcgcaccg ggaggcggtc 9720
gacaaagcgc tcgatcatct ccccgcggcg acggcgcatg gtctcggtga cggcgcggcc 9780
gttctcgcgg gggcgcagtt ggaagacgcc gcccgtcatg tcccggttat gggttggcgg 9840
ggggctgcca tgcggcaggg atacggcgct aacgatgcat ctcaacaatt gttgtgtagg 9900
tactccgccg ccgagggacc tgagcgagtc cgcatcgacc ggatcggaaa acctctcgag 9960
aaaggcgtct aaccagtcac agtcgcaagg taggctgagc accgtggcgg gcggcagcgg 10020
gcggcggtcg gggttgtttc tggcggaggt gctgctgatg atgtaattaa agtaggcggt 10080
cttgagacgg cggatggtcg acagaagcac catgtccttg ggtccggcct gctgaatgcg 10140
caggcggtcg gccatgcccc aggcttcgtt ttgacatcgg cgcaggtctt tgtagtagtc 10200
ttgcatgagc ctttctaccg gcacttcttc ttctccttcc tcttgtcctg catctcttgc 10260
atctatcgct gcggcggcgg cggagtttgg ccgtaggtgg cgccctcttc ctcccatgcg 10320
tgtgaccccg aagcccctca tcggctgaag cagggctagg tcggcgacaa cgcgctcggc 10380
taatatggcc tgctgcacct gcgtgagggt agactggaag tcatccatgt ccacaaagcg 10440
gtggtatgcg cccgtgttga tggtgtaagt gcagttggcc ataacggacc agttaacggt 10500
ctggtgaccc ggctgcgaga gctcggtgta cctgagacgc gagtaagccc tcgagtcaaa 10560
tacgtagtcg ttgcaagtcc gcaccaggta ctggtatccc accaaaaagt gcggcggcgg 10620

ctggcggtag aggggccagc gtagggtggc cggggctccg ggggcgagat cttccaacat 10680
aaggcgatga tatccgtaga tgtacctgga catccaggtg atgccggcgg cggtggtgga 10740
ggcgcgcgga aagtcgcgga cgcggttcca gatgttgcgc agcggcaaaa agtgctccat 10800
ggtcgggacg ctctggccgg tcaggcgcgc gcaatcgttg acgctctaga ccgtgcaaaa 10860
ggagagcctg taagcgggca ctcttccgtg gtctggtgga taaattcgca agggtatcat 10920
ggcggacgac cggggttcga gccccgtatc cggccgtccg ccgtgatcca tgcggttacc 10980
gcccgcgtgt cgaacccagg tgtgcgacgt cagacaacgg gggagtgctc cttttggctt 11040
ccttccaggc gcggcggctg ctgcgctagc ttttttggcc actggccgcg cgcagcgtaa 11100
gcggttaggc tggaaagcga aagcattaag tggctcgctc cctgtagccg gagggttatt 11160
ttccaagggt tgagtcgcgg gacccccggt tcgagtctcg gaccggccgg actgcggcga 11220
acgggggttt gcctccccgt catgcaagac cccgcttgca aattcctccg gaaacaggga 11280
cgagcccctt ttttgctttt cccagatgca tccggtgctg cggcagatgc gcccccctcc 11340
tcagcagcgg caagagcaag agcagcggca gacatgcagg gcaccctccc ctcctcctac 11400
cgcgtcagga ggggcgacat ccgcggttga cgcggcagca gatggtgatt acgaaccccc 11460
gcggcgccgg gcccggcact acctggactt ggaggagggc gagggcctgg cgcggctagg 11520
agcgccctct cctgagcggt acccaagggt gcagctgaag cgtgatacgc gtgaggcgta 11580
cgtgccgcgg cagaacctgt ttcgcgaccg cgagggagag gagcccgagg agatgcggga 11640
tcgaaagttc cacgcagggc gcgagctgcg gcatggcctg aatcgcgagc ggttgctgcg 11700
cgaggaggac tttgagcccg acgcgcgaac cgggattagt cccgcgcgcg cacacgtggc 11760
ggccgccgac ctggtaaccg catacgagca gacggtgaac caggagatta actttcaaaa 11820
aagctttaac aaccacgtgc gtacgcttgt ggcgcgcgag gaggtggcta taggactgat 11880
gcatctgtgg gactttgtaa gcgcgctgga gcaaaaccca aatagcaagc cgctcatggc 11940
gcagctgttc cttatagtgc agcacagcag ggacaacgag gcattcaggg atgcgctgct 12000
aaacatagta gagcccgagg gccgctggct gctcgatttg ataaacatcc tgcagagcat 12060
agtggtgcag gagcgcagct tgagcctggc tgacaaggtg gccgccatca actattccat 12120
gcttagcctg ggcaagtttt acgcccgcaa gatataccat acccttacg ttcccataga 12180
caaggaggta aagatcgagg ggttctacat gcgcatggcg ctgaaggtgc ttaccttgag 12240
cgacgacctg ggcgtttatc gcaacgagcg catccacaag gccgtgagcg tgagccggcg 12300
gcgcgagctc agcgaccgcg agctgatgca cagcctgcaa agggccctgg ctggcacggg 12360
cagcggcgat agagaggccg agtcctactt tgacgcgggc gctgacctgc gctgggcccc 12420
aagccgacgc gccctggagg cagctggggc cggacctggg ctggcggtgg cacccgcgcg 12480
cgctggcaac gtcggcggcg tggaggaata tgacgaggac gatgagtacg agccagagga 12540
cggcgagtac taagcggtga tgtttctgat cagatgatgc aagacgcaac ggacccggcg 12600
gtgcgggcgg cgctgcagag ccagccgtcc ggccttaact ccacggacga ctggcgccag 12660
gtcatggacc gcatcatgtc gctgactgcg cgcaatcctg acgcgttccg gcagcagccg 12720

caggccaacc ggctctccgc aattctggaa gcggtggtcc cggcgcgcgc aaaccccacg 12780
cacgagaagg tgctggcgat cgtaaacgcg ctggccgaaa acagggccat ccggccccgac 12840
gaggccggcc tggtctacga cgcgctgctt cagcgcgtgg ctcgttacaa cagcggcaac 12900
gtgcagacca acctggaccg gctggtgggg gatgtgcgcg aggccgtggc gcagcgtgag 12960
cgcgcgcagc agcagggcaa cctgggctcc atggttgcac taaacgcctt cctgagtaca 13020
cagcccgcca acgtgccgcg gggacaggag gactacacca actttgtgag cgcactgcgg 13080
ctaatggtga ctgagacacc gcaaagtgag gtgtaccagt ctgggccaga ctatttttc 13140
cagaccagta gacaaggcct gcagaccgta aacctgagcc aggctttcaa aaacttgcag 13200
gggctgtggg gggtgcgggc tcccacaggc gaccgcgcga ccgtgtctag cttgctgacg 13260
cccaactcgc gcctgttgct gctgctaata gcgcccttca cggacagtgg cagcgtgtcc 13320
cgggacacat acctaggtca cttgctgaca ctgtaccgcg aggccatagg tcaggcgcat 13380
gtggacgagc atactttcca ggagattaca agtgtcagcc gcgcgctggg gcaggaggac 13440
acgggcagcc tggaggcaac cctaaactac ctgctgacca accggcggca gaagatcccc 13500
tcgttgcaca gtttaaacag cgaggaggag cgcattttgc gctacgtgca gcagagcgtg 13560
agccttaacc tgatgcgcga cggggtaacg cccagcgtgg cgctggacat gaccgcgcgc 13620
aacatggaac cgggcatgta tgcctcaaac cggccgttta tcaaccgcct aatggactac 13680
ttgcatcgcg cggccgccgt gaaccccgag tatttcacca atgccatctt gaacccgcac 13740
tggctaccgc cccctggttt ctacaccggg ggattcgagg tgcccgaggg taacgatgga 13800
ttcctctggg acgacataga cgacagcgtg ttttccccgc aaccgcagac cctgctagag 13860
ttgcaacagc gcgagcaggc agaggcggcg ctgcgaaagg aaagcttccg caggccaagc 13920
agcttgtccg atctaggcgc tgcggccccg cggtcagatg ctagtagccc atttccaagc 13980
ttgatagggt ctcttaccag cactcgcacc acccgcccgc gcctgctggg cgaggaggag 14040
tacctaaaca actcgctgct gcagccgcag cgcgaaaaaa acctgcctcc ggcatttccc 14100
aacaacggga tagagagcct agtggacaag atgagtagat ggaagacgta cgcgcaggag 14160
cacagggacg tgccaggccc gcgcccgccc acccgtcgtc aaaggcacga ccgtcagcgg 14220
ggtctggtgt gggaggacga tgactcggca gacgacagca gcgtcctgga tttgggaggg 14280
agtggcaacc cgtttgcgca ccttcgcccc aggctgggga gaatgtttta aaaaaaaaaa 14340
agcatgatgc aaaataaaaa actcaccaag gccatggcac cgagcgttgg ttttcttgta 14400
ttccccttag tatgcggcgc gcggcgatgt atgaggaagg tcctcctccc tcctacgaga 14460
gtgtggtgag cgcggcgcca gtggcggcgg cgctgggttc tcccttcgat gctcccctgg 14520
acccgccgtt tgtgcctccg cggtacctgc ggcctaccgg ggggagaaac agcatccgtt 14580
actctgagtt ggcaccccta ttcgacacca cccgtgtgta cctggtggac aacaagtcaa 14640
cggatgtggc atccctgaac taccagaacg accacagcaa ctttctgacc acggtcattc 14700
aaaacaatga ctacagcccg ggggaggcaa gcacacagac catcaatctt gacgaccggt 14760
cgcactgggg cggcgacctg aaaaccatcc tgcataccaa catgccaaat gtgaacgagt 14820

tcatgtttac caataagttt aaggcgcggg tgatggtgtc gcgcttgcct actaaggaca 14880
atcaggtgga gctgaaatac gagtgggtgg agttcacgct gcccgagggc aactactccg 14940
agaccatgac catagacctt atgaacaacg cgatcgtgga gcactacttg aaagtgggca 15000
gacagaacgg ggttctggaa agcgacatcg gggtaaagtt tgacacccgc aacttcagac 15060
tggggtttga ccccgtcact ggtcttgtca tgcctggggt atatacaaac gaagccttcc 15120
atccagacat cattttgctg ccaggatgcg gggtggactt cacccacagc cgcctgagca 15180
acttgttggg catccgcaag cggcaaccct tccaggaggg ctttaggatc acctacgatg 15240
atctggaggg tggtaacatt cccgcactgt tggatgtgga cgcctaccag gcgagcttga 15300
aagatgacac cgaacagggc gggggtggcg caggcggcag caacagcagt ggcagcggcg 15360
cggaagagaa ctccaacgcg gcagccgcgg caatgcagcc ggtggaggac atgaacgatc 15420
atgccattcg cggcgacacc tttgccacac gggctgagga gaagcgcgct gaggccgaag 15480
cagcggccga agctgccgcc cccgctgcgc aacccgaggt cgagaagcct cagaagaaac 15540
cggtgatcaa acccctgaca gaggacagca agaaacgcag ttacaaccta ataagcaatg 15600
acagcacctt cacccagtac cgcagctggt accttgcata caactacggc gaccctcaga 15660
ccggaatccg ctcatggacc ctgctttgca ctcctgacgt aacctgcggc tcggagcagg 15720
tctactggtc gttgccagac atgatgcaag accccgtgac cttccgctcc acgcgccaga 15780
tcagcaactt tccggtggtg ggcgccgagc tgttgcccgt gcactccaag agcttctaca 15840
acgaccaggc cgtctactcc caactcatcc gccagtttac ctctctgacc cacgtgttca 15900
atcgctttcc cgagaaccag attttggcgc gcccgccagc ccccaccatc accaccgtca 15960
gtgaaaacgt tcctgctctc acagatcacg ggacgctacc gctgcgcaac agcatcggag 16020
gagtccagcg agtgaccatt actgacgcca gacgccgcac ctgcccctac gtttacaagg 16080
ccctgggcat agtctcgccg cgcgtcctat cgagccgcac tttttgagca agcatgtcca 16140
tccttatatc gcccagcaat aacacaggct ggggcctgcg cttcccaagc aagatgtttg 16200
gcggggccaa gaagcgctcc gaccaacacc cagtgcgcgt gcgcgggcac taccgcgcgc 16260
cctggggcgc gcacaaacgc ggccgcactg ggcgcaccac cgtcgatgac gccatcgacg 16320
cggtggtgga ggaggcgcgc aactacacgc ccacgccgcc accagtgtcc acagtggacg 16380
cggccattca gaccgtggtg cgcggagccc ggcgctatgc taaaatgaag agacggcgga 16440
ggcgcgtagc acgtcgccac cgccgccgac ccggcactgc cgcccaacgc gcggcggcgg 16500
ccctgcttaa ccgcgcacgt cgcaccggcc gacgggcggc catgcgggcc gctcgaaggc 16560
tggccgcggg tattgtcact gtgccccccа ggtccaggcg acgagcggcc gccgcagcag 16620
ccgcggccat tagtgctatg actcagggtc gcaggggcaa cgtgtattgg gtgcgcgact 16680
cggttagcgg cctgcgcgtg cccgtgcgca cccgcccccc gcgcaactag attgcaagaa 16740
aaaactactt agactcgtac tgttgtatgt atccagcggc ggcggcgcgc aacgaagcta 16800
tgtccaagcg caaaatcaaa gaagagatgc tccaggtcat cgcgccggag atctatggcc 16860
ccccgaagaa ggaagagcag gattacaagc cccgaaagct aaagcgggtc aaaaagaaaa 16920

agaaagatga tgatgatgaa cttgacgacg aggtggaact gctgcacgct accgcgccca 16980
ggcgacgggt acagtggaaa ggtcgacgcg taaaacgtgt tttgcgaccc ggcaccaccg 17040
tagtctttac gcccggtgag cgctccaccc gcacctacaa gcgcgtgtat gatgaggtgt 17100
acggcgacga ggacctgctt gagcaggcca acgagcgcct cggggagttt gcctacggaa 17160
agcggcataa ggacatgctg gcgttgccgc tggacgaggg caacccaaca cctagcctaa 17220
agcccgtaac actgcagcag gtgctgcccg cgcttgcacc gtccgaagaa aagcgcggcc 17280
taaagcgcga gtctggtgac ttggcaccca ccgtgcagct gatggtaccc aagcgccagc 17340
gactggaaga tgtcttggaa aaaatgaccg tggaacctgg gctggagccc gaggtccgcg 17400
tgcggccaat caagcaggtg gcgccgggac tgggcgtgca gaccgtggac gttcagatac 17460
ccactaccag tagcaccagt attgccaccg ccacagaggg catggagaca caaacgtccc 17520
cggttgcctc agcggtggcg gatgccgcgg tgcaggcggt cgctgcggcc gcgtccaaga 17580
cctctacgga ggtgcaaacg gacccgtgga tgtttcgcgt ttcagccccc cggcgcccgc 17640
gcggttcgag gaagtacggc gccgccagcg cgctactgcc cgaatatgcc ctacatcctt 17700
ccattgcgcc taccccggc tatcgtggct acacctaccg ccccagaaga cgagcaacta 17760
cccgacgccg aaccaccact ggaacccgcc gccgccgtcg ccgtcgccag cccgtgctgg 17820
ccccgatttc cgtgcgcagg gtggctcgcg aaggaggcag gaccctggtg ctgccaacag 17880
cgcgctacca ccccagcatc gtttaaaagc cggtctttgt ggttcttgca gatatggccc 17940
tcacctgccg cctccgtttc ccggtgccgg gattccgagg aagaatgcac cgtaggaggg 18000
gcatggccgg ccacggcctg acgggcggca tgcgtcgtgc gcaccaccgg cggcggcgcg 18060
cgtcgcaccg tcgcatgcgc ggcggtatcc tgcccctcct tattccactg atcgccgcgg 18120
cgattggcgc cgtgcccgga attgcatccg tggccttgca ggcgcagaga cactgattaa 18180
aaacaagttg catgtggaaa aatcaaaata aaaagtctgg actctcacgc tcgcttggtc 18240
ctgtaactat tttgtagaat ggaagacatc aactttgcgt ctctggcccc gcgacacggc 18300
tcgcgcccgt tcatgggaaa ctggcaagat atcggcacca gcaatatgag cggtggcgcc 18360
ttcagctggg gctcgctgtg gagcggcatt aaaaatttcg gttccaccgt taagaactat 18420
ggcagcaagg cctggaacag cagcacaggc cagatgctga gggataagtt gaaagagcaa 18480
aatttccaac aaaaggtggt agatggcctg gcctctggca ttagcggggt ggtggacctg 18540
gccaaccagg cagtgcaaaa taagattaac agtaagcttg atccccgccc tcccgtagag 18600
gagcctccac cggccgtgga gacagtgtct ccagaggggc gtggcgaaaa gcgtccgcgc 18660
cccgacaggg aagaaactct ggtgacgcaa atagacgagc ctccctcgta cgaggaggca 18720
ctaaagcaag gcctgcccac cacccgtccc atcgcgccca tggctaccgg agtgctgggc 18780
cagcacacac ccgtaacgct ggacctgcct ccccccgccg acacccagca gaaacctgtg 18840
ctgccaggcc cgaccgccgt tgttgtaacc cgtcctagcc gcgcgtccct gcgccgcgcc 18900
gccagcggtc cgcgatcgtt gcggcccgta gccagtggca actggcaaag cacactgaac 18960
agcatcgtgg gtctgggggt gcaatccctg aagcgccgac gatgcttctg aatagctaac 19020

gtgtcgtatg tgtgtcatgt atgcgtccat gtcgccgcca gaggagctgc tgagccgccg 19080
cgcgcccgct ttccaagatg gctacccctt cgatgatgcc gcagtggtct tacatgcaca 19140
tctcgggcca ggacgcctcg gagtacctga gccccgggct ggtgcagttt gcccgcgcca 19200
ccgagacgta cttcagcctg aataacaagt ttagaaaccc cacggtggcg cctacgcacg 19260
acgtgaccac agaccggtcc cagcgtttga cgctgcggtt catccctgtg gaccgtgagg 19320
atactgcgta ctcgtacaag gcgcggttca ccctagctgt gggtgataac cgtgtgctgg 19380
acatggcttc cacgtacttt gacatccgcg gcgtgctgga caggggccct acttttaagc 19440
cctactctgg cactgcctac aacgccctgg ctcccaaggg tgccccaaat ccttgcgaat 19500
gggatgaagc tgctactgct cttgaaataa acctagaaga agaggacgat gacaacgaag 19560
acgaagtaga cgagcaagct gagcagcaaa aaactcacgt atttgggcag gcgccttatt 19620
ctggtataaa tattacaaag gagggtattc aaataggtgt cgaaggtcaa acacctaaat 19680
atgccgataa aacatttcaa cctgaacctc aaataggaga atctcagtgg tacgaaactg 19740
aaattaatca tgcagctggg agagtcctta aaaagactac cccaatgaaa ccatgttacg 19800
gttcatatgc aaaacccaca aatgaaaatg gagggcaagg cattcttgta aagcaacaaa 19860
atggaaagct agaaagtcaa gtggaaatgc aatttttctc aactactgag gcgaccgcag 19920
gcaatggtga taacttgact cctaaagtgg tattgtacag tgaagatgta gatatagaaa 19980
ccccagacac tcatatttct tacatgccca ctattaagga aggtaactca cgagaactaa 20040
tgggccaaca atctatgccc aacaggccta attacattgc ttttagggac aattttattg 20100
gtctaatgta ttacaacagc acgggtaata tgggtgttct ggcgggccaa gcatcgcagt 20160
tgaatgctgt tgtagatttg caagacagaa acacagagct ttcataccag cttttgcttg 20220
attccattgg tgatagaacc aggtactttt ctatgtggaa tcaggctgtt gacagctatg 20280
atccagatgt tagaattatt gaaaatcatg gaactgaaga tgaacttcca aattactgct 20340
ttccactggg aggtgtgatt aatacagaga ctcttaccaa ggtaaaacct aaaacaggtc 20400
aggaaaatgg atgggaaaaa gatgctacag aattttcaga taaaaatgaa ataagagttg 20460
gaaataattt tgccatggaa atcaatctaa atgccaacct gtggagaaat ttcctgtact 20520
ccaacatagc gctgtatttg cccgacaagc taaagtacag tccttccaac gtaaaaattt 20580
ctgataaccc aaacacctac gactacatga acaagcgagt ggtggctccc gggttagtgg 20640
actgctacat taaccttgga gcacgctggt cccttgacta tatggacaac gtcaacccat 20700
ttaaccacca ccgcaatgct ggcctgcgct accgctcaat gttgctgggc aatggtcgct 20760
atgtgccctt ccacatccag gtgcctcaga agttctttgc cattaaaaac ctccttctcc 20820
tgccgggctc atacacctac gagtggaact tcaggaagga tgttaacatg gttctgcaga 20880
gctccctagg aaatgaccta agggttgacg gagccagcat taagtttgat agcatttgcc 20940
tttacgccac cttcttcccc atggcccaca acaccgcctc cacgcttgag gccatgcttg 21000
aaacgacacc aacgaccagt cctttaacga ctatctctcc gccgccaaca tgctctaccc 21060
tatacccgcc aacgctacca acgtgcccat atccatcccc tcccgcaact gggcggcttt 21120

ccgcggctgg gccttcacgc gccttaagac taaggaaacc ccatcactgg gctcgggcta 21180
cgacccttat tacacctact ctggctctat accctaccta gatggaacct tttacctcaa 21240
ccacaccttt aagaaggtgg ccattacctt tgactcttct gtcagctggc ctggcaatga 21300
ccgcctgctt acccccaacg agtttgaaat taagcgctca gttgacgggg agggttacaa 21360
cgttgcccag tgtaacatga ccaaagactg gttcctggta caaatgctag ctaactacaa 21420
cattggctac cagggcttct atatcccaga gagctacaag gaccgcatgt actccttctt 21480
tagaaacttc cagcccatga gccgtcaggt ggtggatgat actaaataca aggactacca 21540
acaggtgggc atcctacacc aacacaacaa ctctggattt gttggctacc ttgccccccac 21600
catgcgcgaa ggacaggcct accctgctaa cttcccctat ccgcttatag gcaagaccgc 21660
agttgacagc attacccaga aaaagtttct ttgcgatcgc acccctttggc gcatcccatt 21720
ctccagtaac tttatgtcca tgggcgcact cacagacctg ggccaaaacc ttctctacgc 21780
caactccgcc cacgcgctag acatgacttt tgaggtggat cccatggacg agcccaccct 21840
tctttatgtt ttgtttgaag tctttgacgt ggtccgtgtg caccggccgc accgcggcgt 21900
catcgaaacc gtgtacctgc gcacgccctt ctcggccggc aacgccacaa cataaagaag 21960
caagcaacat caacaacagc tgccgccatg ggctccagtg agcaggaact gaaagccatt 22020
gtcaaagatc ttggttgtgg gccatatttt ttgggcacct atgacaagcg ctttccaggc 22080
tttgtttctc cacacaagct cgcctgcgcc atagtcaata cggccggtcg cgagactggg 22140
ggcgtacact ggatggcctt tgcctggaac ccgcactcaa aaacatgcta cctctttgag 22200
ccctttggct tttctgacca gcgactcaag caggtttacc agtttgagta cgagtcactc 22260
ctgcgccgta gcgccattgc ttcttccccc gaccgctgta taacgctgga aaagtccacc 22320
caaagcgtac aggggcccaa ctcggccgcc tgtggactat tctgctgcat gtttctccac 22380
gcctttgcca actggcccca aactcccatg gatcacaacc ccaccatgaa ccttattacc 22440
ggggtaccca actccatgct caacagtccc caggtacagc ccaccctgcg tcgcaaccag 22500
gaacagctct acagcttcct ggagcgccac tcgccctact tccgcagcca cagtgcgcag 22560
attaggagcg ccacttcttt ttgtcacttg aaaaacatgt aaaaataatg tactagagac 22620
actttcaata aaggcaaatg cttttatttg tacactctcg ggtgattatt tacccccacc 22680
cttgccgtct gcgccgttta aaaatcaaag gggttctgcc gcgcatcgct atgcgccact 22740
ggcagggaca cgttgcgata ctggtgttta gtgctccact taaactcagg cacaaccatc 22800
cgcggcagct cggtgaagtt ttcactccac aggctgcgca ccatcaccaa cgcgtttagc 22860
aggtcgggcg ccgatatctt gaagtcgcag ttggggcctc cgccctgcgc gcgcgagttg 22920
cgatacacag ggttgcagca ctggaacact atcagcgccg ggtggtgcac gctggccagc 22980
acgctcttgt cggagatcag atccgcgtcc aggtcctccg cgttgctcag ggcgaacgga 23040
gtcaactttg gtagctgcct tcccaaaaag ggcgcgtgcc caggctttga gttgcactcg 23100
caccgtagtg gcatcaaaag gtgaccgtgc ccggtctggg cgttaggata cagcgcctgc 23160
ataaaagcct tgatctgctt aaaagccacc tgagcctttg cgccttcaga gaagaacatg 23220

ccgcaagact tgccggaaaa ctgattggcc ggacaggccg cgtcgtgcac gcagcacctt 23280
gcgtcggtgt tggagatctg caccacattt cggccccacc ggttcttcac gatcttggcc 23340
ttgctagact gctccttcag cgcgcgctgc ccgttttcgc tcgtcacatc catttcaatc 23400
acgtgctcct tatttatcat aatgcttccg tgtagacact taagctcgcc ttcgatctca 23460
gcgcagcggt gcagccacaa cgcgcagccc gtgggctcgt gatgcttgta ggtcacctct 23520
gcaaacgact gcaggtacgc ctgcaggaat cgccccatca tcgtcacaaa ggtcttgttg 23580
ctggtgaagg tcagctgcaa cccgcggtgc tcctcgttca gccaggtctt gcatacggcc 23640
gccagagctt ccacttggtc aggcagtagt ttgaagttcg cctttagatc gttatccacg 23700
tggtacttgt ccatcagcgc gcgcgcagcc tccatgccct tctcccacgc agacacgatc 23760
ggcacactca gcgggttcat caccgtaatt tcactttccg cttcgctggg ctcttcctct 23820
tcctcttgcg tccgcatacc acgcgccact gggtcgtctt cattcagccg ccgcactgtg 23880
cgcttacctc ctttgccatg cttgattagc accggtgggt tgctgaaacc caccatttgt 23940
agcgccacat cttctctttc ttcctcgctg tccacgatta cctctggtga tggcgggcgc 24000
tcgggcttgg gagaagggcg cttcttttte ttcttgggcg caatggccaa atccgccgcc 24060
gaggtcgatg gccgcgggct gggtgtgcgc ggcaccagcg cgtcttgtga tgagtcttcc 24120
tcgtcctcgg actcgatacg ccgcctcatc cgcttttttg ggggcgcccg gggaggcggc 24180
ggcgacgggg acggggacga cacgtcctcc atggttgggg gacgtcgcgc cgcaccgcgt 24240
ccgcgctcgg gggtggtttc gcgctgctcc tcttcccgac tggccatttc cttctcctat 24300
aggcagaaaa agatcatgga gtcagtcgag aagaaggaca gcctaaccgc cccctctgag 24360
ttcgccacca ccgcctccac cgatgccgcc aacgcgccta ccaccttccc cgtcgaggca 24420
cccccgcttg aggaggagga agtgattatc gagcaggacc caggttttgt aagcgaagac 24480
gacgaggacc gctcagtacc aacagaggat aaaaagcaag accaggacaa cgcagaggca 24540
aacgaggaac aagtcgggcg gggggacgaa aggcatggcg actacctaga tgtgggagac 24600
gacgtgctgt tgaagcatct gcagcgccag tgcgccatta tctgcgacgc gttgcaagag 24660
cgcagcgatg tgcccctcgc catagcggat gtcagccttg cctacgaacg ccacctattc 24720
tcaccgcgcg taccccccaa acgccaagaa aacggcacat gcgagcccaa cccgcgcctc 24780
aacttctacc ccgtatttgc cgtgccagag gtgcttgcca cctatcacat ctttttccaa 24840
aactgcaaga taccctatc ctgccgtgcc aaccgcagcc gagcggacaa gcagctggcc 24900
ttgcggcagg gcgctgtcat acctgatatc gcctcgctca acgaagtgcc aaaaatcttt 24960
gagggtcttg gacgcgacga gaagcgcgcg gcaaacgctc tgcaacagga aaacagcgaa 25020
aatgaaagtc actctggagt gttggtggaa ctcgagggtg acaacgcgcg cctagccgta 25080
ctaaaacgca gcatcgaggt cacccacttt gcctacccgg cacttaacct acccccaag 25140
gtcatgagca cagtcatgag tgagctgatc gtgcgccgtg cgcagcccct ggagagggat 25200
gcaaatttgc aagaacaaac agaggagggc ctacccgcag ttggcgacga gcagctagcg 25260
cgctggcttc aaacgcgcga gcctgccgac ttggaggagc gacgcaaact aatgatggcc 25320

gcagtgctcg ttaccgtgga gcttgagtgc atgcagcggt tctttgctga cccggagatg 25380
cagcgcaagc tagaggaaac attgcactac acctttcgac agggctacgt acgccaggcc 25440
tgcaagatct ccaacgtgga gctctgcaac ctggtctcct accttggaat tttgcacgaa 25500
aaccgccttg ggcaaaacgt gcttcattcc acgctcaagg gcgaggcgcg ccgcgactac 25560
gtccgcgact gcgtttactt atttctatgc tacacctggc agacggccat gggcgtttgg 25620
cagcagtgct tggaggagtg caacctcaag gagctgcaga aactgctaaa gcaaaacttg 25680
aaggacctat ggacggcctt caacgagcgc tccgtggccg cgcacctggc ggacatcatt 25740
ttccccgaac gcctgcttaa aaccctgcaa cagggtctgc cagacttcac cagtcaaagc 25800
atgttgcaga actttaggaa ctttatccta gagcgctcag gaatcttgcc cgccacctgc 25860
tgtgcacttc ctagcgactt tgtgcccatt aagtaccgcg aatgccctcc gccgctttgg 25920
ggccactgct accttctgca gctagccaac taccttgcct accactctga cataatggaa 25980
gacgtgagcg gtgacggtct actggagtgt cactgtcgct gcaacctatg caccccgcac 26040
cgctccctgg tttgcaattc gcagctgctt aacgaaagtc aaattatcgg taccttgag 26100
ctgcagggtc cctcgcctga cgaaaagtcc gcggctccgg ggttgaaact cactccgggg 26160
ctgtggacgt cggcttacct tcgcaaattt gtacctgagg actaccacgc ccacgagatt 26220
aggttctacg aagaccaatc ccgcccgcca aatgcggagc ttaccgcctg cgtcattacc 26280
cagggccaca ttcttggcca attgcaagcc atcaacaaag cccgccaaga gtttctgcta 26340
cgaaagggac ggggggttta cttggacccc cagtccggcg aggagctcaa cccaatcccc 26400
ccgccgccgc agccctatca gcagcagccg cgggcccttg cttcccagga tggcacccaa 26460
aaagaagctg cagctgccgc cgccacccac ggacgaggag gaatactggg acagtcaggc 26520
agaggaggtt ttggacgagg aggaggagga catgatggaa gactgggaga gcctagacga 26580
ggaagcttcc gaggtcgaag aggtgtcaga cgaaacaccg tcaccctcgg tcgcattccc 26640
ctcgccggcg ccccagaaat cggcaaccgg ttccagcatg gctacaacct ccgctcctca 26700
ggcgccgccg gcactgcccg ttcgccgacc caaccgtaga tgggacacca ctggaaccag 26760
ggccggtaag tccaagcagc cgccgccgtt agcccaagag caacaacagc gccaaggcta 26820
ccgctcatgg cgcgggcaca agaacgccat agttgcttgc ttgcaagact gtgggggcaa 26880
catctccttc gcccgccgct ttcttctcta ccatcacggc gtggccttcc cccgtaacat 26940
cctgcattac taccgtcatc tctacagccc atactgcacc ggcggcagcg gcagcggcag 27000
caacagcagc ggccacacag aagcaaaggc gaccggatag caagactctg acaaagccca 27060
agaaatccac agcggcggca gcagcaggag gaggagcgct gcgtctggcg cccaacgaac 27120
ccgtatcgac ccgcgagctt agaaacagga tttttcccac tctgtatgct atatttcaac 27180
agagcagggg ccaagaacaa gagctgaaaa taaaaaacag gtctctgcga tccctcaccc 27240
gcagctgcct gtatcacaaa agcgaagatc agcttcggcg cacgctggaa gacgcggagg 27300
ctctcttcag taaatactgc gcgctgactc ttaaggacta gtttcgcgcc ctttctcaaa 27360
tttaagcgcg aaaactacgt catctccagc ggccacaccc ggcgccagca cctgtcgtca 27420

gcgccattat gagcaaggaa attcccacgc cctacatgtg gagttaccag ccacaaatgg 27480
gacttgcggc tggagctgcc caagactact caacccgaat aaactacatg agcgcgggac 27540
cccacatgat atcccgggtc aacggaatcc gcgcccaccg aaaccgaatt ctcttggaac 27600
aggcggctat taccaccaca cctcgtaata accttaatcc ccgtagttgg cccgctgccc 27660
tggtgtacca ggaaagtccc gctcccacca ctgtggtact tcccagagac gcccaggccg 27720
aagttcagat gactaactca ggggcgcagc ttgcgggcgg ctttcgtcac agggtgcggt 27780
cgcccgggca gggtataact cacctgacaa tcagagggcg aggtattcag ctcaacgacg 27840
agtcggtgag ctcctcgctt ggtctccgtc cggacgggac atttcagatc ggcggcgccg 27900
gccgctcttc attcacgcct cgtcaggcaa tcctaactct gcagacctcg tcctctgagc 27960
cgcgctctgg aggcattgga actctgcaat ttattgagga gtttgtgcca tcggtctact 28020
ttaacccctt ctcgggacct cccggccact atccggatca atttattcct aactttgacg 28080
cggtaaagga ctcggcggac ggctacgact gaatgttaag tggagaggca gagcaactgc 28140
gcctgaaaca cctggtccac tgtcgccgcc acaagtgctt tgcccgcgac tccggtgagt 28200
tttgctactt tgaattgccc gaggatcata tcgagggccc ggcgcacggc gtccggctta 28260
ccgcccaggg agagcttgcc cgtagcctga ttcgggagtt tacccagcgc cccctgctag 28320
ttgagcggga caggggaccc tgtgttctca ctgtgatttg caactgtcct aaccttggat 28380
tacatcaaga tctttgttgc catctctgtg ctgagtataa taaatacaga aattaaaata 28440
tactggggct cctatcgcca tcctgtaaac gccaccgtct tcacccgccc aagcaaacca 28500
aggcgaacct tacctggtac ttttaacatc tctccctctg tgatttacaa cagtttcaac 28560
ccagacggag tgagtctacg agagaacctc tccgagctca gctactccat cagaaaaaac 28620
accaccctcc ttacctgccg ggaacgtacg agtgcgtcac cggccgctgc accacaccta 28680
ccgcctgacc gtaaaccaga ctttttccgg acagacctca ataactctgt ttaccagaac 28740
aggaggtgag cttagaaaac ccttagggta ttaggccaaa ggcgcagcta ctgtggggtt 28800
tatgaacaat tcaagcaact ctacgggcta ttctaattca ggtttctcta gaatcggggt 28860
tggggttatt ctctgtcttg tgattctctt tattcttata ctaacgcttc tctgcctaag 28920
gctcgccgcc tgctgtgtgc acatttgcat ttattgtcag ctttttaaac gctggggtcg 28980
ccacccaaga taaccatgtg gctgcagagc ctgctgctct tgggcactgt ggcctgcagc 29040
atctctgcac ccgcccgctc gcccagcccc agcacgcagc cctgggagca tgtgaatgcc 29100
atccaggagg cccggcgtct cctgaacctg agtagagaca ctgctgctga gatgaatgaa 29160
acagtagaag tcatctcaga aatgtttgac ctccaggagc cgacctgcct acagacccgc 29220
ctggagctgt acaagcaggg cctgcggggc agcctcacca agctcaaggg ccccttgacc 29280
atgatggcca gccactacaa gcagcactgc cctccaaccc cggaaacttc ctgtgcaacc 29340
cagactatca cctttgaaag tttcaaagag aacctgaagg actttctgct tgtcatcccc 29400
tttgactgct gggagccagt ccaggagtaa tttactaagt tacaaagcta atgtcaccac 29460
taactgcttt acccgctgct tgcaaaacaa attcaaaaag ttagcattat aattagaata 29520

ggatttaaac cccccggtca tttcctgctc aataccattc ccctgaacaa ttgactctat 29580
gtgggatatg ctccagcgct acaaccttga agtcaggctt cctggatgtc agcatctgac 29640
tttggccagc acctgtcccg cggatttgtt ccagtccaac tacagcgacc caccctaaca 29700
gagatgacca acacaaccaa cgcggccgcc gctaccggac ttacatctac cacaaataca 29760
ccccaagttt ctgcctttgt caataactgg gataacttgg gcatgtggtg gttctccata 29820
gcgcttatgt ttgtatgcct tattattatg tggctcatct gctgcctaaa gcgcaaacgc 29880
gcccgaccac ccatctatag tcccatcatt gtgctacacc caaacaatga tggaatccat 29940
agattggacg gactgaaaca catgttcttt tctcttacag tatgattaaa tgagacatga 30000
ttcctcgagt ttttatatta ctgacccttg ttgcgctttt ttgtgcgtgc tccacattgg 30060
ctgcggtttc tcacatcgaa gtagactgca ttccagcctt cacagtctat ttgctttacg 30120
gatttgtcac cctcacgctc atctgcagcc tcatcactgt ggtcatcgcc tttatccagt 30180
gcattgactg ggtctgtgtg cgctttgcat atctcagaca ccatccccag tacagggaca 30240
ggactatagc tgagcttctt agaattcttt aattatgaaa tttactgtga cttttctgct 30300
gattatttgc accctatctg cgttttgttc cccgacctcc aagcctcaaa gacatatatc 30360
atgcagattc actcgtatat ggaatattcc aagttgctac aatgaaaaaa gcgatctttc 30420
cgaagcctgg ttatatgcaa tcatctctgt tatggtgttc tgcagtacca tcttagccct 30480
agctatatat ccctaccttg acattggctg gaaacgaata gatgccatga accacccaac 30540
tttccccgcg cccgctatgc ttccactgca acaagttgtt gccggcggct ttgtcccagc 30600
caatcagcct cgccccactt ctcccacccc cactgaaatc agctacttta atctaacagg 30660
aggagatgac tgacacccta gatctagaaa tggacggaat tattacagag cagcgcctgc 30720
tagaaagacg cagggcagcg gccgagcaac agcgcatgaa tcaagagctc caagacatgg 30780
ttaacttgca ccagtgcaaa aggggtatct tttgtctggt aaagcaggcc aaagtcacct 30840
acgacagtaa taccaccgga caccgcctta gctacaagtt gccaaccaag cgtcagaaat 30900
tggtggtcat ggtgggagaa aagcccatta ccataactca gcactcggta gaaaccgaag 30960
gctgcattca ctcaccttgt caaggacctg aggatctctg caccctttatt aagaccctgt 31020
gcggtctcaa agatcttatt ccctttaact aataaaaaaa aataataaag catcacttac 31080
ttaaaatcag ttagcaaatt tctgtccagt ttattcagca gcacctcctt gccctcctcc 31140
cagctctggt attgcagctt cctcctggct gcaaactttc tccacaatct aaatggaatg 31200
tcagtttcct cctgttcctg tccatccgca cccactatct tcatgttgtt gcagatgaag 31260
cgcgcaagac cgtctgaaga taccttcaac cccgtgtatc catatgacac ggaaaccggt 31320
cctccaactg tgccttttct tactcctccc tttgtatccc ccaatgggtt tcaagagagt 31380
ccccctgggg tactctcttg cgcctatccg aacctctagt tacctccaat ggcatgcttg 31440
cgctcaaaat gggcaacggc ctctctctgg acgaggccgg caaccttacc tcccaaaatg 31500
taaccactgt gagcccacct ctcaaaaaaa ccaagtcaaa cataaacctg gaaatatctg 31560
cacccctcac agttacctca gaagccctaa ctgtggctgc cgccgcacct ctaatggtcg 31620

cgggcaacac actcaccatg caatcacagg ccccgctaac cgtgcacgac tccaaactta 31680
gcattgccac ccaaggaccc ctcacagtgt cagaaggaaa gctagccctg caaacatcag 31740
gccccctcac caccaccgat agcagtaccc ttactatcac tgcctcaccc cctctaacta 31800
ctgccactgg tagcttgggc attgacttga aagagcccat ttatacacaa aatggaaaac 31860
taggactaaa gtacggggct cctttgcatg taacagacga cctaaacact ttgaccgtag 31920
caactggtcc aggtgtgact attaataata cttccttgca aactaaagtt actggagcct 31980
tgggttttga ttcacaaggc aatatgcaac ttaatgtagc aggaggacta aggattgatt 32040
ctcaaaacag acgccttata cttgatgtta gttatccgtt tgatgctcaa aaccaactaa 32100
atctaagact aggacagggc cctcttttta taaactcagc ccacaacttg gatattaact 32160
acaacaaagg cctttacttg tttacagctt caaacaattc caaaaagctt gaggttaacc 32220
taagcactgc caaggggttg atgtttgacg ctacagccat agccattaat gcaggagatg 32280
ggcttgaatt tggttcacct aatgcaccaa acacaaatcc cctcaaaaca aaaattggcc 32340
atggcctaga atttgattca aacaaggcta tggttcctaa actaggaact ggccttagtt 32400
ttgacagcac aggtgccatt acagtaggaa acaaaaataa tgataagcta actttgtgga 32460
ccacaccagc tccatctcct aactgtagac taaatgcaga gaaagatgct aaactcactt 32520
tggtcttaac aaaatgtggc agtcaaatac ttgctacagt ttcagttttg gctgttaaag 32580
gcagtttggc tccaatatct ggaacagttc aaagtgctca tcttattata agatttgacg 32640
aaaatggagt gctactaaac aattccttcc tggacccaga atattggaac tttagaaatg 32700
gagatcttac tgaaggcaca gcctatacaa acgctgttgg atttatgcct aacctatcag 32760
cttatccaaa atctcacggt aaaactgcca aaagtaacat tgtcagtcaa gtttacttaa 32820
acggagacaa aactaaacct gtaacactaa ccattacact aaacggtaca caggaaacag 32880
gagacacaac tccaagtgca tactctatgt cattttcatg ggactggtct ggccacaact 32940
acattaatga aatatttgcc acatcctctt acacttttc atacattgcc caagaataaa 33000
gaatcgtttg tgttatgttt caacgtgttt atttttcaat tgcagaaaat ttcaagtcat 33060
ttttcattca gtagtatagc cccaccacca catagcttat acagatcacc gtaccttaat 33120
caaactcaca gaaccctagt attcaacctg ccacctcccc cccaacacac agagtacaca 33180
gtcctttctc cccggctggc cttaaaaagc atcatatcat gggtaacaga catattctta 33240
ggtgttatat tccacacggt ttcctgtcga gccaaacgct catcagtgat attaataaac 33300
tccccgggca gctcacttaa gttcatgtcg ctgtccagct gctgagccac aggctgctgt 33360
ccaacttgcg gttgcttaac gggcggcgaa ggagaagtcc acgcctacat gggggtagag 33420
tcataatcgt gcatcaggat agggcggtgg tgctgcagca gcgcgcgaat aaactgctgc 33480
cgccgccgct ccgtcctgca ggaatacaac atggcagtgg tctcctcagc gatgattcgc 33540
accgcccgca gcataaggcg ccttgtcctc cgggcacagc agcgcaccct gatctcactt 33600
aaatcagcac agtaactgca gcacagcacc acaatattgt tcaaaatccc acagtgcaag 33660
gcgctgtatc caaagctcat ggcggggacc acagaaccca cgtggccatc ataccacaag 33720

cgcaggtaga ttaagtggcg acccctcata aacacgctgg acataaacat tacctctttt 33780
ggcatgttgt aattcaccac ctcccggtac catataaacc tctgattaaa catggcgcca 33840
tccaccacca tcctaaacca gctggccaaa acctgcccgc cggctataca ctgcagggaa 33900
ccgggactgg aacaatgaca gtggagagcc caggactcgt aaccatggat catcatgctc 33960
gtcatgatat caatgttggc acaacacagg cacacgtgca tacacttcct caggattaca 34020
agctcctccc gcgttagaac catatcccag ggaacaaccc attcctgaat cagcgtaaat 34080
cccacactgc agggaagacc tcgcacgtaa ctcacgttgt gcattgtcaa agtgttacat 34140
tcgggcagca gcggatgatc ctccagtatg gtagcgcggg tttctgtctc aaaaggaggt 34200
agacgatccc tactgtacgg agtgcgccga gacaaccgag atcgtgttgg tcgtagtgtc 34260
atgccaaatg gaacgccgga cgtagtcata tttcctgaag caaaaccagg tgcgggcgtg 34320
acaaacagat ctgcgtctcc ggtctcgccg cttagatcgc tctgtgtagt agttgtagta 34380
tatccactct ctcaaagcat caggcgcccc ctggcttcgg gttctatgta aactccttca 34440
tgcgccgctg ccctgataac atccaccacc gcagaataag ccacacccag ccaacctaca 34500
cattcgttct gcgagtcaca cacgggagga gcgggaagag ctggaagaac catgtttttt 34560
tttttattcc aaaagattat ccaaaacctc aaaatgaaga tctattaagt gaacgcgctc 34620
ccctccggtg gcgtggtcaa actctacagc caaagaacag ataatggcat ttgtaagatg 34680
ttgcacaatg gcttccaaaa ggcaaacggc cctcacgtcc aagtggacgt aaaggctaaa 34740
cccttcaggg tgaatctcct ctataaacat tccagcacct tcaaccatgc ccaaataatt 34800
ctcatctcgc caccttctca atatatctct aagcaaatcc cgaatattaa gtccggccat 34860
tgtaaaaatc tgctccagag cgccctccac cttcagcctc aagcagcgaa tcatgattgc 34920
aaaaattcag gttcctcaca gacctgtata agattcaaaa gcggaacatt aacaaaaata 34980
ccgcgatccc gtaggtccct tcgcagggcc agctgaacat aatcgtgcag gtctgcacgg 35040
accagcgcgg ccacttcccc gccaggaacc ttgacaaaag aacccacact gattatgaca 35100
cgcatactcg gagctatgct aaccagcgta gccccgatgt aagctttgtt gcatgggcgg 35160
cgatataaaa tgcaaggtgc tgctcaaaaa atcaggcaaa gcctcgcgca aaaaagaaag 35220
cacatcgtag tcatgctcat gcagataaag gcaggtaagc tccggaacca ccacagaaaa 35280
agacaccatt tttctctcaa acatgtctgc gggtttctgc ataaacacaa aataaaataa 35340
caaaaaaaca tttaaacatt agaagcctgt cttacaacag gaaaaacaac ccttataagc 35400
ataagacgga ctacggccat gccggcgtga ccgtaaaaaa actggtcacc gtgattaaaa 35460
agcaccaccg acagctcctc ggtcatgtcc ggagtcataa tgtaagactc ggtaaacaca 35520
tcaggttgat tcatcggtca gtgctaaaaa gcgaccgaaa tagcccgggg gaatacatac 35580
ccgcaggcgt agagacaaca ttacagcccc cataggaggt ataacaaaat taataggaga 35640
gaaaaacaca taaacacctg aaaaaccctc ctgcctaggc aaaatagcac cctcccgctc 35700
cagaacaaca tacagcgctt ccacagcggc agccataaca gtcagcctta ccagtaaaaa 35760
agaaaaccta ttaaaaaaac accactcgac acggcaccag ctcaatcagt cacagtgtaa 35820

aaaagggcca agtgcagagc gagtatatat aggactaaaa aatgacgtaa cggttaaagt 35880

ccacaaaaaa cacccagaaa accgcacgcg aacctacgcc cagaaacgaa agccaaaaaa 35940

cccacaactt cctcaaatcg tcacttccgt tttcccacgt tacgtcactt cccattttaa 36000

ttaagaaaac tacaattccc aacacataca agttactccg ccctaaaacc tacgtcaccc 36060

gccccgttcc cacgccccgc gccacgtcac aaactccacc ccctcattat catattggct 36120

tcaatccaaa ataaggtata ttattgatga tg 36152

<210> 4
<211> 582
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Recombinante

<400> 4

atgtggctgc agagcctgct gctcttgggc actgtggcct gcagcatctc tgcacccgcc 60

cgctcgccca gccccagcac gcagccctgg gagcatgtga atgccatcca ggaggcccgg 120

cgtctcctga acctgagtag agacactgct gctgagatga atgaaacagt agaagtcatc 180

tcagaaatgt ttgacctcca ggagccgacc tgcctacaga cccgcctgga gctgtacaag 240

cagggcctgc ggggcagcct caccaagctc aagggcccct tgaccatgat ggccagccac 300

tacaagcagc actgccctcc aaccccggaa acttcctgtg caacccagac tatcaccttt 360

gaaagtttca aagagaacct gaaggacttt ctgcttgtca tccccttga ctgctgggag 420

ccagtccagg aggctgtggg ccaggacacg caggaggtca tcgtggtgcc acactccttg 480

ccctttaagg tggtggtgat ctcagccatc ctggccctgg tggtgctcac catcatctcc 540

cttatcatcc tcatcatgct ttggcagaag aagccacgtt ag 582

<210> 5
<211> 1772
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Recombinante

<400> 5

atgaagcgcg caagaccgtc tgaagatacc ttcaaccccg tgtatcctat gacacggaaa 60
ccggtcctcc aactgtgcct tttcttactc ctccctttgt atcccccaat gggtttcaag 120
agagtccccc tggggtactc tctttgcgcc tatccgaacc tctagttacc tccaatggca 180
tgcttgcgct caaaatgggc aacggcctct ctctggacga ggccggcaac cttacctccc 240
aaaatgtaac cactgtgagc ccacctctca aaaaaaccaa gtcaaacata aacctggaaa 300
tatctgcacc cctcacagtt acctcagaag ccctaactgt ggctgccgcc gcacctctaa 360
tggtcgcggg caacacactc accatgcaat cacaggcccc gctaaccgtg cacgactcca 420
aacttagcat tgccacccaa ggacccctca cagtgtcaga aggaaagcta gccctgcaaa 480
catcaggccc cctcaccacc accgatagca gtacccttac tatcactgcc tcacccccctc 540
taactactgc cactggtagc ttgggcattg acttgaaaga gcccatttat acacaaaatg 600
gaaaactagg actaaagtac ggggctcctt tgcatgtaac agacgaccta aacactttga 660
ccgtagcaac tggtccaggt gtgactatta ataatacttc cttgcaaact aaagttactg 720
gagccttggg ttttgattca caaggcaata tgcaacttaa tgtagcagga ggactaagga 780
ttgattctca aaacagacgc cttatacttg atgttagtta tccgtttgat gctcaaaacc 840
aactaaatct aagactagga cagggccctc tttttataaa ctcagcccac aacttggata 900
ttaactacaa caaaggcctt tacttgttta cagcttcaaa caattccaaa aagcttgagg 960
ttaacctaag cactgccaag gggttgatgt ttgacgctac agccatagcc attaatgcag 1020
gagatgggct tgaatttggt tcacctaatg caccaaacac aaatcccctc aaaacaaaaa 1080
ttggccatgg cctagaattt gattcaaaca aggctatggt tcctaaacta ggaactggcc 1140
ttagttttga cagcacaggt gccattacag taggaaacaa aaataatgat aagctaacct 1200
tatggactgg aataaaccct ccacctaact gtcaaattgt ggaaaacact aatacaaatg 1260
atggcaaact tactttagta ttagtaaaaa atggagggct tgttaatggc tacgtgtctc 1320
tagttggtgt atcagacact gtgaaccaaa tgttcacaca aaagacagca aacatccaat 1380
taagattata ttttgactct tctggaaatc tattaactga ggaatcagac ttaaaaattc 1440
cacttaaaaa taaatcttct acagcgacca gtgaaactgt agccagcagc aaagccttta 1500
tgccaagtac tacagcttat cccttcaaca ccactactag ggatagtgaa aactacattc 1560
atggaatatg ttactacatg actagttatg atagaagtct atttcccttg aacatttcta 1620
taatgctaaa cagccgtatg atttcttcca atgttgccta tgccatacaa tttgaatgga 1680
atctaaatgc aagtgaatct ccagaaagca acatagctac gctgaccaca tccccctttt 1740
tcttttctta cattacagaa gacgacaact aa 1772

5

**REIVINDICACIONES**

1. Un recombinante de adenovirus oncolítico, en donde dicho recombinante comprende un virus esencial, un elemento regulador específico de células tumorales en donde el elemento regulador específico de células tumorales es el promotor hTERT selectivo de células tumorales de SEQ. ID NO: 2 y un gen inmunorregulador seleccionado de los genes IL-2, IL-10, IL-12, IL-15, IL-24, IL-25, GM-CSF, G-CSF, INF-alfa e INF-beta, siendo dicho virus esencial un adenovirus o una variante de adenovirus genéticamente mejorada seleccionada de:

i) un adenovirus en el cual sus genes E1A y E1B están enlazados por un sitio de entrada de ribosoma interno (IRES);

ii) un adenovirus en el cual su botón de fibra del serotipo 5 de adenovirus se ha reemplazado por el botón de fibra del serotipo 35 de adenovirus;

iii) un adenovirus en el cual un elemento terminal de la transcripción está insertado aguas abajo de la ITR y el sitio de empaquetamiento y aguas arriba del promotor hTERT;

iv) un adenovirus en el cual la secuencia codificante para 10,4 K, 14,5 K y 14,7 K en la región E3 del adenovirus ha sido delecionada; y

v) un adenovirus en el cual sus genes E1A y E1B están enlazados por un sitio de entrada de ribosoma interno (IRES), y su botón de fibra del serotipo 5 de adenovirus ha sido reemplazado por el botón de fibra del serotipo 35 de adenovirus, y un elemento terminal de la transcripción se ha insertado aguas abajo de la ITR y el sitio de empaquetamiento y aguas arriba del promotor hTERT.

2. El recombinante de la reivindicación 1, en donde el adenovirus se selecciona de los serotipos de adenovirus: Ad2, Ad5, Ad35 y Ad41.

3. El recombinante de la reivindicación 1, en donde el virus esencial es un adenovirus en el cual sus genes E1A y E1B están enlazados por un sitio de entrada de ribosoma interno (IRES).

4. El recombinante de la reivindicación 1, en donde el virus esencial es un adenovirus en el cual su botón de fibra del serotipo 5 de adenovirus ha sido reemplazado por el botón de fibra del serotipo 35 de adenovirus.

5. El recombinante de la reivindicación 1, en donde el virus esencial es un adenovirus en el cual un elemento terminal de la transcripción está insertado aguas abajo de la ITR y el sitio de empaquetamiento y aguas arriba del promotor hTERT.

6. El recombinante de la reivindicación 1, en donde el virus esencial es un adenovirus en el cual la secuencia codificante para 10,4 K, 14,5 K y 14,7 K en la región E3 del adenovirus ha sido delecionada.

7. El recombinante de la reivindicación 1, en donde el virus esencial es un adenovirus en el cual sus genes E1A y E1B están enlazados por un sitio de entrada de ribosoma interno (IRES), y su botón de fibra del serotipo 5 de adenovirus ha sido reemplazado por el botón de fibra del serotipo 35 de adenovirus, y se ha insertado un elemento terminal de la transcripción aguas abajo de la ITR y el sitio de empaquetamiento y aguas arriba del promotor hTERT.

8. El recombinante de la reivindicación 5, en donde dicho elemento terminal de la transcripción es la secuencia señal temprana poli(A) de SV40.

9. El recombinante de la reivindicación 1, en donde el virus esencial es un adenovirus mejorado, en el cual un elemento terminal de la transcripción se ha insertado aguas abajo de la ITR y el sitio de empaquetamiento y aguas arriba del promotor hTERT, la secuencia codificante para 10,4 K, 14,5 K y 14,7 K en la región E3 del adenovirus ha sido delecionada y el gen inmunorregulador es el gen GM-CSF.

10. El recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde el gen inmunorregulador es el gen GM-CSF.

11. El recombinante de la reivindicación 1, en donde el gen inmunorregulador es el gen GM-CSF humano.

12. El recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en donde dicho GM-CSF se encuentra en forma fijada a la membrana.

13. El recombinante de la reivindicación 1, en donde el virus esencial es un adenovirus mejorado, en el cual los genes E1A y E1B están enlazados por un sitio de entrada de ribosoma interno (IRES), y su botón de fibra del serotipo 5 de adenovirus ha sido reemplazado por el botón de fibra del serotipo 35 de adenovirus, y un elemento terminal de transcripción está insertado aguas abajo de la ITR y el sitio de empaquetamiento y aguas arriba del promotor hTERT y el gen inmunorregulador es el gen GM-CSF.

14. El recombinante de la reivindicación 1, en donde el virus esencial es un adenovirus mejorado, en el cual se ha insertado un elemento terminal de la transcripción aguas abajo de la ITR y el sitio de empaquetamiento y aguas arriba del promotor hTERT y el gen inmunorregulador es el gen GM-CSF.

15. El recombinante de la reivindicación 1, en donde el virus esencial es un adenovirus mejorado, en el cual se ha reemplazado el botón de fibra del serotipo 5 por el botón de fibra del serotipo 35, el elemento regulador específico de las células tumorales es el promotor hTERT y el gen inmunorregulador es el gen GM-CSF.

16. El recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15, en donde el gen inmunorregulador es GM-CSF en su forma fijada a la membrana.

17. Un promotor, que tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ. ID NO: 2.

18. Una composición farmacéutica, que comprende el recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16.

19. La composición farmacéutica de la reivindicación 18, formulada para aplicación por inyección.

20. La composición farmacéutica de la reivindicación 18, en donde la composición es para aplicación junto con quimioterapia y radioterapia.

21. El uso del recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 en la fabricación de un medicamento para prevención y/o tratamiento de tumores.

22. El recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 para prevención y/o tratamiento de tumores.

23. Un método de preparación del recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, que comprende los pasos siguientes:

a) generar la rama izquierda de adenovirus que contiene la secuencia promotora hTERT de SEQ ID NO: 2;

b) generar la rama derecha de adenovirus que contiene el gen inmunorregulador; y

c) co-transfectar el DNA plasmídico de la rama derecha y la rama izquierda en células 293, HeLa, HeLa-S3 o A549, y generar el recombinante por recombinación homóloga.

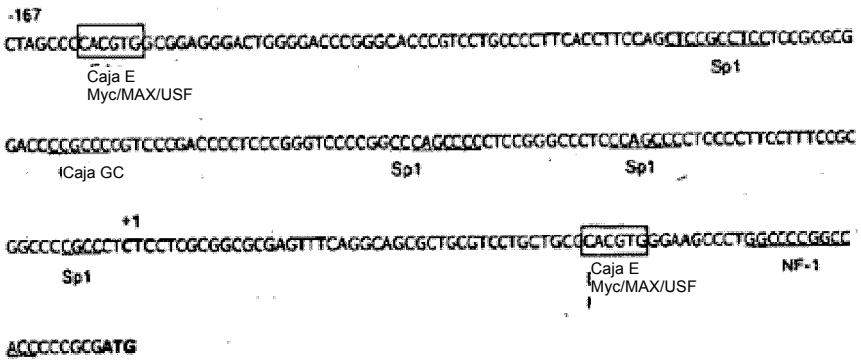
-167
CTAGCCCCACGTGGCGGAGGGACTGGGGACCCGGGCACCCGTCCTGCCCCTTCACCTTCCAGCTCCGCCTCCTCCGCGCG
Caja E
Myc/MAX/USF
Sp1
GACCCCGCCCCGTCCCGACCCCTCCCGGGTCCCCGGCCCAGCCCCCTCCGGGCCCTCCCAGCCCCTCCCCTTCCTTTCCGC
Caja GC
Sp1
Sp1
+1
GGCCCCGCCCTCTCCTGCGGCGCGAGTTTCAGGCAGCGCTGCGTCCTGCTGCCACGTGGGAAGCCCTGGCCCCGGCC
Sp1
Caja E
Myc/MAX/USF
NF-1
ACCCCCGCGATG

Fig. 1.

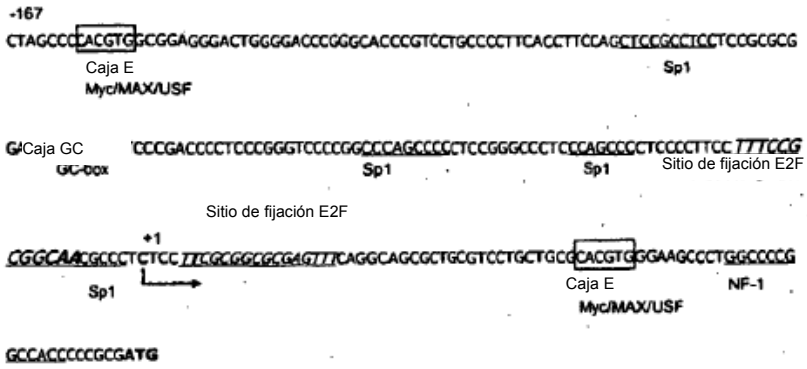
-167
CTAGCCCCACGTGGCGGAGGGACTGGGGACCCGGGCACCCGTCCTGCCCCTTCACCTTCCAGCTCCGCCTCCTCCGCGCG
Caja E
Myc/MAX/USF
Sp1
GCaja GC
GC-box
CCCGACCCCTCCCGGGTCCCCGGCCCAGCCCCTCCGGGCCCTCCCAGCCCCTCCCCTTCCTTTCCG
Sp1
Sp1
Sitio de fijación E2F
Sitio de fijación E2F
+1
CGGCAACGCCCTCTCCTTCGCGGGCGCGAGTTTCAGGCAGCGCTGCGTCCTGCTGCGCACGTGGGAAGCCCTGGCCCCG
Sp1
Caja E
Myc/MAX/USF
NF-1
GCCACCCCCGCGATG

Fig. 2

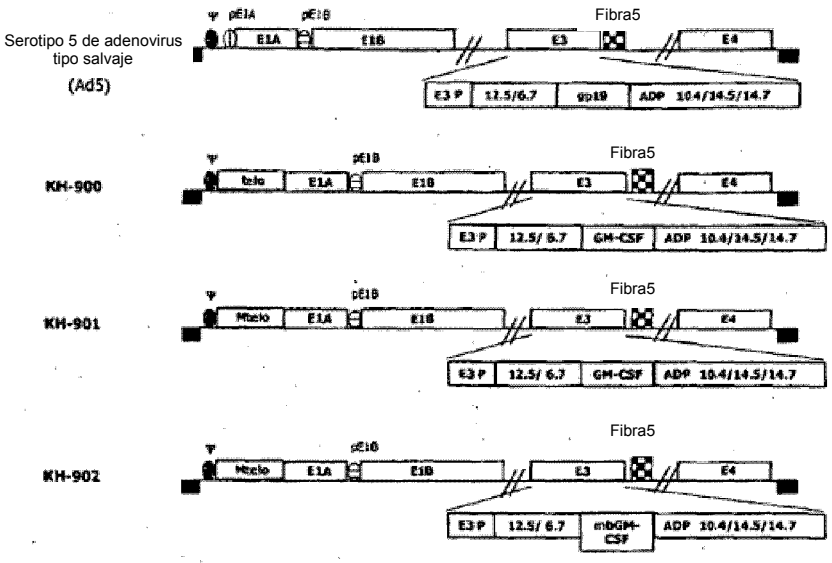
Serotipo 5 de adenovirus tipo salvaje
(Ad5)
Fibra5
KH-900
KH-901
KH-902
E1A
E1B
E3
E4
E3 P
12.5/6.7
gp19
ADP 10.4/14.5/14.7
Mtelo
GM-CSF
mbGM-CSF

Fig. 3-1

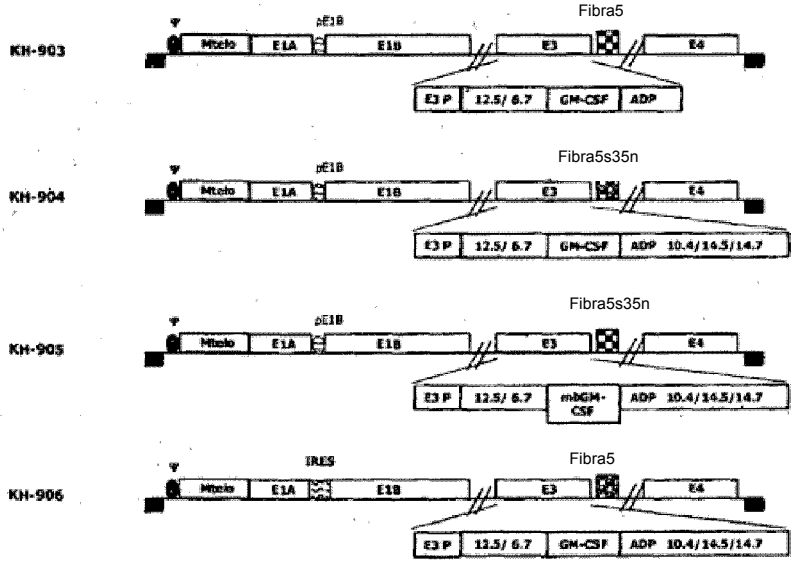
KH-903
KH-904
KH-905
KH-906
Fibra5
Fibra5s35n
IRES
E1A
E1B
E3
E4
E3 P
12.5/ 6.7
GM-CSF
ADP
ADP 10.4/14.5/14.7
mbGM-CSF
Mtelo

Fig. 3-2

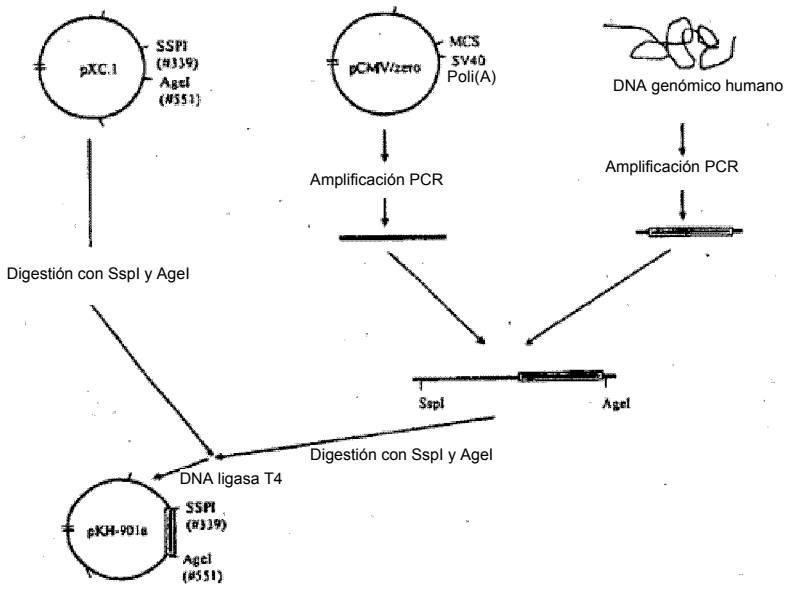
pXC.1
SSPI (#339)
AgeI (#551)
pCMV/zero
MCS
SV40 Poli(A)
DNA genómico humano
Amplificación PCR
Amplificación PCR
Digestión con SspI y AgeI
SspI
AgeI
Digestión con SspI y AgeI
DNA ligasa T4
pKH-901a
SSPI (#339)
AgeI (#551)

Fig. 4-1

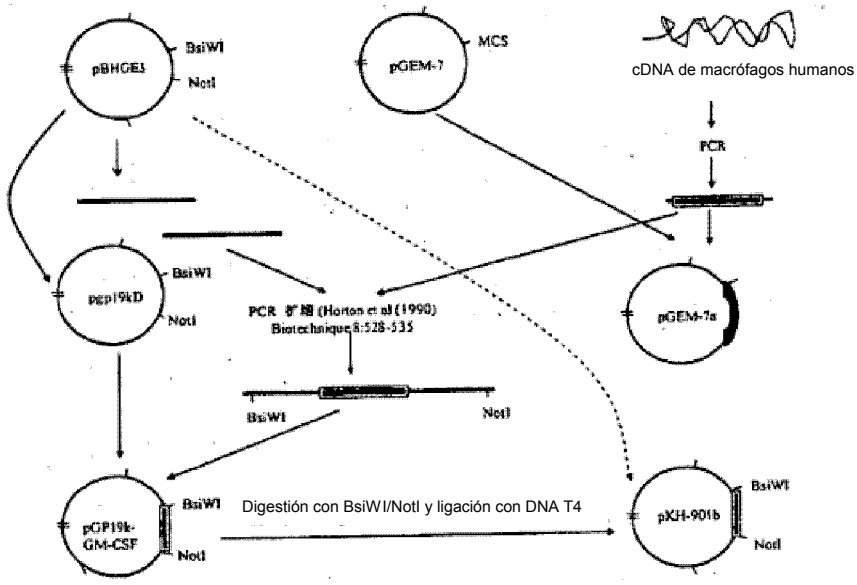
pBHGE3
BsiWI
NotI
pGEM-7
MCS
cDNA de macrófagos humanos
PCR
pgp19kD
BsiWI
NotI
PCR
BsiWI
NotI
pGEM-7a
pGP19k-GM-CSF
BsiWI
NotI
Digestión con BsiWI/NotI y ligación con DNA T4
pKH-901b
BsiWI
NotI

Fig. 4-2

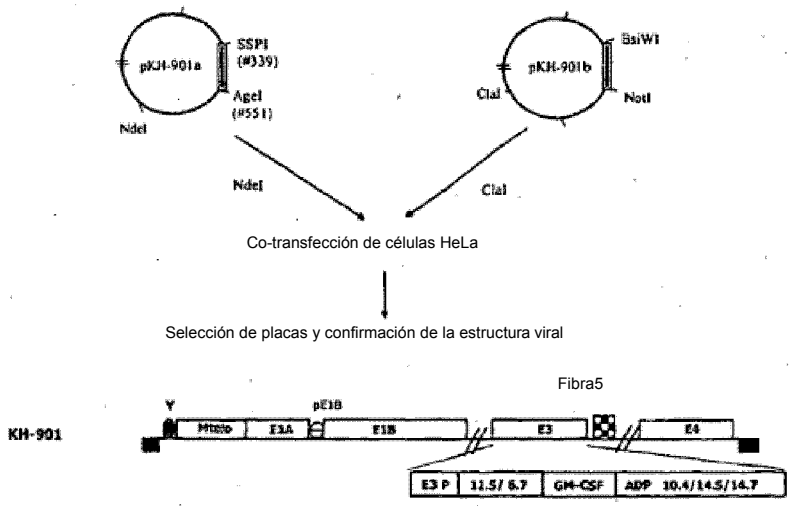
pKH-901a
SSPI
(#339)
AgeI
(#551)
NdeI
pKH-901b
BsiWI
ClaI
NotI
NdeI
ClaI
Co-transfección de células HeLa
Selección de placas y confirmación de la estructura viral
KH-901
Fibra5
Y
pE1B
E3A
E1B
E3
E4
E3 P
11.5/ 6.7
GM-CSF
ADP 10.4/14.5/14.7

Fig. 4-3

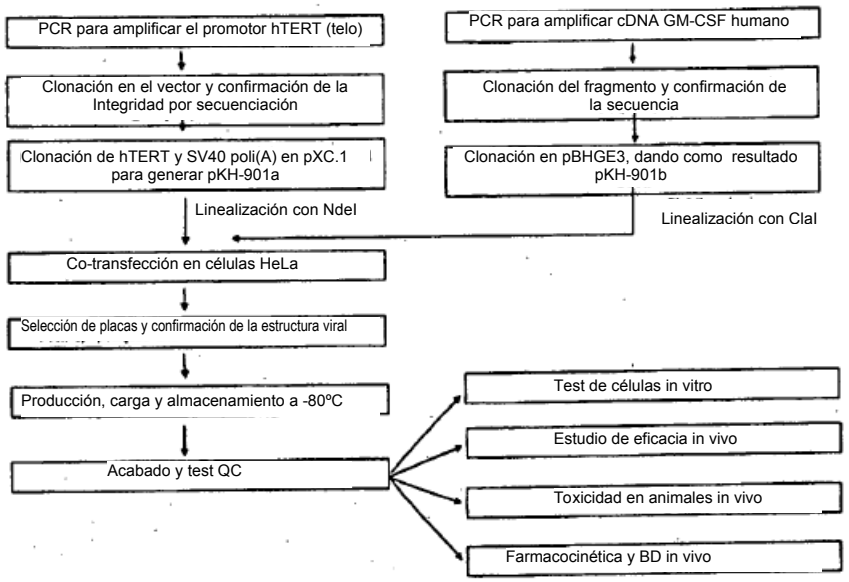
PCR para amplificar el promotor hTERT (telo)
Clonación en el vector y confirmación de la Integridad por secuenciación
Clonación de hTERT y SV40 poli(A) en pXC.1 para generar pKH-901a
Linealización con NdeI
PCR para amplificar cDNA GM-CSF humano
Clonación del fragmento y confirmación de la secuencia
Clonación en pBHGE3, dando como resultado pKH-901b
Linealización con ClaI
Co-transfección en células HeLa
Selección de placas y confirmación de la estructura viral
Producción, carga y almacenamiento a -80ºC
Acabado y test QC
Test de células in vitro
Estudio de eficacia in vivo
Toxicidad en animales in vivo
Farmacocinética y BD in vivo

Fig. 5

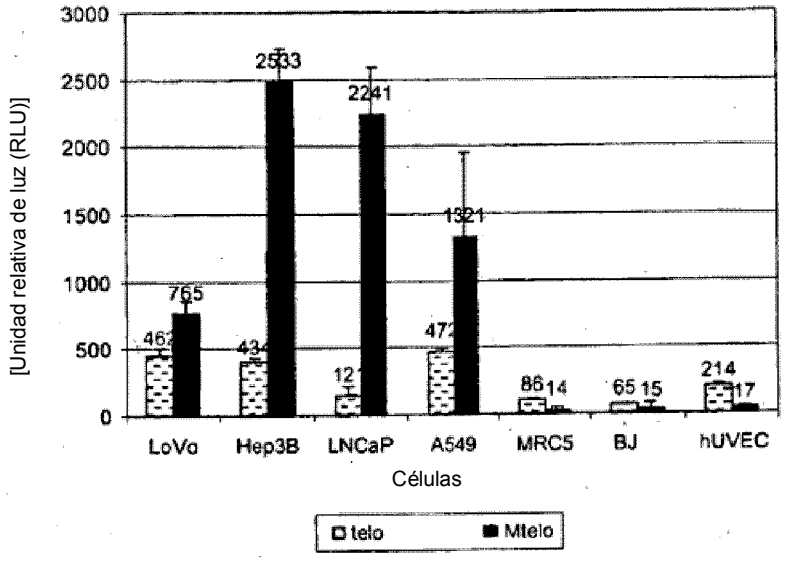
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
[Unidad relativa de luz (RLU)]
2533
2241
1321
765
462
434
121
472
86
14
65
15
214
17
LoVo
Hep3B
LNCaP
A549
MRC5
BJ
hUVEC
Células
telo
Mtelo

Fig. 6

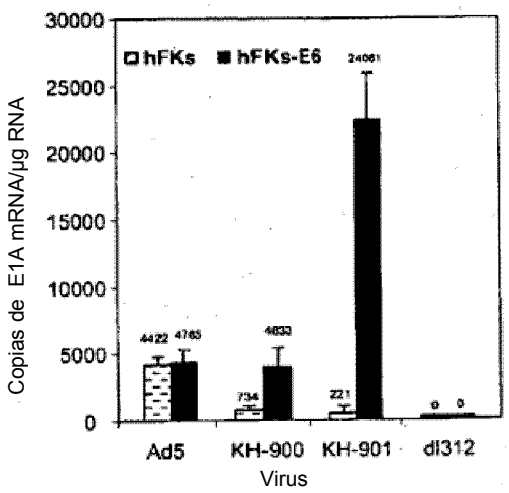
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
hFKs
hFKs-E6
Copias de E1A mRNA/µg RNA
4422
4765
734
4833
221
24061
0
0
Ad5
KH-900
KH-901
dl312
Virus

Fig. 7

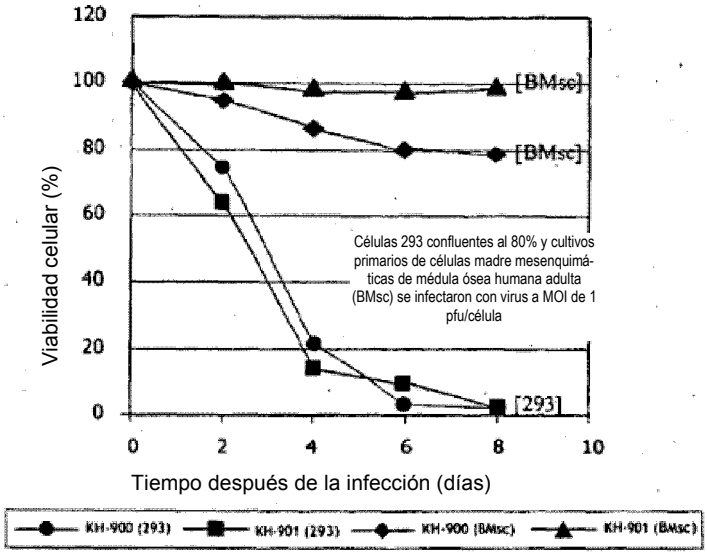
120
100
80
60
40
20
0
Viabilidad celular (%)
[BMsc]
[BMsc]
[293]
Células 293 confluentes al 80% y cultivos primarios de células madre mesenquimáticas de médula ósea humana adulta (BMsc) se infectaron con virus a MOI de 1 pfu/célula
0
2
4
6
8
10
Tiempo después de la infección (días)
KH-900 (293)
KH-901 (293)
KH-900 (BMsc)
KH-901 (BMsc)

Fig. 8

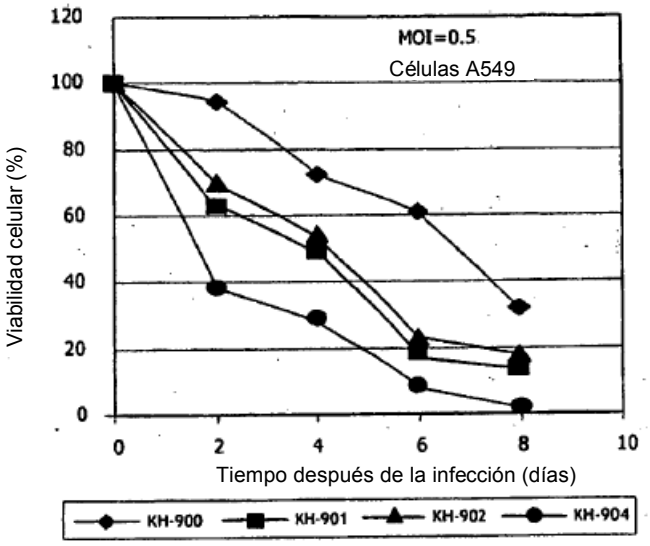
MOI=0.5
Células A549
Viabilidad celular (%)
120
100
80
60
40
20
0
0
2
4
6
8
10
Tiempo después de la infección (días)
KH-900
KH-901
KH-902
KH-904

Fig. 9

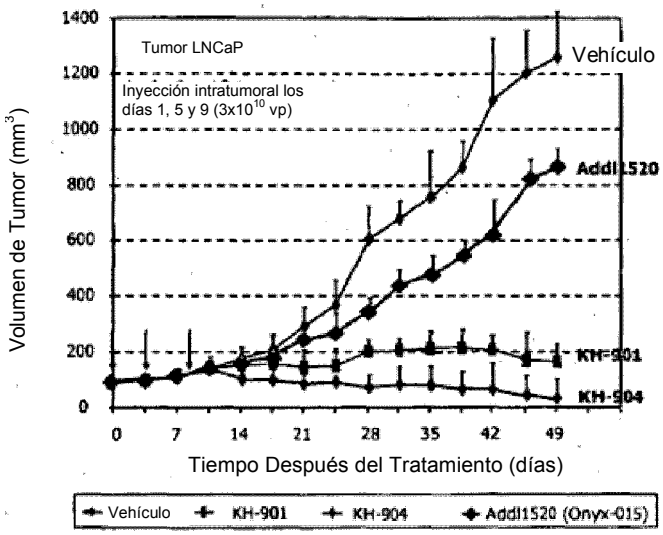
Tumor LNCaP
Inyección intratumoral los días 1, 5 y 9 (3x10^10 vp)
Vehículo
Addl1520
KH-901
KH-904
Volumen de Tumor (mm^3)
Tiempo Después del Tratamiento (días)
Vehículo
KH-901
KH-904
Addl1520 (Onyx-015)

Fig. 10