

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 667 622**

51 Int. Cl.:

A61K 35/76 (2015.01)

C07K 14/005 (2006.01)

C12N 7/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.05.2008** **E 13168599 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.04.2018** **EP 2700405**

54 Título: **Virus del herpes simple (VHS) con tropismo modificado, utilizaciones y procedimiento de preparación del mismo**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.05.2018

73 Titular/es:

**ALMA MATER STUDIORUM - UNIVERSITÀ DI
BOLOGNA (100.0%)
Via Zamboni, 33
40126 Bologna, IT**

72 Inventor/es:

**CAMPADELLI, MARIA GABRIELLA y
MENOTTI, LAURA**

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

Observaciones :

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

ES 2 667 622 T3

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

DESCRIPCIÓN

Virus del herpes simple (VHS) con tropismo modificado, utilizaciones y procedimiento de preparación del mismo

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un virus de herpes simple modificado (VHS), a las utilizaciones del VHS modificado, a una preparación farmacéutica y a un procedimiento de preparación de un VHS modificado.

10 **Antecedentes**

Una nueva frontera en el tratamiento de tumores es la viroterapia oncolítica, por la que un virus competente en replicación infecta las células tumorales, se propaga de célula a célula del tumor y las destruye. Dos de dichos tumores son los cánceres de mama y de ovario, que afectan a los animales tales como los seres humanos. Alrededor del 30% de los tumores de mama humanos, así como algunos tumores de ovario, son muy malignos y metastásicos.

Estos tumores deben su alto grado de malignidad y metastasicidad a la expresión de un receptor específico de moléculas de la superficie celular, denominado HER2, que pertenece a la familia de receptores del factor de crecimiento epidérmico, y generalmente se tratan con cirugía o cirugía y radioterapia combinadas o quimioterapia.

El VHS es un virus patógeno para las células de mamíferos [VHS-1 se describe, por ejemplo en Ejercito, P. M., *et al.* (1968). *J. Gen Virol.* 2:357 y su genoma tiene el número de registro NC-001806 (GenBank)].

El VHS se introduce en las células por un proceso de varias etapas. La primera etapa es la fijación a la superficie celular, mediada por la interacción de las glucoproteínas gB y gC (Laquerre S., Argnani R., Anderson D. B., Zucchini S., Manservigi R., Glorioso J. C. (1998), *J. Virol.* 72 (7): 6119-30). Esto va seguido de la interacción más específica de la glucoproteína D (gD) de la envoltura del virión con uno de sus receptores de entrada: nectina1/ HveC, HVEM/HveA y restos sulfatados de sulfato de heparán enlazados por O (Spear P. G., Eisenberg R. J., Cohen G. H., (2000) *Virology* 275:1-9) (Campadelli-Fiume G., Cocchi F., Menotti L., López M. (2000) *Reviews in Medical Virology*, 10:305-319) (Campadelli-Fiume G. *et al.* (2007) *Rev. Med. Virol.*, 17:313-326) (los códigos de GenBank para los receptores son los siguientes: nectina1 alfa AF060231, nectina1 beta AF110314, HVEM U70321).

En los últimos años, se ha intentado utilizar VHS genéticamente modificados como agentes oncolíticos principalmente para el tratamiento del glioma maligno. Dado que los virus naturales son virulentos, atacan y destruyen muchas células y tejidos diferentes, los VHS oncolíticos experimentales se han atenuado mucho. Los virus que han alcanzado los ensayos clínicos se hicieron dependientes para su replicación en la célula tumoral en división mediante la eliminación de dos genes de VHS, es decir, el gen gamma 43.5 - que codifica la proteína ICP34.5 cuya función es impedir la interrupción de la síntesis de proteínas en las células infectadas, y el gen UL39 - que codifica la subunidad grande de la ribonucleótido reductasa. Estos virus están dañados por la baja capacidad de replicarse, incluso en células en división, una característica que da lugar a dos efectos negativos. En primer lugar, la administración de dichos virus a los tumores no produce un alto rendimiento de la descendencia de los virus, capaces de propagarse de célula a célula del propio tumor, y por lo tanto ampliar la respuesta a cualquier dosis terapéutica dada del virus. En segundo lugar, los virus son difíciles de cultivar y apenas se pueden producir a gran escala (10^8 - 10^9 unidades formadoras de placas UFP/ml) para producir la cantidad de virus requerida para aplicaciones clínicas. Por otra parte, la capacidad conservada del virus para unirse a cualquier célula que lleva uno de los receptores naturales para el VHS sustrae el virus a los tejidos tumorales que más lo necesitan y disminuye el efecto terapéutico de la destrucción de células tumorales, y puede ejercer la infección no deseada de tejidos y células no cancerosas, incluyendo su muerte por apoptosis. Se señala que, incluso si estos virus se redirigían a los receptores específicos de tumores – están no obstante muy atenuados.

Recientemente VHS redirigidos a receptores específicos se han modificado genéticamente para que puedan infectar células que necesitan ser destruidas mientras se mantiene una alta capacidad de replicarse y propagarse de célula a célula. Aunque dichos virus tienen una buena capacidad de propagarse entre las células tumorales, todavía infectan indeseablemente tejidos y células no cancerosas.

La solicitud de patente con número de publicación WO2004/033639, da a conocer un VHS recombinante, que expresa en su envoltura glucoproteica una citocina natural. Aunque la utilización de VHS recombinante de este tipo ha sido propuesta para el tratamiento de tumores, es importante hacer hincapié en que: el receptor diana tiene el ligando natural de pequeño tamaño tal que puede insertarse fácilmente en gD, y el VHS recombinante propuesto es todavía capaz de interactuar con los receptores nectina1/HVEC y HVEM/HveA. En particular, el documento WO2004/033639 no consigue identificar mutaciones que podrían resultar en un VHS recombinante que ya no es capaz de unir nectina1/HveC y es capaz de unir receptores (tales como HER2/ErbB2) de células enfermas.

De ello se deduce que existe una necesidad todavía en la técnica de agentes terapéuticos víricos dirigidos

selectivamente a células que necesitan ser destruidas. En particular, existe una necesidad de agentes terapéuticos víricos dirigidos a receptores que no tienen ningún ligando natural, y se sobreexpresan o se expresan selectivamente en las células enfermas, tales como las células cancerosas.

5 Sumario

Un objetivo de la presente invención consiste en proporcionar un VHS modificado diseñado para eliminar al menos en parte, los inconvenientes de la técnica conocida, y que, al mismo tiempo, son fáciles de aplicar.

10 Otros objetivos de la presente invención consisten en proporcionar utilizaciones del VHS modificado mencionado, preparados farmacéuticos, y un procedimiento de preparación del VHS modificado.

A menos que se especifique explícitamente lo contrario, los siguientes términos tienen el significado que a continuación se indica.

15 Como se emplea en la presente memoria, "anticuerpo monocatenario" (scFv) se refiere al anticuerpo monocatenario "apropiadamente denominado" (es decir, que tiene dos dominios conectados por un enlazador) u otros derivados de anticuerpos similares (por ejemplo, dominios individuales de tipo V). Ventajosamente, los "anticuerpos monocatenarios" se "denominan apropiadamente" anticuerpos monocatenarios. Un ejemplo no limitativo de un anticuerpo monocatenario "apropiadamente denominado" es scHER2 (descrito en los ejemplos presentados a continuación).

20 Como se emplea en la presente memoria, "porcentaje de identidad" o "% de identidad" entre dos secuencias de aminoácidos o de nucleótidos se refiere al porcentaje de restos de aminoácidos o nucleótidos idénticos en las posiciones correspondientes en las dos secuencias alineadas de manera óptima.

25 Para establecer el "porcentaje de identidad" de las dos secuencias de aminoácidos o de nucleótidos se alinean las secuencias; para tener una alineación óptima, son posibles espacios (supresiones o inserciones - que posiblemente pueden estar situadas en los extremos de las secuencias). Se comparan los restos de aminoácidos o de nucleótidos. Cuando una posición en la primera secuencia está ocupada por el mismo resto de aminoácido o nucleótido que ocupa la posición correspondiente en la segunda secuencia, las moléculas son idénticas en esa posición. El "porcentaje de identidad" entre dos secuencias es función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias [es decir, % de identidad = (número de posiciones idénticas / número de posiciones totales x 100)].

35 De acuerdo con las formas de realización ventajosas, las secuencias tienen la misma longitud (mismo número de restos de aminoácidos o nucleótidos).

40 Favorablemente, las secuencias comparadas no tienen espacios. El porcentaje de identidad se puede obtener empleando algoritmos matemáticos. Un ejemplo no limitativo de un algoritmo matemático, que se emplea para comparar dos secuencias es el algoritmo de Karlin y Altschul [*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87 (1990) 2264-2268] modificado por Karlin y Altschul [*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 (1993) 5873-5877].

45 Para obtener alineaciones también en presencia de uno o más espacios, es posible utilizar métodos que proporcionan una penalización relativamente alta a cada espacio y una penalización más baja a cada resto de aminoácido o nucleótido (dicho resto de aminoácido o nucleótido adicional se define como una extensión del espacio). Resultan grandes penalizaciones, obviamente, en alineaciones óptimas con un menor número de espacios.

50 Un ejemplo de un programa (*software*) diseñado para hacer dicho tipo de alineación es el programa BLAST como se describe en Altschul, *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 25 (1997) 3389-3402. Con este propósito pueden utilizarse los programas BLASTn y BLASTp con parámetros por defecto. En los programas BLAST se utiliza generalmente la matriz BLOSUM62.

55 Un ejemplo ventajoso y no limitativo de un programa para la obtención de una alineación óptima es el paquete GCG Winsconsin Bestfit (Universidad de Winsconsin, USA; Devereux *et al.*, 1984, *Nucleic Acids Research* 12:387). También en este caso, se utilizan los parámetros por defecto (que proporcionan una penalización de -12 a cada espacio y una penalización de -4 a cada extensión).

60 Tal como se utiliza en la presente memoria, "porcentaje de homología" o "% de homología" entre dos secuencias de aminoácidos o de nucleótidos se refiere al porcentaje de restos de aminoácidos o de nucleótidos homólogos en las posiciones correspondientes en las dos secuencias alineadas de manera óptima.

65 El "porcentaje de homología" entre dos secuencias se establece de una manera sustancialmente idéntica a la descrita anteriormente haciendo referencia a la determinación del "porcentaje de identidad" con la excepción de que en el cálculo se consideran también posiciones homólogas y no sólo posiciones idénticas.

En lo que se refiere a secuencias de nucleótidos, dos posiciones homólogas pueden tener dos nucleótidos diferentes, pero estos dos nucleótidos, en el codón respectivo, codificar el mismo aminoácido.

En lo que se refiere a secuencias de aminoácidos, dos posiciones homólogas tienen dos aminoácidos idénticos u homólogos. Los restos de aminoácidos homólogos tienen propiedades fisicoquímicas similares, por ejemplo, aminoácidos que pertenecen a un mismo grupo: aromáticos (Phe, Trp, Tyr), ácidos (Glu, Asp), polares (Gln, Asn), básicos (Lys, Arg, His), alifáticos (Ala, Leu, Ile, Val), con un grupo hidroxilo (Ser, Thr), con una cadena lateral corta (Gly, Ala, Ser, Thr, Met). Es de esperar que dichas sustituciones entre aminoácidos homólogos no cambien un fenotipo de proteína (sustituciones conservadoras de aminoácidos).

Unos ejemplos específicos de sustituciones conservadoras en este campo de la técnica se dan a conocer en varias referencias [por ejemplo, Bowie *et al.*, *Science*, 247:1306-1310 (1990)].

Se citan otros ejemplos de programas y/o artículos relacionados con el establecimiento de alineaciones y/o porcentajes óptimos de homología y/o identidad, por ejemplo, en los documentos US2008003202, US2007093443, WO2006048777 y WO2007149406.

Como se emplea en la presente memoria, "posición correspondiente" se refiere a una posición de una secuencia de aminoácidos o de nucleótidos correspondiente (enfrentadas), una vez que se ha realizado una alineación, para una posición dada de una secuencia de referencia.

Por ejemplo, una posición correspondiente a una posición dada de gD que tiene la SEC. ID. nº: 1 se puede identificar alineando la SEC. ID. nº: 1 con una secuencia peptídica de interés, la alineación puede obtenerse ya sea manualmente o como anteriormente se ha descrito en referencia a la determinación del porcentaje de identidad.

Como se emplea en la presente memoria, "una cadena polipeptídica desnuda" se refiere a un polipéptido que no se modifica después de la traducción o dicho de otra manera no se modifica químicamente, pero contiene sólo aminoácidos unidos por enlaces covalentes.

Como se emplea en la presente memoria, "ligando capaz de unirse en condiciones específicas a un receptor" se refiere a un ligando que, cuando se inserta en el VHS mediante técnicas de biología molecular, permite al VHS penetrar en una célula por interacción con este receptor, que el ligando está diseñado para unirse. En particular, el ligando es capaz de unirse en las condiciones específicas a un receptor, cuando el VHS, que lo contiene, es capaz de interactuar con ese receptor que pasa las pruebas descritas en el ejemplo 5 descrito a continuación o los ensayos análogos (con diferentes receptores).

Tal como se emplea en la presente memoria, "capacidad de VHS (en particular, el VHS modificado) de interactuar con un receptor" se refiere a la capacidad del VHS de penetrar en una célula por interacción con ese receptor. En particular, también en este caso, esta capacidad se evalúa por medio de las pruebas dadas a conocer en el ejemplo 5 descrito a continuación o los ensayos análogos (para diferentes receptores).

Breve descripción de las figuras

Las formas de realización no limitativas de la presente invención se describirán a título de ejemplo haciendo referencia a los dibujos adjuntos, en los que:

- La figura 1A muestra la representación esquemática de los genomas recombinantes de VHS-BAC descritos. El eje central de gDminus-EGFP-VHS-BAC se muestra como ejemplo. Se muestra el eje central de gDminus-EGFP-VHS-BAC. El VHS-BAC procede de pYebac102 Tanaka, M., H. Kagawa, Y. Yamanashi, T. Sata e Y. Kawaguchi. 2003. El montaje de un cromosoma artificial bacteriano escindible que contiene un clon infeccioso completo del virus del herpes simple tipo 1: los virus reconstituidos a partir del clon presentan propiedades naturales *in vitro* e *in vivo*. *J. Virol.* 77:1382-91. [Tanaka, 2003 nº: 672], que lleva secuencias de pBeloBACII insertadas entre UL3 y UL4. En gDminus-EGFP-VHS-BAC se inserta la casete indicadora (a27-EGFP) en las secuencias de BAC. gDminus-LacZ-VHS-BAC tiene la misma estructura, pero lleva LacZ en lugar de EGFP.
- La figura 1B muestra unas representaciones esquemáticas de cartografías lineales de wt-gD (a) y de las proteínas híbridas gD: (b) de gD de R-LM31 recombinante, que lleva sustitución en el resto 34 de aminoácido; (c) de gD de R-LM39 recombinante, que lleva mutaciones en los restos 34, 215, 222 y 223 de aminoácidos; (d) de gD de R-LM113 recombinante, que lleva scHER2L en lugar de los restos 6-38 de aminoácidos, (e) de gD de R-LM249 recombinante, que lleva LscHER2L en lugar de los restos 61 a 218 de aminoácidos. Los números en negrita indican la longitud en restos de aminoácidos de cada fragmento. Los números corrientes se refieren a los restos de aminoácidos según las coordenadas en wt-gD. L, enlaces. TM, el dominio transmembranario de gD. V_H y V_L, dominios variables de las cadenas pesada y ligera de los anticuerpos 4D5 anti-HER2/neu. Δ, supresión. Las barras están dibujadas a escala.

- La figura 2 muestra que el virus recombinante R-LM31 no está desorientado del receptor nectina1. Las micrografías de células J negativas para el receptor (A), y J-HER2 (B), J-hNectin1 (C) y J-mNectin1 (D) que expresan HER2 humano, y nectina1 humana o murina, respectivamente, se expusieron a R-LM31 en células 10 UFP. La infección se controló como actividad de β -galactosidasa por tinción con X-gal *in situ* 16 h después de la infección. E. La movilidad E. electroforética de natural y de las gD híbridas se expresó en células SKOV3 infectadas con virus recombinantes R-LM5, R-LM13, LM31-R, R-LM39, R-LM113 y R-LM249. Se separaron por SDS-PAGE los lisados de células infectadas, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa, y se visualizaron mediante quimioluminiscencia intensificada. Los números a la izquierda representan las posiciones de migración de los marcadores de peso molecular (en kilodaltons). Las flechas indican la movilidad electroforética aparente de las gD naturales o híbridos. De abajo a arriba, gD natural (wt-gD) expresada por el virus recombinante R-LM5, gD (Δ 61-218)-LscHER2L expresada por el virus recombinante R-LM249, gD (Δ 6-38)-scHER2L expresada por el virus recombinante R- LM113. La migración de gD-scHER2L expresada por R-LM13, R-LM31 y R-LM39 es indiscernible de la de gD (Δ 6-38)-scHER2L.
- La figura 3 muestra la infección de una variedad de estirpes celulares con los virus recombinantes R-LM113 y R-LM249. Las monocapas de las estirpes celulares indicadas se infectaron a células 5 UFP, y la expresión del gen indicador EGFP se midió 24 después mediante un fluorómetro. Los números a la izquierda indican la intensidad de EGFP en unidades arbitrarias.
- La figura 4 muestra el crecimiento de los virus recombinantes R-LM39, R-LM113 y R-LM249 y de referencia R-LM5 y R-LM13. (A a G) Replican cultivos de J (A), J-Nectin1 (B), J-HVEM (C), J-HER2 (D), SKOV3 (E), I-143 tk⁻ (F), o HEp-2 (G) se infectaron células con virus recombinantes R-LM5 (■), R-LM13 (●), R-LM39 (Δ), R-LM113 (x) o R-LM249 (▲) a 1 UFP/célula. La descendencia del virus se recogió a las 3, 24 y 48 h después de la infección y se valoró en células SKOV3.
- La figura 5 muestra el bloque de la infección de las células SKOV3 con R-LM39 (A), R-LM113 (B) o R-LM249 (C) por los anticuerpos a HER2 (Herceptina) o nectina1 (R1.302). Se preincubaron células SKOV3 con las concentraciones indicadas de IgG purificada de Herceptina (Δ), R1.302 (O) o la combinación de Herceptina más R1.302 (●) o IgG de ratón irrelevantes (x) durante 2 horas a 4°C. Se añadió el virus al anticuerpo que contiene el medio y se dejó adsorber a las células durante 90 min a 4°C. Se controló la infección 16 h después como expresión de EGFP. El cien por ciento indica las lecturas de EGFP en los cultivos sin tratar infectados por virus.
- La figura 6A muestra la inhibición de la propagación de célula a célula por Herceptina. Las células SKOV3 infectadas con diluciones en serie de los virus indicados se cubrieron con medio que contiene con 1% de agarosa Seaplaque $\pm$ 10 μ g/ml Herceptina. Se fotografió cada una de las placas a las 48 h, y las áreas de las placas se midieron mediante el programa herramienta Photoshop Histogram y se expresaron en píxeles $\times 10^3$. Para cada virus, se midieron las áreas de 4 o 5 placas. Los histogramas representan promedios; barras de error, desviaciones estándar.
- La figura 6B muestra las placas representativas a las que se hace referencia con respecto a la figura 6A.
- Las figuras 7 a 15 muestran cartografías de los siguientes plásmidos: pLM5, pLM13 (scHER2L entre los aa 24 y 25 de gD madura), pLM13 (obtenido por mutagenia de pLM13 para introducir la sustitución V34S), pS31 (plásmido lanzadera obtenido por subclonación del fragmento NruI-PmeI procedente del pLM31 en SmaI de pST76KSR), PS39 (plásmido lanzadera obtenido por mutagenia de pS31 con el cebador gD_215G-222N-223I_PvuI), pLM113 (lleva la secuencia que codifica gD donde los aa 6-38 de la proteína madura están sustituidos por scHER2L), pS113 (plásmido lanzadera obtenido por subclonación del fragmento NruI-PmeI de pLM113 en SmaI de pST76KSR), pLM249 (lleva la secuencia que codifica gD donde los aa 61 a 218 de la proteína madura se sustituyen por scHER2 flanqueada por enlazadores), pS249 (plásmido lanzadera obtenido por subclonación del fragmento NruI-PmeI de pLM249 en SmaI del pST76KSR), respectivamente: los números en cursiva negrita subrayadas indican las coordenadas del plásmido completo final; los números en letra normal indican las coordenadas en el vector y los fragmentos originales.
- La figura 16 muestra la actividad citotóxica de R-LM113 y R-LM249 recombinantes en comparación con el virus de referencia R-LM5. Los histogramas representan el número total de células (eje y: número de células $\times 10^4$). Para cada muestra de células infectadas se contaron tanto las fracciones de células adherentes (a) como despegadas (d). Las partes sombreadas de los histogramas representan la fracción de células no viables (positivo a eritrosina B), y los valores correspondientes se indican en los valores porcentuales en los histogramas. NI, células de referencia no infectadas.

Descripción detallada

Según un primer aspecto de la presente invención, se proporciona un virus modificado del herpes simple (VHS) que comprende una envoltura glucoproteica, que tiene un ligando peptídico heterólogo que permite al VHS penetrar en una célula mediante la interacción con un receptor dado que está concebido para unirse, en el que el receptor dado está sobreexpresado o expresado selectivamente por células enfermas, y en el que el ligando peptídico sustituye una parte eliminada de gD de la envoltura glucoproteica de VHS entre las posiciones 1 a 8 y 38 a 55, o entre las posiciones 40 a 61 y 210 a 218.

Según algunas formas de realización preferidas, la capacidad del VHS modificado de unir en condiciones específicas el receptor de HVEM/HveA se reduce, mejor se elimina sustancialmente.

Un virus ejemplificativo es un miembro de la familia *Herpesviridae*, VHS-1.

Los VHS-1 y VHS-2 son virus del herpes simple. El objeto de la presente invención comprende cualquier miembro de la familia *Herpesviridae* y no se limita a las formas de realización ejemplificativas descritas en los ejemplos. Muchos VHS son conocidos en la técnica. Dichos virus pueden contener uno o más genes mutados. Los ejemplos de virus recombinantes que contienen genes heterólogos y procedimientos de preparación y utilización de dichos virus se describen en el documento US5599691. Los genes heterólogos incluyen los genes que codifican proteínas marcadoras (tales como las proteínas fluorescentes rojas o verdes o variaciones de las mismas, luciferasa o β -galactosidasa), que permiten la detección de las células infectadas que expresan la proteína.

El VHS modificado proporcionado en la presente memoria tiene la ventaja de mantener una parte relevante de la infectividad del virus natural. El ligando peptídico se inserta en la gD (glucoproteína D) de la envoltura glucoproteica del VHS. Una parte de la gD se elimina. El ligando peptídico se inserta en lugar de la parte eliminada de modo que el ligando peptídico y gD forman una proteína de fusión.

Por lo general, la gD natural (madura) tiene la secuencia peptídica SEC. ID. nº: 1.

La gD natural procede de un precursor, que tiene la secuencia peptídica SEC. ID. nº: 34.

El precursor mencionado está codificado por la secuencia de nucleótidos SEC. ID. nº: 35.

Según algunas formas de realización gD, antes de modificarse, tiene una homología de por lo menos 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o 100%, ventajosamente identidad, con respecto a SEC. ID. nº: 1.

Según algunas formas de realización, la porción, que se extiende entre las posiciones correspondientes a 40 a 61, por un lado, y 210 a 218, en el otro lado, se eliminan. Ventajosamente, la parte eliminada se extiende entre las posiciones correspondientes a 61, por un lado, y 218, en el otro lado.

En la presente memoria, locus (posición) de las secuencias peptídicas modificadas o no modificadas se identifica haciendo referencia a una numeración de aminoácidos de restos de aminoácidos en las posiciones correspondientes de una gD natural (madura) no modificada como se identifica por la SEC. ID. nº: 1. Las posiciones correspondientes pueden identificarse alineando los restos no modificados (véase anteriormente). Por ejemplo, se describe a continuación la numeración de secuencias de la gD natural (SEC. ID. nº: 1) y su precursor (SEC. ID. nº: 34).

SEC. ID. nº: 1

KYALADASLK	MADPNRFRGK	DLPVLDQLTD	PPGVRRVYHI	QAGLPDPFPQ	PSLPITVYYA	60
VLERACRSVL	LNAPSEAPQI	VRGASEDVVK	QPYNLTIAWF	RMGGNCAIPI	TVMEYTECSY	120
NKSLGACPIR	TQPRWNYYS	FSAVSEDNLG	FLMHAPAFET	AGTYLRLVKI	NDWTEITQFI	180
LEHRAKGCK	YALPLRIPPS	ACLSPPQAYQQ	GVTVDSIGML	PRFIPENQRT	VAVYSLKIAG	240
WHGPKAPYTS	TLLPPELSET	PNATQPELAP	EDPEDSALLE	DPVGTVAPQI	PPNWHIPSIQ	300
DAATPYHPPA	TPNNMGLIAG	AVGGSLLAAL	VICGIVYWMR	RRTQKAPKRI	RLPHIREDDQ	360
PSSHQPLFY						369

SEC. ID. nº: 34

MGGAAARLGA VILFVVIVGL HGVRG

KYALADASLK MADPNRFRGK DLPVLDQLTD PPGVRRVYHI QAGLPDPFQP PSLPITVYYA 60

VLERACRSVL LNPASEAPQI VRGASEDVRK QPYNLTIWF RMGGNCAIPI TVMEYTECSY 120

NKSLGACPIR TQPRWNYYS FSAVSEDNLG FLMHAPAFET AGTYLRLVKI NDWTEITQFI 180

LEHRAKGSCK YALPLRIPPS ACLSPQAYQQ GVTVDSIGML PRFIPENQRT VAVYSLKIAG 240

WHGPKAPYTS TLLPPELSET PNATQPELAP EDPEDSALLE DPGVTVAPOI PPNWHIPSIO 300

DAATPYHPPA TPNWMLIAG AVGGSLAAL VICGIVYWMR RRTQKAPKRI RLPHIREDDO 360

PSSHQPLFY 369

5 Según algunas formas de realización, la parte eliminada se extiende entre las posiciones correspondientes a 1 a 8, por un lado, y 38 a 55, en el otro lado. Ventajosamente, la parte eliminada se encuentra entre las posiciones correspondientes a 6, en un lado, y 38, en el otro lado.

10 El ligando péptido mencionado anteriormente es cualquier tipo de ligando adecuado conocido en la técnica, por ejemplo, una citocina, un factor de crecimiento, un derivado de anticuerpo monoclonal o, ventajosamente, un anticuerpo monocatenario.

15 Según algunas formas de realización específicas, el ligando peptídico es capaz de unirse en condiciones específicas al receptor dado, que presenta una homología de por lo menos 70%, 80%, 90%, 95% o 100%, ventajosamente identidad, con respecto al receptor HER2/ErbB2.

20 El HER2/ErbB2 es un receptor que es sobreexpresado por, por ejemplo, el tumor de ovario, el tumor de mama, el tumor de estómago y las células tumorales de las glándulas salivales (Hynes N. E. y H. A. Lane "ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors". *Nat. Rev. Cancer* (2005) 5: 341; Holbro, T. y Hynes, N. E. ErbB receptors: directing key signaling networks throughout life. *Annu Rev. Pharmacol Toxicol.* 44, 195-217 (2004); Hynes, N. E. y Stern D. F. The biology of erbB-2/neu/HER-2 and its role in cancer. *Biochim. Biophys. Acta* 1198, 165-184 (1994)), y que se expresa a niveles muy bajos en tejidos no malignos (Yamamoto *et al.*, *Nature*. enero 1986 16-22; 319 (6050):230-4) (Press M. F. *et al.*, *Oncogene* (1990.) 5: 953).

25 Según otras formas de realización, el ligando peptídico es capaz de unirse en condiciones específicas del receptor dado, que tiene una homología de por lo menos 70%, 80%, 90%, 95% o 100%, ventajosamente identidad, con respecto a un receptor dado seleccionado en el grupo que consiste en: EGFR1 (receptor del factor de crecimiento epidérmico) [Carpenter, G. (1992). Receptor tyrosine kinase substrates: src homology domains and signal transduction. *Faseb J* 6(14), 3283-9], EGFR3 [Hynes, N. E. y Lane, H. A. (2005). ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nat. Rev. Cancer* 5 (5), 341-54], PMSA (antígeno asociado a la membrana prostática), CEA (antígeno carcinoembrionario), GD2 (disialogangliósido, expresado en el neuroblastoma y en el melanoma), los receptores 1 y 2 de VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular) expresados en los nuevos vasos sanguíneos [Carmeliet, P. (2005). VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer. *Oncology* 69 Supl. 3, 4-10].

35 Es importante hacer hincapié en que, algunos de los ligandos naturales de receptores anteriormente mencionados son conocidos, por ejemplo, EGF, VEGF. En la situación actual de la técnica, se conocen anticuerpos monoclonales y anticuerpos monocatenarios, que se dirigen al receptor diana expresado por las células enfermas. Por ejemplo, J591, J415 y J533 se han preparado (véase la solicitud de patente con número de publicación US20030007974). Single chain antibodies to EGFR1 (Nakamura, T., Peng, K. W., Vongpunsawad, S., Harvey, M., Mizuguchi, H., Hayakawa, T., Cattaneo, R., and Russell, S. J. (2004). Antibody-targeted cell fusion. *Nat. Biotechnol.* 22 (3), 331-6), to EGFR3 (Horak, E., Heitner, T., Robinson, M. K., Simmons, H. H., Garrison, J., Russeva, M., Furmanova, P., Lou, J., Zhou, Y., Yuan, Q. A., Weiner, L. M., Adams, G. P. y Marks, J. D. (2005). Isolation of scFvs to *in vitro* produced extracellular domains of EGFR family members. *Cancer Biother. Radiopharm.* 20 (6), 603-13), to VEGFR2/KDR (A7 scFv, Boldicke, T., Tesar, M., Griesel, C., Rohde, M., Grone, H. J., Waltenberger, J., Kollet, O., Lapidot, T., Yayon, A., and Weich, H. (2001). Anti-VEGFR-2 scFv para el aislamiento de células. Se han descrito anticuerpos monocatenarios que reconocen el receptor-2 del factor de crecimiento endotelial vascular humano (VEGFR-2/flk-1) en la superficie de las células endoteliales primarias y células CD34+ preseleccionadas de la sangre del cordón umbilical. *Stem Cells* 19 (1), 24-36).

50 Se han preparado anticuerpos monocatenarios contra CEA: entre otros, scFv MFE23 (que se describen en: Chowdhury *et al.*, Retargeting Retrovirus, 2004 *Mol. Ther.* 9:85, Imaging, Mayer A., *Clin. Cancer Res.* 6 (5): 1711 (2000), y en la solicitud de patente con el número de publicación US20020090709) y scFv T84.66 (que se dio a conocer en: Hu, *Cancer Research* (1996) 56:3055; Olafsen T. *et al.*, *Protein Eng. Des. Sel.* (2004) 17:21; Wong Y. J. *et al.*, *Clin. Cancer Res.* (2004) 10:5014; Kenanova V. *et al.* *Cancer Res.*, (2005) 65:622; US20030171551). El

anticuerpo monoclonal MAb 3F8 (US20040116379, US20040115688, US6716422, Kushner B.H. *et al.*, (2001) 19:4189, Tur M.K. *et al.*, *Int. J. Molec. Med.* (2001) 8:579, US20040180386) y el anticuerpo monocatenario scFv 14.18 contra GD2 también son conocidos en la técnica.

5 Según algunas formas de realización específicas, el ligando presenta por lo menos 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100% de homología (ventajosamente identidad) con un ligando elegido en el grupo formado por: scFv J591, scFv MFE23, MAb 3F8, scFv T84.66 y scFv 14.18.

10 Según algunas formas de realización, el ligando consta de al menos trescientos aminoácidos; mejor por lo menos trescientos veinte, trescientos sesenta o doscientos cuarenta.

Ventajosamente, el ligando comprende un primer dominio (VL) y un segundo dominio (VH) y un primer enlazador (L1), que conecta el primer y el segundo dominios (dominios VL, VH) y es capaz de permitir que el primer y el segundo dominio (VL, VH) tomen una posición relativa adecuada; diseñándose el primer y el segundo dominios (VL, VH) para enlazar dicho receptor dado.

15 El ligando comprende además un segundo enlazador (L2) y/o un tercer enlazador (L3). El segundo dominio (VH) está situado entre el primer y el segundo enlazador (L1, L2) y los conecta. El primer dominio (VL) está situado entre el primer y el tercer enlazador (L1, L3) y los conecta.

20 El primer dominio (VL) se compone de al menos un centenar de aminoácidos, mejor no más de ciento diecisiete aminoácidos. El segundo dominio (VH) se compone de al menos ciento diez, mejor no más de ciento treinta, aminoácidos. El primer enlazador (L1) se compone de al menos doce, mejor no más de treinta, aminoácidos.

25 Según algunas formas de realización, el primer dominio (VL) tiene una homología de por lo menos 80%, 90%, 95%, 98%, 100%, ventajosamente identidad, con respecto a la SEC. ID. nº: 2.

SEC. ID. nº: 2

```
SDIQMTQSPS  SLSASVGDRV  TITCRASQDV  NTAVAWYQQK  PGKAPKLLIY
SASFLYSGVP  SRFSGSRSGT  DFTLTISLQ  PEDFATYYCQ  QHYTTPPTFG
QGTKVEI
```

30 Según algunas formas de realización, el primer dominio (VL) puede tener por lo menos 80%, 90%, 95%, 98% o 100% de homología, ventajosamente identidad, con respecto a la SEC. ID. nº: 3.

SEC. ID. nº: 3

```
SEVQLVESGG  GLVQPGGSLR  LSCAASGFNI  KDTYIHWVRQ  APGKGLEWVA
RIYPTNGYTR  YADSVKGRFT  ISADTSKNTA  YLQMNSLRAE  DTAVYYCSRW
GGDGFYAMDY  WGQGTLLVTVS
```

35 Según algunas formas de realización, el primer enlazador (L1) tiene una homología de por lo menos 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98% o 100%, ventajosamente identidad, con respecto a la SEC ID N °: 4.

40 SEC. ID. nº: 4

KSDMPMADPN RFRGKNLVFH

45 Según algunas formas de realización, el segundo enlazador (L2) tiene una homología de por lo menos 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98% o 100%, ventajosamente identidad, con respecto a la SEC. ID. nº: 5 o SEC. ID. nº: 8.

SEC. ID. nº: 5

SSGGGSGSGG S

50 SEC. ID. nº: 8

SSGGGSGSGG SG

55 Según algunas formas de realización, el tercer enlazador (L3) se compone de al menos dos y, mejor, no más de

ocho aminoácidos. El tercer enlazador (L3) tiene una homología de por lo menos 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 100%, ventajosamente identidad, con respecto a la SEC. ID. n°: 6 o la SEC. ID. n°: 7.

SEC. ID. n°: 6

EN

SEC. ID. n°: 7

HSSGGGSG

Según algunas formas de realización específicas, el ligando peptídico se inserta en la gD (glucoproteína D) de la envoltura glucoproteica y una porción de gD se borra, de modo que la gD modificada obtenida tiene una homología de por lo menos 70%, 80%, 90%, 95%, 98% o 100%, ventajosamente identidad, con respecto a la SEC. ID. n°: 10 o la SEC. ID. n°: 9.

SEC. ID. n°: 10

KYALADASLK	MADPNRFRGK	DLPVLDQLTD	PPGVRRVYHI	QAGLPDPFQP
PSLPITVYYA	HSSGGGSGSD	IQMTQSPSSL	SASVGDRVITI	TCRASQDVNT
AVAWYQQKPG	KAPKLLIYSA	SFLYSGVPSR	FSGSRSGTDF	TLTISSLQPE
DFATYYCQQH	YTPPTFGQG	TKVEIKSDMP	MADPNRFRGK	NLVFHSEVQL
VESGGGLVQP	GGSLRLSCAA	SGFNIKDTYI	HWVRQAPGKG	LEWVARIYPT
NGYTRYADSV	KGRFTISADT	SKNTAYLQMN	SLRAEDTAVY	YCSRWGGDGF
YAMDYWGQGT	LVTVSSSGGG	SGSGSGSMLP	RFIPENQRTV	AVYSLKIAGW
HGPKAPYTST	LLPPELSETP	NATQPELAPE	DPEDSALLED	PVGTVAPQIP
PNWHIPSIQD	AATPYHPPAT	PNNMGLIAGA	VGGSLLAALV	ICGIVYWMRR
RTQKAPKRIR	LPHIREDDQP	SSHQPLFY		

SEC. ID. n°: 9

KYALAENSDI	QMTQSPSSLS	ASVGDRVITIT	CRASQDVNTA	VAWYQQKPGK
APKLLIYSAS	FLYSGVPSRF	SGSRSGTDFT	LTISLQPED	FATYYCQQHY
TTPPTFGQGT	KVEIKSDMPM	ADPNRFRGKN	LVFHSEVQLV	ESGGGLVQPG
GSLRLSCAAS	GFNIKDTYIH	WVRQAPGKGL	EWVARIYPTN	GYTRYADSVK
GRFTISADTS	KNTAYLQMNS	LRAEDTAVYY	CSRWGGDGFY	AMDYWGQGT
VTVSSSGGGS	GSGGSHIQAG	LPDPFQPPSL	PITVYYAVLE	RACRSVLLNA
PSEAPQIVRG	ASEDVRKQPY	NLTIAWFRMG	GNCAIPITVM	EYTECSYNKS
LGACPIRTQP	RWNYYDSFSA	VSEDNLGFLM	HAPAFETAGT	YLRLVKINDW
TEITQFILEH	RAKGCKYAL	PLRIPPSACL	SPQAYQQGVT	VDSIGMLPRF
IPENQRTVAV	YSLKIAGWHG	PKAPYTSTLL	PPELSETPNA	TQPELAPEDP
EDSALLEDPV	GTVAPQIPP	WHIPSIQDAA	TPYHPPATPN	NMGLIAGAVG
GSLLAALVIC	GIVYWMRRRT	QKAPKRIRLP	HIREDQPS	HQPLFY

Los precursores de la SEC. ID. n°: 10 y la SEC. ID. n°: 9 pueden ser expresados por la SEC. ID. n°: 36 y la SEC. ID. n°: 37, respectivamente.

Las secuencias de péptidos descritas en la presente memoria, en particular, la gD modificada, pueden cambiarse tras la traducción. Los cambios posibles incluyen, pero no se limitan a la glucosilación, la pegilación, la albuminación, la farnisilación, la carboxilación, la hidroxilación y la fosforilación.

En este sentido debe tenerse en cuenta que, la gD natural tiene oligosacáridos ligados por N añadidos en cada secuencia de consenso específica (Asn-X-Ser y/o Asn-X-Thr) (Sodora, D. L., Cohen G. H. y R. J. Eisenberg. 1989 Influence of asparagine-linked oligosaccharides on antigenicity, processing, and cell surface expression of herpes simplex virus type 1 glycoprotein *D. J. Virol.* 63:5184-93) y posibles oligosacáridos unidos por O a uno o más restos Ser y/o Thr. De manera ventajosa, también la gD modificada y/o el ligando incluyen dichas modificaciones.

Se ha observado experimentalmente que, sorprendentemente, el VHS modificado según la presente invención, aunque las secuencias de aa 7-32, que en la gD natural están involucradas en la interacción con HVEM, no siempre se eliminaban, no sólo ha perdido la capacidad de interactuar con nectina1, sino también con HVEM, y por lo tanto no se dirigen tanto desde receptores naturales HVEM como de nectina1.

En este sentido, cabe señalar que, contrariamente a los esfuerzos descritos por Zhou y Roizman (documento WO 2004/033639), el ligando utilizado (en este caso el scFv) no se inserta en el terminal en N de la gD, pero se inserta entre dos fragmentos de gD que contienen restos que no se pueden eliminar (es decir, el terminal en N hasta el resto del aa 60, y la región del extremo 218). Una característica específica del VHS modificado es que estas porciones están unidas entre sí en una sola cadena polipeptídica, y están unidas y mantienen juntas, en particular, por el scFv que, en este caso, cumple simultáneamente dos funciones (i) proporciona el nuevo ligando para los receptores a los que va dirigido (y por lo tanto dirige el tropismo del virus recombinante para el receptor de elección), y (ii) proporciona la función de soporte que, en la gD natural, se encuentra en la porción de Ig plegada incluida en el polipéptido 61-218.

Otras modificaciones que posiblemente mejoran la capacidad del virus específico para unirse específicamente a las células que expresan el receptor dirigido por el ligando heterólogo y entrar en ellas incluyen la eliminación de secuencias específicas en la glucoproteína gB (restos de aminoácidos 68-77) y gC (restos de aminoácidos 136 - 152) que permiten la unión al receptor sulfato de heparán del VHS específico. Dichas secuencias, o ampliaciones de las mismas, pueden reemplazarse con el ligando heterólogo de elección, a fin de concentrar más el virus recombinante en las células de elección.

Una aplicación adicional consiste en la introducción en el genoma vírico de las mutaciones que favorecen en gran medida la propagación del virus desde una célula infectada a unas células adyacentes próximas. Se conocen mutaciones que ejercen dicho efecto. Por lo general provocan que las células infectadas formen un sincitio (o policariocito) con las células cercanas, y se denominan mutaciones sincitiales (syn). Los ejemplos de dichas mutaciones son A40V situada en gK y R858H, T813I y R796C situada en gB.

Según un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona el VHS modificado anteriormente identificado para su utilización como medicamento, mejor para el tratamiento de tumores; en concreto, del tumor de ovario, tumor de mama, tumor de próstata, tumor de colon, tumor de estómago, tumor de glándulas salivales, melanoma, neuroblastoma, carcinoma de cabeza y cuello, el tejido neoangiogénico, en particular los tejidos neoangiogénicos de un tumor, y/o metástasis de los mismos. De manera ventajosa, el VHS modificado anteriormente definido se utiliza para el tratamiento del tumor de ovario, tumor de mama, tumor de próstata, tumor de estómago, tumor de glándulas salivales y metástasis de los mismos. De manera ventajosa, el VHS modificado anteriormente definido se proporciona para su utilización en el tratamiento de tumor de ovario, del tumor de mama y de la metástasis de los mismos.

En este sentido, es importante señalar que el VHS modificado anteriormente mencionado es particularmente útil para el tratamiento de la metástasis tumoral. Esto es debido al hecho de que una vez que se administra el VHS modificado, se difunde e infecta de forma autónoma la metástasis.

El VHS modificado se puede administrar a un paciente por cualesquier medios conocidos. En particular, el VHS modificado se puede administrar directamente en la zona de un tumor o, alternativamente, en todo el organismo, por ejemplo, cuando se ha detectado metástasis o el tumor no es accesible directamente.

Los preparados farmacéuticos que contienen el VHS modificado están sustancialmente desprovistos de impurezas que pueden causar daños al paciente, en particular, a los seres humanos o a otros mamíferos. Los preparados farmacéuticos, de manera ventajosa, comprenden uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

El VHS modificado puede formularse para cada tipo conocido de administración: en particular, para administración oral, parenteral o rectal o en formas diseñadas para la inhalación o insuflado (tanto por la boca como por la nariz). Las formulaciones para uso parenteral resultan ventajosas.

Para la administración oral, los preparados farmacéuticos pueden estar, por ejemplo, en forma de comprimidos o

- cápsulas preparadas por procedimientos conocidos con excipientes aceptables desde un punto de vista farmacéutico como agentes aglutinantes (por ejemplo almidón de maíz pregelatinizado, polividona o metilcelulosa); cargas (por ejemplo lactosa, celulosa microcristalina o fosfato ácido de calcio); aditivos (por ejemplo estearato de magnesio, talco, sílice); disgregantes (por ejemplo almidón de patata); y/o agentes lubricantes (por ejemplo, laurilsulfato sódico). Los comprimidos se pueden recubrir por métodos conocidos. Los preparados líquidos para administración oral pueden tener forma, por ejemplo, de soluciones o suspensiones de tipo jarabe, o pueden estar en la forma de un producto seco que se puede disolver en agua o en otro líquido antes de su uso. Estos preparados se pueden preparar de maneras conocidas con aditivos farmacéuticamente aceptables tales como agentes de suspensión (por ejemplo, sorbitol, derivados de celulosa, grasas hidrogenadas comestibles); agentes emulsionantes (por ejemplo, lecitina o goma arábica); líquidos no acuosos (por ejemplo, aceite de almendras, ésteres oleosos, alcohol etílico o aceites vegetales fraccionados); y/o conservantes (por ejemplo hidroxibenzoatos de metilo o propilo, sórbico ácido o ácido ascórbico). Los preparados también pueden contener, en casos apropiados, sales tamponantes, colorantes, agentes aromatizantes y/o edulcorantes.
- 15 Los preparados para administración oral pueden formularse de una manera conocida, para proporcionar una liberación controlada del compuesto activo.
- El VHS modificado puede formularse, de una manera conocida, para administración parenteral por inyección o administración continua. Las fórmulas inyectables pueden ser en forma de dosis individuales, por ejemplo en ampollas o recipientes multidosis que contienen conservantes. La preparación puede estar en forma de suspensión, en líquidos acuosos u oleosos, y puede contener elementos de formulación tales como agentes dispersantes y estabilizantes. Alternativamente, el compuesto activo puede estar en forma de polvo para disolverse inmediatamente antes de su uso en un líquido adecuado, por ejemplo agua esterilizada.
- 25 El VHS modificado se puede formular para administración rectal en forma de supositorios o enteroclis, por ejemplo, que contiene excipientes para los supositorios de un tipo conocido, tal como manteca de cacao u otras grasas.
- El VHS modificado también se puede formular, de una manera conocida, como preparados de liberación prolongada. Estos preparados de liberación prolongada se pueden administrar mediante un implante (por ejemplo, subcutáneo o intramuscular) o mediante una inyección intramuscular. Así, por ejemplo, el VHS modificado se puede formular con materiales poliméricos o hidrófobos adecuados (por ejemplo, una emulsión o un aceite) o con resinas de intercambio iónico, o derivados relativamente poco solubles, tales como sales relativamente poco solubles.
- 35 Para la administración intranasal, el VHS modificado se pueden formular para la administración mediante un dispositivo (conocido), por ejemplo, en forma de polvo con los vehículos adecuados.
- Las dosis del VHS modificado pueden definirse como el número de unidades formadoras de placa (ufp). Los ejemplos de dosis incluyen 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} o 10^{11} ufp.
- 40 El paciente que se debe tratar puede ser cualquier mamífero, por ejemplo un ser humano. Otros ejemplos de animales que se pueden tratar son: los animales de granja tales como ganado vacuno, cerdos, cabras, ovejas, caballos; animales domésticos tales como gatos y perros; conejo, ratón, rata.
- En algunos casos es posible administrar el VHS modificado junto con otros tratamientos de quimio-, inmuno-, radio-terapia y/o otros tipos de tratamientos.
- En particular, el VHS modificado se puede utilizar combinado con inhibidores de angiogenia tales como, por ejemplo: Endostatina (EntreMed), SU5416, SU6668 (Sugen, San Francisco), Talidomida, COL-3 (Collagenex, Newton PA), AG3340 (Agouron, LaJolla, CA), Marimastat (British Biotech), Neovastat (Aeterna, Quebec), BMS-275291 (Bristol-Myers Squibb).
- Según un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona la utilización de un VHS modificado para la utilización en el diagnóstico de una condición fisiológica, mejor para identificar la metástasis tumoral. Por consiguiente, en la presente memoria se proporciona la utilización del VHS modificado para la preparación de una composición para la utilización en el diagnóstico de una condición fisiológica. Dicha composición puede prepararse utilizando procedimientos conocidos de modo que pueda administrarse a un paciente.
- Ventajosamente, la utilización en el diagnóstico puede dirigirse a: tumor de ovario, tumor de mama, tumor de próstata, tumor de colon, tumor de estómago, tumor de la glándula salival, melanoma, carcinoma de cabeza y cuello, tejido neoangiogénico, en particular los tejidos neoangiogénicos de un tumor, y neuroblastoma y/o metástasis de los mismos; mejor, tumor de ovario, tumor de mama, tumor de próstata, tumor de estómago, tumor de la glándula salival y metástasis de los mismos; en particular, el tumor de ovario, tumor de mama y metástasis de los mismos.
- La utilización en el diagnóstico de las condiciones fisiológicas puede obtenerse mediante el diagnóstico por la imagen de la expresión del gen de la timidina-quinasa (TK) utilizando técnicas de detección muy sensibles tales como PET o SPECT (Sharma *et al.*, Molecular imaging of gene expression and protein function *in vivo* with PET and

SPECT, *J. Magn. Reson. Imaging.*, 16 (4) : 336-51, 2002) (Vries *et al.*, Scintigraphic Imaging of HSV Gene Therapy, *Curr. Pharm. Des.*, 8 (16) : 1435-50, 2002) (Vries *et al.*, Positron Emission Tomography: measurement of transgene expression, *Methods*, 27 (3.): 234, 2002).

5 Alternativamente, es posible fusionar una proteína no esencial (por ejemplo U_s11) y una proteína indicadora capaz de ser identificada *in vivo* (por ejemplo, proteínas rojas o verdes fluorescentes o variaciones de las mismas, luciferasa o β -galactosidasa).

10 Cuando se utiliza la luciferasa, su presencia puede hacerse resaltar mediante un sustrato luminiscente o cromático adecuado. La proteína indicadora puede fusionarse a una timidina-cinasa (Soling *et al.*, Intercellular localization of Herpes simplex virus of the type 1 thymidine kinase fused to different fluorescent proteins depends on choice of fluorescent tag, *FEBS Lett.*, 527 (1-3): 153, 2002).

15 Según un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona un procedimiento de preparación de un VHS modificado como se ha definido anteriormente. El procedimiento comprende una fase de inserción, durante la cual se inserta una secuencia de nucleótidos que codifica el ligando peptídico en el ADN del VHS por lo que el VHS modificado así obtenido expresa en su envoltura el ligando peptídico.

20 Mejor, el ADN del VHS está tan manipulado que la secuencia de codificación gD del VHS modificado tiene al menos 70%, 80%, 90%, 95% o 100% de homología, mejor de identidad, con respecto a la SEC. ID. n°: 36 o SEC. ID. n°: 37, en particular, la SEC. ID. n°: 37.

25 Antes de la inserción de ligandos adecuados, mejor anticuerpos monocatenarios, pueden identificarse utilizando técnicas conocidas para probar su capacidad de fijación a por lo menos un receptor expresado por las células enfermas.

Las características adicionales de la presente invención se pondrán más claramente de manifiesto mediante la siguiente descripción de algunos ejemplos ilustrativos.

30 **Ejemplo 1 - Construcción de VHS que expresan gD modificadas genéticamente que llevan supresiones sustituidas con un anticuerpo monocatenario dirigido a HER2/Neu y que llevan EGFP como gen informador.**

A) Eliminación de gD procedente de VHS-BAC.

35 Para generar un virus gDminus, el procedimiento de "clonación de ET" se realizó en bacterias (Muyrers, J. P., Y. Zhang, G. Testa y A. F. Stewart. 1999. Rapid modification of bacterial artificial chromosomes by ET-recombination. *Nucleic Acids Res.* 27:1555-7). Un casete con resistencia a kanamicina flanqueada por dos sitios FRT se amplió por RCP a partir del plásmido pFRT-2, con cebadores que contenían en sus extremos 5' 60 nt de las secuencias que flanquean gD ORF: gDup_Kan_f (TGT TCG GTC ATA AGC TTC AGC GCG AAC GAC CAA CTA CCC CGA TCA

40 TCA GTT ATC CTT AAG CCA GTG AAT TCG AGC TCG GTA C) (SEC ID N°: 11) y gDdown_Kan_r (ACT TAT CGA CTG TCC ACC TTT CCC CCC TTC CAG ACT CGC TTT ATA TGG AGT TAA GGT CCC GAC CAT GAT TAC GCC AAG CTC C) (SEC ID n° : 12). pFRT-2 se construyó por inserción de la resistencia a la kanamicina procedente del pCP15 en los sitios NsiI de pCP16 reemplazando el gen de resistencia a tetraciclina Cherepanov, P. P., y W. Wackernagel. 1995. Gene disruption in *Escherichia coli*: TcR and KmR cassettes with the option of Flp-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant. *Gene* 158:9-14. The PCR product was electroporated into DH10B E. coli (Stratagene) harboring the YEbaclO2 HSV-BAC Tanaka, M., H. Kagawa, Y. Yamanashi, T. Sata e Y. Kawaguchi. 2003. Construction of an excisable bacterial artificial chromosome containing a full-length infectious clone of herpes simplex virus type 1: viruses reconstituted from the clone exhibit wild-type properties *in vitro* and *in vivo*. *J. Virol.* 77:1382-91, and transiently expressing lambda phage Red- β and Red- γ recombinases from pKD46

50 plasmid Datsenko, K. A., y B. L. Wanner. 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97:6640-5. Los clones recombinantes se seleccionaron en placas que contienen dos antibióticos, 25 μ g/ml de kanamicina (marcador contenido en el producto de RCP) y 20 μ g/ml de cloranfenicol (marcador contenido en secuencias de VHS-BAC), para asegurar la sustitución de la secuencia de codificación de gD por la casete de resistencia a kanamicina. Para extraer la casete de kanamicina, los clones positivos se sometieron a electroporación con pCP20 (Cherepanov, P. P., y W. Wackernagel. 1995. Gene disruption in *Escherichia coli*: TcR and KmR cassettes with the option of Flp-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant. *Gene* 158:9-14), un plásmido que expresa la FLP recombinasa de levadura, que se dirige a secuencias FRT. Por último, se analizaron las colonias para determinar la pérdida del marcador de kanamicina y la resistencia a cloranfenicol. El genoma de VHS-BAC de gDminus resultante denominado 102gD^{FRT}, se comprobó por

60 transferencia Southern, RCP, secuenciación, y para la capacidad para formar placas sólo en R6, y no en otras estirpes celulares.

B) Ingeniería de EGFP (proteína fluorescente verde potenciada) o genes indicadores LacZ en 102gD^{FRT} VHS-BAC.

65

La segunda etapa en la ingeniería de recombinantes de VHS-BAC fue la inserción del gen indicador EGFP o LacZ, generando de este modo gDminus-EGFP-VHS-BAC o gDminus-LacZ-VHS-BAC. Se han seleccionado como punto de inserción del gen indicador las propias secuencias de pBeloBAC, de modo que, el gen marcador se puede eliminar junto con las secuencias de BAC por la Cre recombinasa, si es necesario (Fig. 1 A). La secuencia de codificación de EGFP seguida de la señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovino (BGH) se amplió por RCP a partir de pCMS-EGFP (Clontech) con los cebadores EGFP_BamHI_f (CAA CCC GGG ATC CAC TCG CGG CCA CCA TGG TGA GC) (SEC. ID. n°: 13) y EGFP + pA_BamHI_r (CCC CTT GGG ATC CTT CTG CAC CCC CCC ACC CCC CAG AAT AG) (SEC. ID. n°: 14), y se clonó corriente abajo del activador a27 del VHS. La casete a27-EGFP se insertó entre dos secuencias de 700 pb, ampliadas RCP a partir del plásmido pBeloBac11 (n°: de registro en GenBank: U51113). Las dos secuencias de 700 pb anteriormente mencionadas se designaron pBeloBac11-up [cebadores Sal_pBelo_1209_f: TTG CCA GTC GAC ATT CCG GAT GAG CAT TCA TCA GGC GGG CA (SEC. ID. n°: 15) y pBelo_1897_Xho_r: GCA AAA ACT CGA GTG TAG ACT TCC GTT GAA CTG ATG GAC (SEC. ID. n°: 16)] y pBeloBac11-down [cebadores Mun_pBelo_1898_f: GGA AGT CAA TTG GAA GGT TTT TGC GGT GGT GGC CC (SEC. ID. n°: 17) y pBelo_2586_Eco_r: CAC ACT GAA TTC GCA ATT TGT CAC AAC ACC TTC TCT AGA CA (SEC. ID. n°: 18)]. En el montaje resultante, la casete a27-EGFP resultó insertada entre los nt 1897 y 1898 (coordenadas originales) de pBeloBac11. La casete a27-EGFP más las secuencias adyacentes pBeloBac11 se subclonaron en el vector lanzadera pST76KSR Adler, H., M. Messerle, M. Wagner, y U. H. Koszinowski. 2000. Cloning and mutagenesis of the murine gammaherpesvirus 68 genome as an infectious bacterial artificial chromosome. *J. Virol.* 74:6964-74 para la recombinación homóloga en bacterias. Para la inserción de LacZ, se siguió la misma estrategia, secuencias de clonación pBeloBac11-arriba y -abajo en un plásmido que ya contiene la casete a27-LacZ. Las regiones de inserción y adyacentes relevantes se secuenciaron para precisión en todos los plásmidos.

C) Construcción de vectores lanzadera para la inserción de gD híbrida en los gDminus BAC.

El vector lanzadera gD denominado PS31 (figura 10) lleva el scHER2L (scFv anti HER2 más un enlazador de serina glicina de 9-aa) insertado entre los restos 24 y 25 de gD, más la sustitución V34S (Fig. 1 B, b). Se construyó de la siguiente manera. En primer lugar, la sustitución V34S se introdujo por mutagenia dirigida en pLM13 (Fig. 8), montaje que lleva scHER2L insertado entre los restos 24 y 25 de gD, generando pLM31 (Fig. 9). La mutagenia se realizó mediante el kit Stratagene QuickChange II (Stratagene) con los cebadores gD_34S_StuI 5'-TCC TCC GGG GAG CCG GCG CGT GTA CCA CAT CCA GGC AGG CCT ACC GG-3' (SEC. ID. n°: 19) y su inversa. Los cebadores contenían las enzimas de restricción imperceptibles indicadas, para facilitar la detección de clones mutantes. A continuación, la casete que contiene gD + scHER2 mutagenizada más gD genómica corriente arriba y corriente abajo de las secuencias adyacentes (alrededor de 500 pb cada una) se transfirió al vector lanzadera pST76KSR para permitir la recombinación homóloga en *E. coli*.

Para construir PS39 (figura 11), las sustituciones D215G, R222N, F223I se añadieron a gD clonada en PS31 por medio del cebador gD_215G-222N-223I_PvuI 5'-AGG GGG TGA CGG TGG GCT CGA TCG GGA TGC TGC CCA ACA TCA TCC CCG AGA ACC-3' (SEC. ID. n°: 20) y su inversa (figura 1 B, c).

El vector lanzadera pS113 (figura 13) contiene gD, en el que los restos de aa 6-38 se suprimieron y se sustituyeron con scHER2L [scFv contra HER2 seguido de un enlazador serina-glicina de 11 aa: SSGGGSGSGGS (SEC. ID. n°: 5), codificado por la secuencia TCGAGTGGCGGTGGCTCTGGTTCGGTGGATCC (SEC. ID. n°: 21)] (figura 1 B, d). Para generar este montaje, las enzimas de restricción EcoRI y BamHI se introdujeron sucesivamente en el ORF de gD en pLM5 (figura 7). La enzima de restricción EcoRI se insertó en las posiciones 6-8 de aminoácidos de la secuencia proteica y la enzima de restricción BamHI se insertó en las posiciones 37-39 de los aminoácidos de la secuencia proteica, mediante los cebadores mutágenos gD_6/8_EcoRI_f 5'-CAA ATA TGC CTT GGC GGA GAA TTC TCT CAA GAT GGC CG-3' (SEC. ID. n°: 22) y gD_37/38_BamHI_f 5'-CGG GGG TCC GGC GCG GAT CCC ACA TCC AGG CGG G-3' (SEC. ID. n°: 23), respectivamente. La inserción de la enzima EcoRI introduce las sustituciones D6E y A7N. El scHER2L se amplió a partir del pS2019a Sidhu, S. S., B. Li, Y. Chen, F. A. Fellouse, C. Eigenbrot y G. Fuh. 2004. Phage-displayed antibody libraries of synthetic heavy chain complementarity determining regions. *J. Mol. Biol.* 338:299-310 con los cebadores scFv_x6_Eco_f 5'-GCA AAG GAA TTC CGA TAT CCA GAT GAC CCA GTC CCC G-3' (SEC. ID. n°: 24) y scFv_SG_x37_BamH 5'-CGG AGG ATC CAC CGG AAC CAG AGC CAC CGC CAC TCG AGG-3' (SEC. ID. n°: 25). Este montaje se denominó pLM113 (figura 12). El plásmido lanzadera pS113 final se construyó subclonando la gD genéticamente modificada junto con las secuencias genómicas adyacentes (fragmento NruI-PmeI) en pST76KSR (figura 13).

El vector lanzadera pS249 contiene gD, en el que los restos de aa 61 a 218 se suprimieron y se sustituyeron con LscHER2L [scFv contra HER2 flanqueada por enlazadores serina-glicina, 8 aa corriente arriba: HSSGGGSG (SEC. ID. n°: 7), codificada por la secuencia CATAGTAGTGGCGGTGGCTCTGGA (SEC. ID. n°: 26); 12 aa corriente abajo: SSGGGSGSGGSG (SEC. ID. n°: 8), codificada por la secuencia TCGAGTGGCGGTGGCTCTGGTTCGGTGGATCCGGT (SEC. ID. n°: 27)] en lugar de los restos de aa 61 a 218 de gD (figura 1 B, e). La mutagenia y la clonación se realizaron en pLM5 (figura 7), plásmido que contiene el ORF de gD clonado en pcDNA3.1 (-) (Invitrogen), flanqueado por dos secuencias genómicas flanqueantes corriente arriba y corriente abajo de 500 pb Menotti, L., A. Cerretani y G. Campadelli-Fiume. 2006. Un virus recombinante de herpes simple que presenta un anticuerpo monocatenario a HER2/neu introduce células a través del receptor de tumor de

mama, independientemente de los receptores de gD. *J. Virol.* 80:5531-9. En primer lugar, se insertaron dos secuencias NdeI en la secuencia de codificación que sustituye los aminoácidos 61-62 y 218-219 de gD madura, respectivamente, utilizando los cebadores mutagénicos gD_61/62_NdeI_f (5'-acg gtt tac tac gcc CAT Atg gag cgc gcc tgc c-3') (SEC. ID. n°: 28) y gD_218/219_NdeI_f (5'-GAC GGT GGA CAG CAT CCA TAT GCT GCC CCG CTT C-3') (SEC. ID. n°: 29). A continuación, se insertó un enlazador serina-glicina de 9 aa hibridando y ligando en la enzima NdeI los dos oligos fosforilados P-SG9Bam7/NdeI_f (5'-TAG TAG TGG CGG TGG CTC TGG ATC CGG-3') (SEC. ID. n°: 30) y P-SG9Bam7/NdeI_r (5'-tAC CGG ATC CAG AGC CAC CGC CAC Tac-3') (SEC. ID. n°: 31), que contiene una enzima BamHI imperceptible. El scHER2 se amplió a partir de pS2019a Sidhu, S. S., B. Li, Y. Chen, F. A. Fellouse, C. Eigenbrot y G. Fuh. 2004. Phage-displayed antibody libraries of synthetic heavy chain complementarity determining regions. *J. Mol. Biol.* 338:299-310 con los cebadores scFv_Bam_f (5'-GGC TTA TGG ATC CGA TAT CCA GAT GAC CCA GTC CCC-3') (SEC. ID. n°: 32) y scFv_SG_x37_BamH_r (5'-CGG Agg atc cAC CGG AAC CAG AGC CAC CGC CAC TCG AGG-3') (SEC. ID. n°: 33) y se insertó en la enzima BamHI del enlazador serina-glicina. La longitud total de inserción es de 801 pb, que codifica 267 restos de aa. El montaje se denominó pLM249. Por último, la casete que contiene gDΔ61-218 + LscHER2L genéticamente modificado más las secuencias adyacentes a gD genómica corriente arriba y corriente abajo (el fragmento NruI-PmeI de pLM249) se subclonó en SmaI del vector lanzadera pST76KSR generando pS249 (figura 14) para la recombinación homóloga en *E. coli*. Las regiones de inserción y adyacentes relevantes se secuenciaron para precisión en todos los plásmidos.

D) Generación de genomas recombinantes por sustitución en dos etapas en bacterias. El procedimiento aplicado para generar genomas recombinantes en *E. coli* fue esencialmente como describió, con ligeras modificaciones O'Connor, M., M. Peifer y W. Bender. 1989. Construction of large DNA segments in *Escherichia coli*. *Science* 244:1307-12; Messerle, M., I. Crnkovic, W. Hammerschmidt, H. Ziegler y Ü. H. Koszinowski. 1997. Cloning and mutagenesis of a herpesvirus genome as an infectious bacterial artificial chromosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 94:14759-63; Borst, E. M., G. Hahn, U. H. Koszinowski y M. Messerle. 1999. Cloning of the human cytomegalovirus (HCMV) genome as an infectious bacterial artificial chromosome in *Escherichia coli*: a new approach for construction of HCMV mutants. *J. Virol.* 73:8320-9. En resumen, DH10B electrocompetentes de *E. coli* (Stratagene) que alojan los genomas gDminus VHS-BAC pertinentes se sometieron a electroporación con el vector lanzadera en cubetas de electroporación de 0,2 cm (Bio-Rad) a 200 O, 25 µF, 2,5 kV, se colocaron en placas en LB agar-agar que contenía 25 µg/ml de Kana (marcador del vector lanzadera) y 20 µg/ml de Cam (marcador de BAC) Tanaka, M., H. Kagawa, Y. Yamanashi, T. Sata e Y. Kawaguchi. 2003. Construction of an excisable bacterial artificial chromosome containing a full-length infectious clone of herpes simplex virus type 1: viruses reconstituted from the clone exhibit wild-type properties in vitro and in vivo. *J. Virol.* 77:1382-91, y se incubaron a 30°C o/n para permitir la expresión de RecA del vector lanzadera. Los clones se volvieron a colocar en placas en LB + Kana + Cam a 43°C para permitir la identificación de los que alojan los cointegrados (visibles como colonias grandes, en comparación con el fenotipo "pequeña colonia" sensible a la temperatura determinado por vectores lanzadera no integrados). Posteriormente, se permitió a los cointegrados resolver por siembra los clones en LB + Cam a 30°C, y los clones que contienen el VHS-BAC resuelto se seleccionaron en placas de LB + Cam enriquecido con 10% de sacarosa. Por último, se comprobó la pérdida de la resistencia Kana en los clones, y la presencia del inserto deseado por RCP de colonias.

La recombinación entre el 102gD^{FRT} VHS-BAC y los vectores lanzadera adecuados generó ADN con gDminus-EGFP-VHS-BAC o gDminus-LacZ-VHS-BAC, que contiene la casete activador a27-EGFP (o activador a27-LacZ) insertada en secuencias BAC (Fig. 1 A). Los virus se reconstruyeron mediante la transfección del ADN de BAC en las células R6 que complementan gD.

El gDminus-VHS-BAC se utilizó como receptor para la generación de recombinantes que contienen la gD genéticamente modificada. Los genomas recombinantes se verificaron por RCP y secuenciación. Los virus se reconstruyeron mediante transfección de los BAC-ADN en células R6 Zhou, G., V. Galván, G. Campadelli-Fiume y B. Roizman. 2000. La glucoproteína D o J presentada en apoptosis de bloques trans en células SK-N-SH producida por un virus del herpes simple 1 mutante que carece de genes intactos que expresan ambas glucoproteínas. *J. Virol.* 74:11782-91, seguido de un solo paso en células BHK (riñón de cría de hámster) y crecimiento posterior en J-HER2 Menotti, L., A. Cerretani y G. Campadelli-Fiume. 2006. A virus de herpes simple recombinante que presenta un anticuerpo monocatenario a HER2/neu introduce células a través del receptor de tumor de mama, independientemente de los receptores de gD. *J. Virol.* 80:5531-9 o células SKOV3 (ATCC n° HTB-77). Las reservas de virus se cultivaron en células J-HER2 o SKOV3 y atenuadas en serie durante más de 10 pases. El valor del virus se determinó en células SKOV3.

Ejemplo 2 - Ensayo de infección con el R-LM31 recombinante que lleva la sustitución V34S en gD.

La 1ª generación de recombinantes R-LM11 y R-LM11L llevaban scHER2 insertado entre los restos 24 y 25 de gD Menotti, L., A. Cerretani y G. Campadelli-Fiume. 2006. Un virus de herpes simple recombinante que presenta un anticuerpo monocatenario a HER2/neu se introduce en las células a través del receptor de tumor de mama, independientemente de los receptores de gD. *J. Virol.* 80:5531-9. La inserción alteró el terminal en N de modo que la entrada a través de HVEM se ve obstaculizada. La entrada por nectina1 se mantuvo Menotti, L., A. Cerretani y G. Campadelli-Fiume. 2006. Un virus de herpes simple recombinante que presenta un anticuerpo monocatenario a HER2/neu se introduce en las células a través del receptor de tumor de mama, independientemente de los receptores de gD. *J. Virol.* 80:5531-9. El primer intento para generar un nectina1 inespecífica recombinante consistió

en la inserción de la mutación de V34S en gD-scHER2 (Fig. 1 b). Cuando se introdujo en el gD redirigida a IL13, la sustitución V34S disminuyó fuertemente entrada por la nectina1 Zhou, G., y B. Roizman. 2006. Construction and properties of a herpes simplex virus 1 designed to enter cells solely via the IL-13alpha2 receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 103:5508-13. El ADN LM31-BAC recombinante se generó por recombinación homóloga en *E. coli*. El genoma receptor fue gDminus-LacZ-VHS-BAC. El virus recombinante R-LM31 se obtuvo por transfección del ADN LM31-BAC en las células R6 que complementan gD. El tropismo R-LM31 se ensayó en células J que expresan nectina1 humana o murina, o HER2 humano, y se controló como actividad de β -galactosidasa. Como se muestra en la Fig. 2 A-D, el R-LM31 recombinante infectó células J-nectina1 (Cocchi, F., L. Menotti, P. Mirandola, M. López, y G. Campadelli-Fiume. 1998. El ectodominio de un nuevo miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas relacionado con el receptor del poliovirus tiene los atributos de un receptor auténtico para los virus de herpes simple 1 y 2 en células humanas *J. Virol.* 72:9992-10002) (a través ya sea del receptor humano o murino); por lo tanto no específico de nectina1. El resultado indica que el efecto de la sustitución V34S varía dependiendo del inserto presente en gD.

15 **Ejemplo 3 - Movilidad electroforética de las gD naturales e híbridas expresadas en las células SKOV3.**

Se infectaron células SKOV3 con R-LM5 (la secuencia peptídica de gD de R-LM5 es la SEC. ID. nº: 1, cuyo precursor se expresa por la secuencia de nucleótidos SEC. ID. nº: 35), R-LM13 (la secuencia peptídica de gD de R-LM13 es la SEC. ID. nº: 42, cuyo precursor se expresa por la secuencia de nucleótidos SEC. ID. nº: 43), R-LM31 (la secuencia del péptido de gD de R-LM31 es la SEC. ID. nº: 38, cuyo precursor se expresa por la secuencia de nucleótidos SEC. ID. nº: 39), R-LM39 (la secuencia del péptido de gD de R-LM39 es la SEC. ID. nº: 40, cuyo precursor se expresa por la secuencia de nucleótidos SEC. ID. nº: 41), R-LM113 (SEC. ID. nº: 9) y R-LM249 a una m.o.i de 10 ufp/célula. Tras 24 h los lisados celulares infectados se separaron por SDS-PAGE, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Amersham), y se visualizaron por inmunotransferencia Western con MAb BD80 contra la fracción del terminal C de gD del ectodominio, seguido de anti-IgG de ratón conjugada con peroxidasa y quimioluminiscencia aumentada (figura 2 E). En los recombinantes R-LM31 y R-LM39 la presencia de scHER2L da como resultado una migración más lenta, como en el virus prototipo R-LM13, en comparación con el R-LM5 que lleva gD natural. En el R-LM113 recombinante la movilidad electroforética de la gD híbrida es indistinguible de la de los R-LM13-31-39 recombinantes. En el R-LM249 recombinante, la sustitución de 158 restos de aa con LscHER2L produce una migración intermedia entre gD natural y gD de R-LM113 (donde 6-38 restos de aminoácidos de gD se sustituyen por scHER2L). R-LM113 produce menos gD que R-LM5 o R-LM249, ya que la banda correspondiente necesitaba ser cargado con 10 veces como mucho de lisado en comparación con el R-LM5 o R-LM249 para obtener la señal observada en la figura 2. Esta producción menor de gD fue descrita anteriormente para los virus que llevan supresión en terminal en N de gD Zhou, G., y B. Roizman. 2006. Construction and properties of a herpes simplex virus 1 designed to enter cells solely via the IL- 13alpha2 receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103:5508-13.

40 **Ejemplo 4 - Infección de una variedad de estirpes celulares con R-LM113 y R-LM249.**

Unas monocapas de una variedad de estirpes celulares de origen roedor, simio o humano se infectaron a m.o.i. creciente, y se midió la expresión del gen indicador EGFP (Clontech) 24 h después por medio de un fluorómetro. Se tomaron fotografías digitales con una cámara Kodak conectada a un microscopio de fluorescencia Zeiss Axioplan. LM113 y R-LM249 infectaron células J-HER2, pero no las células J que expresan nectina1 humana o nectina1 murina como único receptor (Fig. 3). La inespecificidad de nectina1 murina se confirmó por el fracaso para infectar células L y NIH-3T3. Las células humanas fueron sensibles a R-LM113 y R-LM249, siempre que expresen a HER2 a un alto nivel (SKOV3). Células negativas a HER2, por ejemplo, HEp-2 ATCC nº CCL-23, 1-143 tk⁻ (Post, L. E. y Roizman, B. (1981). A generalized technique for deletion of specific genes in large genomes: alpha gene 22 of herpes simplex virus 1 is not essential for growth. *Cell* 25(1), 227- 32.) y células RH4 (rhabdomyosarcoma) Ricci, C., L. Landuzzi, I. Rossi, C. De Giovanni, G. Nicoletti, A. Astolfi, S. Pupa, S. Menard, K. Scotlandi, P. Nanni, y P. L. Lollini. 2000. Expression of HER/erbB family of receptor tyrosine kinases and induction of differentiation by glial growth factor 2 in human rhabdomyosarcoma cells. *Int. J. Cancer* 87:29-36, se infectaron a un nivel insignificante. Curiosamente, R-LM113 y R-LM249 eran específicos para HER2 humano, ya que no consiguieron infectar la línea celular de ratón TT12.E2 que expresa el ortólogo de rata de HER2 (neu-NT) De Giovanni, C., G. Nicoletti, L. Landuzzi, A. Astolfi, S. Croci, A. Comes, S. Ferrini, R. Meazza, M. Iezzi, E. Di Carlo, P. Musiani, F. Cavallo, P. Nanni y P. L. Lollini. 2004. Immunoprevention of HER-2/neu transgenic mammary carcinoma through an interleukin 12 - engineered allogeneic cell vaccine. *Cancer Res.* 64:4001-9.

60 **Ejemplo 5 - Ensayo de replicación de virus.**

Las células J, J-hNectin1, J-HVEM, J-HER2, SKOV3, I-143 tk⁻ y HEp-2 cultivadas en placas de 12 pocillos se infectaron con los virus indicados en la figura 4 a una m.o.i de 1 ufp/célula durante 90 min a 37°C. Después de la adsorción del virus, se retiró el inóculo y el virus no penetrado se inactivó por medio de un lavado con ácido (ácido cítrico 40 mM, KCl 10 mM, NaCl 135 mM [pH 3]) Brunetti, C. R., R. L. Burke, B. Hoflack, T. Ludwig, K. S. Dingwell, y D.C. Johnson. 1995. Role of mannose-6- phosphate receptors in herpes simplex virus entry into cells and cell-to-cell transmission. *J. Virol.* 69:3517-28. Los cultivos replicados se congelaron a los tiempos indicados (3, 24, 48 h) después de la infección. Se valoró la descendencia vírica (intracelular más extracelular) en células SKOV3.

El crecimiento de R-LM39, R-LM113 y R-LM249 se comparó con R-LM5 del virus recombinante (que codifica a gD natural) y R-LM13 (que codifica al híbrido gD-scHER2L sin más mutaciones o supresiones). (i) R-LM39 fue incapaz de crecer en las células J-HVEM, pero se replicó en las células J-HER2 y en J-nectina1, lo que implica que se podría utilizar tanto a HER2 como a nectina1 como receptores (Fig. 4 B, C, D). Por consiguiente, se replica en las estirpes celulares humanas SKOV3 (que expresan tanto nectina1 como HER2), células I-143 tk⁻ y HEp-2 (que expresan nectina1) (figura 4 E, F, G). (ii) R-LM113 creció de manera eficiente en las células J-HER2, mejor que R-LM249 y R-LM5 (figura 4D). En las células SKOV3 R-LM113 y R-LM249 se replicaron para los valores de sólo 1 a 1,5 órdenes de magnitud inferiores a los del virus R-LM5 de referencia (figura 4E). (iii) R-LM113 y R-LM249 eran inespecíficos tanto para nectina1 como HVEM, según se evaluó por su incapacidad para crecer en las células J-nectina1 y J-HVEM, así como en I-143 tk⁻ humana y HEp-2 a valores superiores a 10^2 - 10^3 - 10^4 ufp/ml (Fig. 4 B, C, F, G).

Ejemplo 6 - Inhibición de la infección de virus por anticuerpos.

Las células SKOV3 cultivadas en placas de 96 pocillos se incubaron durante 2 h en hielo con concentraciones crecientes de anticuerpos (R1.302 contra nectina1, Herceptina contra HER2, o inmunoglobulinas de ratón) diluidos en DMEM sin suero, y a continuación con el inóculo vírico en el m.o.i. de 2 ufp/célula (valorados en células SKOV3) durante más de 90 min en hielo. Después de la adsorción del virus, el virus no unido se retiró y las células se lavaron dos veces con medio RPMI+Glutamax enfriado con hielo enriquecido con 2,5% de FBS. Las células se cubrieron con medio que contiene la misma concentración de anticuerpos o de las IgG, se cambiaron rápidamente a 37°C, y se incubaron durante 16 h. La infección se cuantificó como intensidad de fluorescencia EGFP mediante un lector de placas Victor (Perkin Elmer). El valor de 100% representa los datos obtenidos con las células infectadas con el virus, en ausencia de anticuerpos.

El uso del receptor se confirmó en experimentos que bloquean virus con Herceptina, Mab R1.302, o mezcla de los dos anticuerpos. Los resultados en la figura 5 demuestran que el R-LM39 no fue bloqueado por Herceptina o R1.302 administrados solos, sino sólo por los dos anticuerpos en combinación (figura 5 A). Los resultados implican que R-LM39 puede utilizar alternativamente nectina1 o HER2 como receptores, documentando más la falta de inespecificidad de nectina1. Por el contrario R-LM113 y R-LM249 fueron bloqueados por Herceptina (figuras 5 B y C). La combinación de Herceptina más Mab R1.302 ejerció la misma inhibición que Herceptina sola; Mab R1.302 no tuvo ningún efecto. La infección por R-LM113 o R-LM249 fue inhibida por Herceptina sola, mientras que Mab R1.302 solo no tuvo ningún efecto. Se concluye que R-LM113 y R-LM249 pueden penetrar en las células sólo a través del receptor HER2, según los resultados mostrados en la figura 4.

Ejemplo 7 - Inhibición de la formación de placa de R-LM113 y R-LM249 por Herceptina.

Se cuestionó si R-LM113 y R-LM249 utilizaron HER2 utilizan no sólo para la infección por el virus, sino también para la propagación célula a célula. Se infectaron células SKOV3 con diluciones en serie de los virus indicados y se cubrieron con medio que contiene 1% agarosa Seaplaque, con o sin adición de 10 µg/ml de Herceptina (Mab contra HER2 Genentech). Se hizo el seguimiento a placas fluorescentes con un microscopio de fluorescencia Zeiss, y se tomaron fotografías de 5 placas por muestra a las 48 h después de la infección. Se midieron las áreas de las placas con la herramienta Photoshop Histogram. Como se muestra en la figura 6, la exposición a Herceptina de monocapas de SKOV3 infectadas con R-LM113-y R-LM249 redujo el tamaño de la placa (en la figura 6, -Herceptin indica en ausencia de Herceptin; +Herceptin indica en presencia de Herceptina. La Herceptina no redujo el tamaño de la placa de R-LM5 y de los demás virus inespecíficos (R-LM13 y R-LM39).

Ejemplo 8 - Actividad citotóxica de los virus recombinantes.

Se cuestionó si R-LM113 y R-LM249 mantuvieron la actividad citotóxica del virus original VHS-1. Se sembraron células SKOV3 en placas de 12 pocillos (4×10^5 células/pocillo) y se infectaron al día siguiente con R-LM5, R-LM116 o R-LM249 a una m.o.i. de 3 ufp/célula. Después de tres días las células infectadas se trataron con tripsina, y se determinó el número de células viables y no viables mediante el ensayo de exclusión de Eritrosina B. En resumen, las células se mezclaron 1:1 con Eritrosina B al 0,04% (Sigma) en PBS, se cargaron en un hemocitómetro y se contaron. Las células no viables absorben el colorante y aparecen de color rojo. El número de células no viables se describió como una fracción del número total de células (rojo más incoloro). Las células desprendidas de la monocapa y presentes en el sobrenadante de las muestras infectadas se recogieron y se contaron en la misma manera. Los pocillos replicados de células no infectadas se incluyeron como referencia. Como se muestra la figura 16, la infección vírica casi evita que las células se dividan, ya que el número total de células es menor en comparación con las células no infectadas. Además la infección produce citotoxicidad celular, ya que el porcentaje de células no viables es mayor en los cultivos infectados con respecto a cultivos replicados no infectados. El efecto de la infección de los R-LM113 y R-LM249 recombinantes es comparable al del virus R-LM5, que lleva gD natural, lo que indica que la reorientación y la inespecificidad del virus no afectó a las propiedades citotóxicas de los recombinantes.

Listado de secuencias

<110> ALMA MATER STUDIORUM - UNIVERSITA DI BOLOGNA

<120> Virus del herpes simple (VHS) con tropismo modificado, utilizaciones y procedimiento de preparación del mismo

<130> BE1184R/RVP/rmp

<160> 43

5 <170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 369

<212> PRT

<213> Virus del herpes simple

10 <400> 1

Lys Tyr Ala Leu Ala Asp Ala Ser Leu Lys Met Ala Asp Pro Asn Arg
1 5 10 15

Phe Arg Gly Lys Asp Leu Pro Val Leu Asp Gln Leu Thr Asp Pro Pro
20 25 30

Gly Val Arg Arg Val Tyr His Ile Gln Ala Gly Leu Pro Asp Pro Phe
35 40 45

Gln Pro Pro Ser Leu Pro Ile Thr Val Tyr Tyr Ala Val Leu Glu Arg
50 55 60

Ala Cys Arg Ser Val Leu Leu Asn Ala Pro Ser Glu Ala Pro Gln Ile
65 70 75 80

Val Arg Gly Ala Ser Glu Asp Val Arg Lys Gln Pro Tyr Asn Leu Thr
85 90 95

Ile Ala Trp Phe Arg Met Gly Gly Asn Cys Ala Ile Pro Ile Thr Val
100 105 110

Met Glu Tyr Thr Glu Cys Ser Tyr Asn Lys Ser Leu Gly Ala Cys Pro
115 120 125

Ile Arg Thr Gln Pro Arg Trp Asn Tyr Tyr Asp Ser Phe Ser Ala Val
130 135 140

Ser Glu Asp Asn Leu Gly Phe Leu Met His Ala Pro Ala Phe Glu Thr
145 150 155 160

Ala Gly Thr Tyr Leu Arg Leu Val Lys Ile Asn Asp Trp Thr Glu Ile
165 170 175

Thr Gln Phe Ile Leu Glu His Arg Ala Lys Gly Ser Cys Lys Tyr Ala
180 185 190

ES 2 667 622 T3

Leu Pro Leu Arg Ile Pro Pro Ser Ala Cys Leu Ser Pro Gln Ala Tyr
195 200 205

Gln Gln Gly Val Thr Val Asp Ser Ile Gly Met Leu Pro Arg Phe Ile
210 215 220

Pro Glu Asn Gln Arg Thr Val Ala Val Tyr Ser Leu Lys Ile Ala Gly
225 230 235 240

Trp His Gly Pro Lys Ala Pro Tyr Thr Ser Thr Leu Leu Pro Pro Glu
245 250 255

Leu Ser Glu Thr Pro Asn Ala Thr Gln Pro Glu Leu Ala Pro Glu Asp
260 265 270

Pro Glu Asp Ser Ala Leu Leu Glu Asp Pro Val Gly Thr Val Ala Pro
275 280 285

Gln Ile Pro Pro Asn Trp His Ile Pro Ser Ile Gln Asp Ala Ala Thr
290 295 300

Pro Tyr His Pro Pro Ala Thr Pro Asn Asn Met Gly Leu Ile Ala Gly
305 310 315 320

Ala Val Gly Gly Ser Leu Leu Ala Ala Leu Val Ile Cys Gly Ile Val
325 330 335

Tyr Trp Met Arg Arg Arg Thr Gln Lys Ala Pro Lys Arg Ile Arg Leu
340 345 350

Pro His Ile Arg Glu Asp Asp Gln Pro Ser Ser His Gln Pro Leu Phe
355 360 365

Tyr

<210> 2

<211> 107

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> anticuerpo monocatenario

<400> 2

Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro
85 90 95

Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
100 105

10

<210> 3

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial

15

<220>

<223> anticuerpo monocatenario

<400> 3

ES 2 667 622 T3

Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp
20 25 30

Thr Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
35 40 45

Val Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser
50 55 60

Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala
65 70 75 80

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
115 120

<210> 4

<211> 20

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> anticuerpo monocatenario

<400> 4

Lys Ser Asp Met Pro Met Ala Asp Pro Asn Arg Phe Arg Gly Lys Asn
1 5 10 15

Leu Val Phe His
20

10 <210> 5

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

15 <223> anticuerpo monocatenario

<400> 5

Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Ser Gly Ser
1 5 10

<210> 6

<211> 2

20 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> anticuerpo monocatenario

<400> 6

Glu Asn

25 <210> 7

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial

30 <220>

<223> gD de VHS y anticuerpo monocatenario

<400> 7

His Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly
1 5

35 <210> 8

<211> 12

ES 2 667 622 T3

<212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> gD de VHS y anticuerpo monocatenario
 5 <400> 8
 Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Ser Gly Gly Ser Gly
 1 5 10
 <210> 9
 <211> 596
 <212> PRT
 10 <213> Artificial
 <220>
 <223> gD de VHS y anticuerpo monocatenario
 <400> 9
 Lys Tyr Ala Leu Ala Glu Asn Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro
 1 5 10 15

 Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg
 20 25 30

 Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
 35 40 45

 Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser
 50 55 60

 Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 65 70 75 80

 Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
 85 90 95

 Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val
 100 105 110

 Glu Ile Lys Ser Asp Met Pro Met Ala Asp Pro Asn Arg Phe Arg Gly
 115 120 125

 Lys Asn Leu Val Phe His Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly
 130 135 140

 Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
 145 150 155 160

 Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro
 165 170 175

 Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr
 180 185 190

 Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp
 195 200 205

 Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu
 210 215 220

 Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr
 225 230 235 240

ES 2 667 622 T3

Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ser
245 250 255

Gly Gly Gly Ser Gly Ser Gly Gly Ser His Ile Gln Ala Gly Leu Pro
260 265 270

Asp Pro Phe Gln Pro Pro Ser Leu Pro Ile Thr Val Tyr Tyr Ala Val
275 280 285

Leu Glu Arg Ala Cys Arg Ser Val Leu Leu Asn Ala Pro Ser Glu Ala
290 295 300

Pro Gln Ile Val Arg Gly Ala Ser Glu Asp Val Arg Lys Gln Pro Tyr
305 310 315 320

Asn Leu Thr Ile Ala Trp Phe Arg Met Gly Gly Asn Cys Ala Ile Pro
325 330 335

Ile Thr Val Met Glu Tyr Thr Glu Cys Ser Tyr Asn Lys Ser Leu Gly
340 345 350

Ala Cys Pro Ile Arg Thr Gln Pro Arg Trp Asn Tyr Tyr Asp Ser Phe
355 360 365

Ser Ala Val Ser Glu Asp Asn Leu Gly Phe Leu Met His Ala Pro Ala
370 375 380

Phe Glu Thr Ala Gly Thr Tyr Leu Arg Leu Val Lys Ile Asn Asp Trp
385 390 395 400

Thr Glu Ile Thr Gln Phe Ile Leu Glu His Arg Ala Lys Gly Ser Cys
405 410 415

Lys Tyr Ala Leu Pro Leu Arg Ile Pro Pro Ser Ala Cys Leu Ser Pro
420 425 430

Gln Ala Tyr Gln Gln Gly Val Thr Val Asp Ser Ile Gly Met Leu Pro
435 440 445

Arg Phe Ile Pro Glu Asn Gln Arg Thr Val Ala Val Tyr Ser Leu Lys
450 455 460

Ile Ala Gly Trp His Gly Pro Lys Ala Pro Tyr Thr Ser Thr Leu Leu
465 470 475 480

Pro Pro Glu Leu Ser Glu Thr Pro Asn Ala Thr Gln Pro Glu Leu Ala
485 490 495

Pro Glu Asp Pro Glu Asp Ser Ala Leu Leu Glu Asp Pro Val Gly Thr
500 505 510

ES 2 667 622 T3

Val Ala Pro Gln Ile Pro Pro Asn Trp His Ile Pro Ser Ile Gln Asp
515 520 525

Ala Ala Thr Pro Tyr His Pro Pro Ala Thr Pro Asn Asn Met Gly Leu
530 535 540

Ile Ala Gly Ala Val Gly Gly Ser Leu Leu Ala Ala Leu Val Ile Cys
545 550 555 560

Gly Ile Val Tyr Trp Met Arg Arg Arg Thr Gln Lys Ala Pro Lys Arg
565 570 575

Ile Arg Leu Pro His Ile Arg Glu Asp Asp Gln Pro Ser Ser His Gln
580 585 590

Pro Leu Phe Tyr
595

<210> 10

<211> 478

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> gD de VHS y anticuerpo monocatenario

<400> 10

Lys Tyr Ala Leu Ala Asp Ala Ser Leu Lys Met Ala Asp Pro Asn Arg
1 5 10 15

Phe Arg Gly Lys Asp Leu Pro Val Leu Asp Gln Leu Thr Asp Pro Pro
20 25 30

Gly Val Arg Arg Val Tyr His Ile Gln Ala Gly Leu Pro Asp Pro Phe
35 40 45

Gln Pro Pro Ser Leu Pro Ile Thr Val Tyr Tyr Ala His Ser Ser Gly
50 55 60

Gly Gly Ser Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu
65 70 75 80

Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln
85 90 95

Asp Val Asn Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala
100 105 110

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro
115 120 125

Ser Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
130 135 140

10

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His
145 150 155 160

Tyr Thr Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
165 170 175

Ser Asp Met Pro Met Ala Asp Pro Asn Arg Phe Arg Gly Lys Asn Leu
180 185 190

Val Phe His Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val
195 200 205

Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn
210 215 220

Ile Lys Asp Thr Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly
225 230 235 240

Leu Glu Trp Val Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr
245 250 255

Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys
260 265 270

Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala
275 280 285

Val Tyr Tyr Cys Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp
290 295 300

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ser Gly Gly Gly
305 310 315 320

Ser Gly Ser Gly Gly Ser Gly Met Leu Pro Arg Phe Ile Pro Glu Asn
325 330 335

Gln Arg Thr Val Ala Val Tyr Ser Leu Lys Ile Ala Gly Trp His Gly
340 345 350

Pro Lys Ala Pro Tyr Thr Ser Thr Leu Leu Pro Pro Glu Leu Ser Glu
355 360 365

Thr Pro Asn Ala Thr Gln Pro Glu Leu Ala Pro Glu Asp Pro Glu Asp
370 375 380

Ser Ala Leu Leu Glu Asp Pro Val Gly Thr Val Ala Pro Gln Ile Pro
385 390 395 400

Pro Asn Trp His Ile Pro Ser Ile Gln Asp Ala Ala Thr Pro Tyr His
405 410 415

Pro Pro Ala Thr Pro Asn Asn Met Gly Leu Ile Ala Gly Ala Val Gly
420 425 430

Gly Ser Leu Leu Ala Ala Leu Val Ile Cys Gly Ile Val Tyr Trp Met
435 440 445

Arg Arg Arg Thr Gln Lys Ala Pro Lys Arg Ile Arg Leu Pro His Ile
450 455 460

Arg Glu Asp Asp Gln Pro Ser Ser His Gln Pro Leu Phe Tyr
465 470 475

<210> 11

5 <211> 82

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador sintético

10 <400> 11

tgttcgggtca taagcttcag cgccaacgac caactacccc gatcatcagt tacccttaag

60

ccagtgaatt cgagctcggg ac

82

<210> 12
 <211> 82
 <212> ADN
 5 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador sintético
 <400> 12

 acttatcgac tgtccacett tcccccttc cagactcgct ttatatggag ttaagggtccc 60
 10 gaccatgatt acgccaagct cc 82

 <210> 13
 <211> 35
 <212> ADN
 15 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador sintético
 <400> 13

 20 caaccggga tccaccggc gccaccatgg tgagc 35

 <210> 14
 <211> 38
 <212> ADN
 25 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador sintético
 <400> 14

 30 ccccttgga tctgcccc cccaccccc cagaatag 38

 <210> 15
 <211> 41
 <212> ADN
 35 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador sintético
 <400> 15

 40 ttgccagtcg acattccgga tgagcattca tcaggcgggc a 41
 <210> 16
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Artificial
 45 <220>
 <223> Cebador sintético
 <400> 16

 50 gcaaaaactc gagttagac ttccgtgaa ctgatggac 39

 <210> 17
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> Artificial
 55 <220>
 <223> Cebador sintético
 <400> 17

 60 ggaagtcaat tgaagggtt ttgcgctgga tgtggctgcc c 41

 <210> 18
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador sintético
 <400> 18

5 cacactgaat tcgcaatttg tcacaacacc ttctctagaa c 41
 <210> 19
 <211> 47
 <212> ADN
 10 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador sintético
 <400> 19

15 tcctccgggg agccggcgcg tgtaccacat ccaggcaggc ctaccgg 47
 <210> 20
 <211> 54
 <212> ADN
 20 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador sintético
 <400> 20

25 aggggggtgac ggtgggctcg atcgggatgc tgccaacat catccccgag aacc 54
 <210> 21
 <211> 33
 <212> ADN
 30 <213> Artificial
 <220>
 <223> Anticuerpo monocatenario
 <400> 21

35 tcgagtggcg gtggctctgg ttccggtgga tcc 33
 <210> 22
 <211> 38
 <212> ADN
 40 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador sintético
 <400> 22

45 caaatatgcc ttggcggaga attctctcaa gatggccg 38
 <210> 23
 <211> 34
 <212> ADN
 50 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador sintético
 <400> 23

55 cgggggtccg gcgcggatcc cacatccagg cggg 34
 <210> 24
 <211> 37
 <212> ADN
 60 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador sintético
 <400> 24

65 gcaaaggaat tccgatatcc agatgaccca gtccccg 37

<210> 25
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Artificial
 5 <220>
 <223> Cebador sintético
 <400> 25

 10 cggaggatcc accggaacca gagccaccgc cactcgagg 39
 <210> 26
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Artificial
 15 <220>
 <223> Anticuerpo monocatenario
 <400> 26

 20 catagtagtg gcggtggctc tgga 24
 <210> 27
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Artificial
 25 <220>
 <223> Anticuerpo monocatenario
 <400> 27

 30 tcgagtggcg gtggctctgg ttccggtgga tccggt 36
 <210> 28
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Artificial
 35 <220>
 <223> Cebador sintético
 <400> 28

 40 acggtttact acgcccataat ggagcgcgcc tgcc 34
 <210> 29
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Artificial
 45 <220>
 <223> Cebador sintético
 <400> 29

 50 gacggtggac agcatccata tgctgccccg cttc 34
 <210> 30
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Artificial
 55 <220>
 <223> Oligo
 <400> 30

 60 tagtagtggc ggtggctctg gatccgg 27
 <210> 31
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Artificial
 65 <220>
 <223> Oligo

<400> 31
taccggatcc agagccaccg ccactac 27

5 <210> 32
<211> 36
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
10 <223> Cebador sintético
<400> 32
ggcttatgga tccgatatcc agatgaccca gtcccc 36

15 <210> 33
<211> 39
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
20 <223> Cebador sintético
<400> 33
cggaggatcc accggaacca gagccaccgc cactcgagg 39

25 <210> 34
<211> 394
<212> PRT
<213> virus del herpes simple
<400> 34
Met Gly Gly Ala Ala Ala Arg Leu Gly Ala Val Ile Leu Phe Val Val
1 5 10 15
Ile Val Gly Leu His Gly Val Arg Gly Lys Tyr Ala Leu Ala Asp Ala
20 25 30
Ser Leu Lys Met Ala Asp Pro Asn Arg Phe Arg Gly Lys Asp Leu Pro
35 40 45
Val Leu Asp Gln Leu Thr Asp Pro Pro Gly Val Arg Arg Val Tyr His
50 55 60
Ile Gln Ala Gly Leu Pro Asp Pro Phe Gln Pro Pro Ser Leu Pro Ile
65 70 75 80
Thr Val Tyr Tyr Ala Val Leu Glu Arg Ala Cys Arg Ser Val Leu Leu
85 90 95
Asn Ala Pro Ser Glu Ala Pro Gln Ile Val Arg Gly Ala Ser Glu Asp
100 105 110
Val Arg Lys Gln Pro Tyr Asn Leu Thr Ile Ala Trp Phe Arg Met Gly
115 120 125
Gly Asn Cys Ala Ile Pro Ile Thr Val Met Glu Tyr Thr Glu Cys Ser
130 135 140

30

ES 2 667 622 T3

Tyr Asn Lys Ser Leu Gly Ala Cys Pro Ile Arg Thr Gln Pro Arg Trp
145 150 155 160

Asn Tyr Tyr Asp Ser Phe Ser Ala Val Ser Glu Asp Asn Leu Gly Phe
165 170 175

Leu Met His Ala Pro Ala Phe Glu Thr Ala Gly Thr Tyr Leu Arg Leu
180 185 190

Val Lys Ile Asn Asp Trp Thr Glu Ile Thr Gln Phe Ile Leu Glu His
195 200 205

Arg Ala Lys Gly Ser Cys Lys Tyr Ala Leu Pro Leu Arg Ile Pro Pro
210 215 220

Ser Ala Cys Leu Ser Pro Gln Ala Tyr Gln Gln Gly Val Thr Val Asp
225 230 235 240

Ser Ile Gly Met Leu Pro Arg Phe Ile Pro Glu Asn Gln Arg Thr Val
245 250 255

Ala Val Tyr Ser Leu Lys Ile Ala Gly Trp His Gly Pro Lys Ala Pro
260 265 270

Tyr Thr Ser Thr Leu Leu Pro Pro Glu Leu Ser Glu Thr Pro Asn Ala
275 280 285

Thr Gln Pro Glu Leu Ala Pro Glu Asp Pro Glu Asp Ser Ala Leu Leu
290 295 300

Glu Asp Pro Val Gly Thr Val Ala Pro Gln Ile Pro Pro Asn Trp His
305 310 315 320

Ile Pro Ser Ile Gln Asp Ala Ala Thr Pro Tyr His Pro Pro Ala Thr
325 330 335

Pro Asn Asn Met Gly Leu Ile Ala Gly Ala Val Gly Gly Ser Leu Leu
340 345 350

Ala Ala Leu Val Ile Cys Gly Ile Val Tyr Trp Met Arg Arg Arg Thr
355 360 365

Gln Lys Ala Pro Lys Arg Ile Arg Leu Pro His Ile Arg Glu Asp Asp
370 375 380

Gln Pro Ser Ser His Gln Pro Leu Phe Tyr
385 390

<210> 35

<211> 1185

<212> ADN

5 <213> virus del herpes simple

<400> 35

ES 2 667 622 T3

```

atgggggggg ctgccgccag gttggggggc gtgattttgt ttgtcgatcat agtgggcctc 60
catgggggtcc gcgggcaaata tgccttgggc gatgcctctc tcaagatggc cgaccccaat 120
cgcttttcgc gcaaagacct tccgggtcctg gaccagctga ccgacctctc ggggggtccg 180
cgcgtgtacc acatccaggc gggcctacca gacctgttcc agccccccag cctcccgatc 240
acggttttact acgcccgtgtt ggagcgcgcc tgccgcagcg tgctcctaaa cgcaccgtcg 300
gaggcccccc agattgtccg cggggcctcc gaagacgtcc ggaaacaacc ctacaacctg 360
accatcgctt ggtttcggat gggaggcaac tgtgctatcc ccatcacggt catggagtac 420
accgaatgct cctacaacaa gtctctgggg gcctgtccca tccgaacgca gccccgctgg 480
aactactatg acagcttcag cgcgctcagc gaggataacc tgggggttct gatgcacgcc 540
cccgcgtttg agaccgccgg cacgtacctg cggctcgtga agataaacga ctggacggag 600
attacacagt ttatcctgga gcaccgagcc aagggtcctc gtaagtacgc cctcccgctg 660
cgcaccccc cgtcagcctg cctgtccccc caggcctacc agcaggggggt gacggtggac 720
agcatcggga tgctgccccg ctccatcccc gagaaccagc gcaccgtcgc cgtatacagc 780
ttgaagatcg ccgggtggca cgggcccagg gcccataca cgagcaccct gctgcccccg 840
gagctgtccg agacccccaa cgcacgcag ccagaactcg ccccggaaga ccccgaggat 900
tcggccctct tggaggacct cgtggggacg gtggcgccgc aaatcccacc aaactggcac 960
ataccgtcga tccaggacgc cgcgacgcct taccatcccc cggccacccc gaacaacatg 1020
ggcctgatcg ccggcgcggt gggcggcagt ctctggcag ccctggatcat ttgcggaatt 1080
gtgtactgga tgcgccgccg cactcaaaaa gcccacaagc gcatacgct cccccacatc 1140
cgggaagacg accagccgtc ctgcaccag cccttgtttt actag 1185

```

<210> 36

<211> 1512

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> gD de VHS y anticuerpo monocatenario

<400> 36

```

atgggggggg ctgccgccag gttggggggc gtgattttgt ttgtcgatcat agtgggcctc 60
catgggggtcc gcgggcaaata tgccttgggc gatgcctctc tcaagatggc cgaccccaat 120
cgcttttcgc gcaaagacct tccgggtcctg gaccagctga ccgacctctc ggggggtccg 180
cgcgtgtacc acatccaggc gggcctacca gacctgttcc agccccccag cctcccgatc 240
acggttttact acgcccatag tagtggcggt ggctctggat ccgatatcca gatgaccag 300
tccccgagct ccctgtccgc ctctgtgggc gatagggta ccatcacctg ccgtgccagt 360
caggatgtga atactgctgt agcctggat caacagaaac caggaaaagc tccgaagctt 420
ctgattttact cggcatcctt cctctactct ggagtcctt ctgccttctc tggtagccgt 480

```

10

ES 2 667 622 T3

tccgggacgg atttactct gaccatcagc agtctgcagc cggaagactt cgcaacttat 540
tactgtcagc aacattatac tactctctccc acgttcggac agggtagcaa ggtggagatc 600
aaatcggata tgcgatggc tgatccgaac cgtttccgcg gtaagaacct ggtttttcat 660
tctgagggtc agctgggtga gtctggcggg ggctgggtgc agccaggggg ctactccgt 720
ttgtctgtg cagcttctgg ctccaacatt aaagacacct atatactg ggtgcgtcag 780
gccccgggta agggcctgga atgggttgca aggatttatc ctacgaatgg ttatactaga 840
tatgccgata gcgtcaaggg cgttttctact ataagcgag acacatcaa aaacacagcc 900
tacctacaaa tgaacagctt aagagctgag gacactgccg tctattattg tagcogctgg 960
ggaggggacg gcttctatgc tatggactac tgggttcaag gaacactagt caccgtctcc 1020
tcgagtggcg gtggctctgg ttccgggtga tccgggtatgc tgccccgctt catccccgag 1080
aaccagcgca ccgtcgccgt atacagcttg aagatcgccg ggtggcacgg gcccaaggcc 1140
ccatacacga gcacctgct gccccgggag ctgtccgaga ccccaacgc cagcgagcca 1200
gaactcgccc cggaagaccc cgaggattcg gccctcttgg aggaccccg ggggacgggtg 1260
gcgcgcgaaa tcccacaaa ctggcacata ccgtcgatcc aggaacggcg gacgccttac 1320
catcccccg ccaccccgaa caacatgggc ctgatcgccg gcgcgggtgg cggcagtctc 1380
ctggcagccc tggtcatttg cggaattgtg tactggatgc gccgcgcac tcaaaaagcc 1440
ccaaagegca tacgcctccc ccacatccg gaagacgacc agccgtcttc gcaccagccc 1500
ttgttttact ag 1512

<210> 37

<211> 1866

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> gD de VHS y anticuerpo monocatenario

<400> 37

atgggggggg ctgccgccag gttgggggce gtgattttgt ttgtcgtcat agtgggctc 60
catgggggtcc gcggcaata tgctttggcg gagaattccg atatccagat gacccagtc 120
ccgagctccc tgccgcctc tgtgggcgat agggtagca tcaactgccg tgccagtcag 180
gatgtgaata ctgctgtagc ctggtatcaa cagaaaccag gaaaagctcc gaagcttctg 240
atttactcgg catccttctt ctactctgga gtcccttctc gcttctctgg tagccgttc 300
gggacggatt tcactctgac catcagcagt ctgcagccg aagacttcgc aacttattac 360
tgtcagcaac attatactac tcctcccacg ttcggacagg gtaccaaggt ggagatcaaa 420
tcggatatgc cgatggctga tccgaaccgt ttccgcggta agaacctggt ttttcattct 480
gaggttcagc tgggtggagtc tggcgggtgc ctgggtgcag cagggggctc actccgtttg 540
tcctgtgcag cttctggctt caacattaaa gacacctata tacactgggt gcgtcaggcc 600
ccgggtaagg gcctggaatg ggttgcaagg atttatccta cgaatgggta tactagatat 660

10

gccgatagcg tcaagggccg ttctactata agcgagaca catccaaaaa cacagcctac 720
ctacaaatga acagcttaag agctgaggac actgccgtct attattgtag ccgctgggga 780
ggggacggct tctatgctat ggactactgg ggtcaaggaa cactagtcac cgtctcctcg 840
agtggcgggtg gctctgggtc cgggtgatcc cacatccagg cgggcctacc agaccggtc 900
cagcccccca gcctcccgat cagggtttac tacgccgtgt tggagcgcg ctcgcgcagc 960
gtgctcctaa acgcaccgtc ggaggccccc cagattgtcc gcggggcctc cgaagacgtc 1020
cggaacaac cctacaacct gaccatcgct tgggttcgga tgggaggcaa ctgtgctatc 1080
cccatcacgg tcatggagta caccgaatgc tcctacaaca agtctctggg ggctgtcccc 1140
atccgaacgc agccccgctg gaactactat gacagcttca gcgccgtcag cgaggataac 1200
ctgggggttcc tgatgcacgc ccccgcggtt gagaccgccc gcacgtacct gcggctcgtg 1260
aagataaacg actggacgga gattacacag ttatctctgg agcaccgagc caagggtccc 1320
tgtaagtacg cctcccgct gcgcaccccc cgtcagcct gcctgtcccc ccaggcctac 1380
cagcaggggg tgacggtgga cagcatcggg atgctgcccc gcttcatccc cgagaaccag 1440
cgcaccgtcg ccgtatacag cttgaagatc gccgggtggc acgggcccac ggccccatac 1500
acgagcaccc tgctgcccc ggagctgtcc gagaccccca acgccacgca gccagaactc 1560
gccccggaag accccgagga ttccggccctc ttggaggacc ccgtggggac ggtggcgccg 1620
caaatccac caaactggca cataccgtcg atccaggac ccgcgacgcc ttaccatccc 1680
ccggccccc cgaacaacat gggcctgatc gccggcgccg tgggaggcag tctcctggca 1740
gccctggtca ttgcggaat tgtgtactgg atgcgcgcc gcactcaaaa agccccaaag 1800
cgcatacgcc tccccacat ccgggaagac gaccagcgt cctcgacca gcccttgttt 1860
tactag 1866

<210> 38

<211> 625

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> gD de VHS y anticuerpo monocatenario

<400> 38

Lys Tyr Ala Leu Ala Asp Ala Ser Leu Lys Met Ala Asp Pro Asn Arg
1 5 10 15

Phe Arg Gly Lys Gly Ile Pro Val Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser
20 25 30

Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
35 40 45

Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys
50 55 60

10

ES 2 667 622 T3

Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr
 65 70 75 80
 Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe
 85 90 95
 Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr
 100 105 110
 Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys
 115 120 125
 Val Glu Ile Lys Ser Asp Met Pro Met Ala Asp Pro Asn Arg Phe Arg
 130 135 140
 Gly Lys Asn Leu Val Phe His Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly
 145 150 155 160
 Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala
 165 170 175
 Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala
 180 185 190
 Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly
 195 200 205
 Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala
 210 215 220
 Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala
 225 230 235 240
 Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe
 245 250 255
 Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 260 265 270
 Ser Gly Gly Gly Ser Gly Ser Gly Leu Asp Gln Leu Thr Asp Pro Pro
 275 280 285
 Gly Ser Arg Arg Val Tyr His Ile Gln Ala Gly Leu Pro Asp Pro Phe
 290 295 300
 Gln Pro Pro Ser Leu Pro Ile Thr Val Tyr Tyr Ala Val Leu Glu Arg
 305 310 315 320
 Ala Cys Arg Ser Val Leu Leu Asn Ala Pro Ser Glu Ala Pro Gln Ile
 325 330 335

ES 2 667 622 T3

Val Arg Gly Ala Ser Glu Asp Val Arg Lys Gln Pro Tyr Asn Leu Thr
340 345 350

Ile Ala Trp Phe Arg Met Gly Gly Asn Cys Ala Ile Pro Ile Thr Val
355 360 365

Met Glu Tyr Thr Glu Cys Ser Tyr Asn Lys Ser Leu Gly Ala Cys Pro
370 375 380

Ile Arg Thr Gln Pro Arg Trp Asn Tyr Tyr Asp Ser Phe Ser Ala Val
385 390 395 400

Ser Glu Asp Asn Leu Gly Phe Leu Met His Ala Pro Ala Phe Glu Thr
405 410 415

Ala Gly Thr Tyr Leu Arg Leu Val Lys Ile Asn Asp Trp Thr Glu Ile
420 425 430

Thr Gln Phe Ile Leu Glu His Arg Ala Lys Gly Ser Cys Lys Tyr Ala
435 440 445

Leu Pro Leu Arg Ile Pro Pro Ser Ala Cys Leu Ser Pro Gln Ala Tyr
450 455 460

Gln Gln Gly Val Thr Val Asp Ser Ile Gly Met Leu Pro Arg Phe Ile
465 470 475 480

Pro Glu Asn Gln Arg Thr Val Ala Val Tyr Ser Leu Lys Ile Ala Gly
485 490 495

Trp His Gly Pro Lys Ala Pro Tyr Thr Ser Thr Leu Leu Pro Pro Glu
500 505 510

Leu Ser Glu Thr Pro Asn Ala Thr Gln Pro Glu Leu Ala Pro Glu Asp
515 520 525

Pro Glu Asp Ser Ala Leu Leu Glu Asp Pro Val Gly Thr Val Ala Pro
530 535 540

Gln Ile Pro Pro Asn Trp His Ile Pro Ser Ile Gln Asp Ala Ala Thr
545 550 555 560

Pro Tyr His Pro Pro Ala Thr Pro Asn Asn Met Gly Leu Ile Ala Gly
565 570 575

Ala Val Gly Gly Ser Leu Leu Ala Ala Leu Val Ile Cys Gly Ile Val
580 585 590

Tyr Trp Met Arg Arg Arg Thr Gln Lys Ala Pro Lys Arg Ile Arg Leu
595 600 605

Pro His Ile Arg Glu Asp Asp Gln Pro Ser Ser His Gln Pro Leu Phe
610 615 620

Tyr
625

<210> 39
<211> 1953
<212> ADN
<213> Artificial

<220>

<223> gD de VHS y anticuerpo monocatenario

<400> 39

```

atgggggggg ctgccgccag gttgggggcc gtgattttgt ttgtcgtcat agtgggcctc      60
catgggggtcc gcggcaaata tgccttggcg gatgcctctc tcaagatggc cgaccccaat      120
cgcttttcgcy gcaaaggaaat tccggtctcc gatatccaga tgacccagtc cccgagctcc      180
ctgtccgcct ctgtgggcga tagggtcacc atcacctgcc gtgccagtca ggatgtgaat      240
actgctgtag cctgggtatca acagaaacca ggaaaagctc cgaagccttct gatttactcg      300
gcatecttcc tctactctgg agtcccttct cgcttctctg gtagccgttc cgggacggat      360
ttcactctga ccatcagcag tctgcagccg gaagacttcg caacttatta ctgtcagcaa      420
cattatacta ctctccccc gttcggacag ggtaccaagg tggagatcaa atcggatatg      480
ccgatggctg atccgaaccg ttcccgcggt aagaacctgg tttttcattc tgagggttcag      540
ctgggtggagt ctggcgggtg cctgggtgcag ccagggggct cactccggtt gtctctgtgca      600
gcttctgggt tcaacattaa agacacctat atacactggg tgcgtcaggc cccgggtaag      660
ggcctggaat ggggtgcaag gatttatcct acgaatgggt atactagata tgccgatagc      720
gtcaagggcc gtttctactat aagcgcagac acatccaaaa acacagccta cctacaaatg      780
aacagcttaa gagctgagga cactgccgtc tattattgta gccgctgggg aggggacggc      840
ttctatgcta tggactactg gggtaagga acactagtca ccgtctctc gagtggcggt      900
ggctctgggt ccggtctgga ccagctgacg gatcctccgg ggagccggcg cgtgtaccac      960
atccaggcag gcctaccgga cccgttccag ccccccagcc tcccgatcac ggtttactac     1020
gccgtgttgg agcgcgcctg ccgcagcgtg ctctaaacg caccgtcgga ggccccccag     1080
attgtccgcy gggcctccga agacgtccgg aaacaacct acaacctgac catcgcttgg     1140
tttcggatgg gaggcaactg tctatcccc atcacggtca tggagtacac cgaatgctcc     1200
tacaacaagt ctctgggggc ctgtcccatc cgaacgcagc cccgctggaa ctactatgac     1260
agcttcagcy ccgtcagcga ggataacctg gggttctga tgcacgcccc cgcgtttgag     1320
accgcccgca cgtacctgcy gctcgtgaag ataaacgact ggacggagat tacacagttt     1380
atcctggagc accgagccaa gggctcctgt aagtacgccc tcccgtgcy catccccccg     1440
5  tcagcctgcc tgtccccca ggccctaccag caggggggtga cgggtggacag catcgggatg     1500
   ctgccccgct tcatccccga gaaccagcgc accgtcgccg tatacagctt gaagatcgcc     1560
   ggggtggcag ggcccaaggc cccatacacg agcaccctgc tgcccccgga gctgtccgag     1620
   acccccaacg ccacgcagcc agaactcgcc ccggaagacc ccgaggattc ggccctcttg     1680
   gaggaccccg tggggacggt ggcgcgcaa atcccaccaa actggcacat accgtcgatc     1740
   caggacgccg cgacgcctta ccatcccccg gccacccgga acaacatggg cctgatcgcc     1800
   ggcgcgggtg ggcgcagtct cctggcagcc ctggtcattt gcggaattgt gtactggatg     1860
   cgccgccgca ctcaaaaagc cccaaagcgc atacgcctcc cccacatccg ggaagacgac     1920
   cagccgtcct cgcaccagcc cttgttttac tag                                1953

```

<210> 40

<211> 625

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> gD de VHS y anticuerpo monocatenario

10

ES 2 667 622 T3

<400> 40

Lys	Tyr	Ala	Leu	Ala	Asp	Ala	Ser	Leu	Lys	Met	Ala	Asp	Pro	Asn	Arg	1	5	10	15
Phe	Arg	Gly	Lys	Gly	Ile	Pro	Val	Ser	Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	20	25	30	
Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	35	40	45	
Arg	Ala	Ser	Gln	Asp	Val	Asn	Thr	Ala	Val	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	50	55	60	
Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Ser	Ala	Ser	Phe	Leu	Tyr	65	70	75	80
Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Arg	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	85	90	95	
Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	100	105	110	
Cys	Gln	Gln	His	Tyr	Thr	Thr	Pro	Pro	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	115	120	125	
Val	Glu	Ile	Lys	Ser	Asp	Met	Pro	Met	Ala	Asp	Pro	Asn	Arg	Phe	Arg	130	135	140	
Gly	Lys	Asn	Leu	Val	Phe	His	Ser	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	145	150	155	160

ES 2 667 622 T3

Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala
 165 170 175
 Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala
 180 185 190
 Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly
 195 200 205
 Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala
 210 215 220
 Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala
 225 230 235 240
 Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe
 245 250 255
 Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 260 265 270
 Ser Gly Gly Gly Ser Gly Ser Gly Leu Asp Gln Leu Thr Asp Pro Pro
 275 280 285
 Gly Ser Arg Arg Val Tyr His Ile Gln Ala Gly Leu Pro Asp Pro Phe
 290 295 300
 Gln Pro Pro Ser Leu Pro Ile Thr Val Tyr Tyr Ala Val Leu Glu Arg
 305 310 315 320
 Ala Cys Arg Ser Val Leu Leu Asn Ala Pro Ser Glu Ala Pro Gln Ile
 325 330 335
 Val Arg Gly Ala Ser Glu Asp Val Arg Lys Gln Pro Tyr Asn Leu Thr
 340 345 350
 Ile Ala Trp Phe Arg Met Gly Gly Asn Cys Ala Ile Pro Ile Thr Val
 355 360 365
 Met Glu Tyr Thr Glu Cys Ser Tyr Asn Lys Ser Leu Gly Ala Cys Pro
 370 375 380
 Ile Arg Thr Gln Pro Arg Trp Asn Tyr Tyr Asp Ser Phe Ser Ala Val
 385 390 395 400
 Ser Glu Asp Asn Leu Gly Phe Leu Met His Ala Pro Ala Phe Glu Thr
 405 410 415
 Ala Gly Thr Tyr Leu Arg Leu Val Lys Ile Asn Asp Trp Thr Glu Ile
 420 425 430

ES 2 667 622 T3

Thr Gln Phe Ile Leu Glu His Arg Ala Lys Gly Ser Cys Lys Tyr Ala
435 440 445

Leu Pro Leu Arg Ile Pro Pro Ser Ala Cys Leu Ser Pro Gln Ala Tyr
450 455 460

Gln Gln Gly Val Thr Val Gly Ser Ile Gly Met Leu Pro Asn Ile Ile
465 470 475 480

Pro Glu Asn Gln Arg Thr Val Ala Val Tyr Ser Leu Lys Ile Ala Gly
485 490 495

Trp His Gly Pro Lys Ala Pro Tyr Thr Ser Thr Leu Leu Pro Pro Glu
500 505 510

Leu Ser Glu Thr Pro Asn Ala Thr Gln Pro Glu Leu Ala Pro Glu Asp
515 520 525

Pro Glu Asp Ser Ala Leu Leu Glu Asp Pro Val Gly Thr Val Ala Pro
530 535 540

Gln Ile Pro Pro Asn Trp His Ile Pro Ser Ile Gln Asp Ala Ala Thr
545 550 555 560

Pro Tyr His Pro Pro Ala Thr Pro Asn Asn Met Gly Leu Ile Ala Gly
565 570 575

Ala Val Gly Gly Ser Leu Leu Ala Ala Leu Val Ile Cys Gly Ile Val
580 585 590

Tyr Trp Met Arg Arg Arg Thr Gln Lys Ala Pro Lys Arg Ile Arg Leu
595 600 605

Pro His Ile Arg Glu Asp Asp Gln Pro Ser Ser His Gln Pro Leu Phe
610 615 620

Tyr
625

<210> 41

<211> 1953

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> gD de VHS y anticuerpo monocatenario

<400> 41

atgggggggg ctgccgccag gtggggggcc gtgattttgt ttgtcgatcat agtgggacctc 60

catgggggtcc ggggcaaata tgccttggcg gatgaccttc tcaagatggc cgaccccaat 120

cgcttttcgcg gcaaaggaat tccgggtctcc gatateccaga tgacccagtc cccgagctcc 180

10 ctgtccgcct ctgtgggcga tagggtcacc atcacctgcc gtgccagtca ggatgtgaat 240

```

actgctgtag cctgggtatca acagaaacca ggaaaagctc cgaagcttct gatttactcg 300
gcatecttcc tctactctgg agtcccttct cgcttctctg gtagccgttc cgggacggat 360
ttcactctga ccatcagcag tctgcagccg gaagacttct caacttatta ctgtcagcaa 420
cattatacta ctccctccac gtccggacag ggtaccaagg tggagatcaa atcggatatg 480
ccgatggctg atccgaaccg tttccgcggg aagaacctgg tttttcattc tgaggttcag 540
ctgggtggagt ctggcgggtg cctgggtgcag ccagggggct cactccgttt gtccgtgtgca 600
gcttctggct tcaacattaa agacacctat atacactggg tgcgtcaggc cccgggtaag 660
ggcctggaat ggggttgaag gatttatcct acgaatggtt atactagata tgccgatagc 720
gtcaagggcc gtttctactat aagcgcagac acatccaaaa acacagccta cctacaaatg 780
aacagcttaa gagctgagga cactgccgtc tattattgta gccgctgggg aggggacggc 840
ttctatgcta tggactactg ggggtcaagga acactagtca ccgtctcttc gagtggcggt 900
ggctctggtt ccggtctgga ccagctgacg gatcctccgg ggagccggcg cgtgtaccac 960
atccaggcag gcctaccgga cccgttccag ccccccagcc tcccgatcac ggtttactac 1020
gccgtgttg agcgcgcctg ccgcagcgtg ctctaaacg caccgtcgga ggccccccag 1080
attgtccgcg gggcctccga agacgtccgg aaacaacctt acaacctgac catcgcttgg 1140
tttcggatgg gaggcaactg tgctatcccc atcacggtca tggagtacac cgaatgctcc 1200
tacaacaagt ctctgggggc ctgtcccatc cgaacgcagc cccgctggaa ctactatgac 1260
agcttcagcg ccgtcagcga ggataacctg ggggttctga tgcacgcccc cgcgtttgag 1320
accgccggca cgtacctgcg gctcgtgaag ataaacgact ggacggagat tacacagttt 1380
atcctggagc accgagccaa gggctcctgt aagtacgccc tcccgtgctg catccccccg 1440
tcagcctgcc tgtcccccca ggcctaccag caggggggtga cgggtgggctc gatcgggatg 1500
ctgcccaaca tcatccccga gaaccagcgc accgtcgccg tatacagctt gaagatcgcc 1560
gggtggcacg ggcccaaggc ccatacacg agcacctgc tgcccccgga gctgtccgag 1620
acccccaaag ccacgcagcc agaactcgcc ccggaagacc ccgaggattc ggccctcttg 1680
gaggaccccg tggggacggt ggcgcgcgaa atcccaccaa actggcacat accgtcgatc 1740
caggacgccg cgacgcctta ccatcccccg gccaccccg acaacatggg cctgatcgcc 1800
ggcgcgggtg gcggcagctt cctggcagcc ctggtcattt gcggaattgt gtactggatg 1860
cgccgccgca ctcaaaaagc cccaaagcgc atacgcctcc cccacatccg ggaagacgac 1920
cagccgtcct cgcaccagcc cttgttttac tag 1953

```

<210> 42
 <211> 625
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> gD de VHS y anticuerpo monocatenario
 <400> 42

5

ES 2 667 622 T3

Lys Tyr Ala Leu Ala Asp Ala Ser Leu Lys Met Ala Asp Pro Asn Arg
 1 5 10 15
 Phe Arg Gly Lys Gly Ile Pro Val Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser
 20 25 30
 Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
 35 40 45
 Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys
 50 55 60
 Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr
 65 70 75 80
 Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe
 85 90 95
 Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr
 100 105 110
 Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys
 115 120 125
 Val Glu Ile Lys Ser Asp Met Pro Met Ala Asp Pro Asn Arg Phe Arg
 130 135 140
 Gly Lys Asn Leu Val Phe His Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly
 145 150 155 160
 Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala
 165 170 175
 Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala
 180 185 190
 Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly
 195 200 205
 Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala
 210 215 220
 Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala
 225 230 235 240
 Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe
 245 250 255
 Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 260 265 270

ES 2 667 622 T3

Ser Gly Gly Gly Ser Gly Ser Gly Leu Asp Gln Leu Thr Asp Pro Pro
 275 280 285
 Gly Val Arg Arg Val Tyr His Ile Gln Ala Gly Leu Pro Asp Pro Phe
 290 295 300
 Gln Pro Pro Ser Leu Pro Ile Thr Val Tyr Tyr Ala Val Leu Glu Arg
 305 310 315 320
 Ala Cys Arg Ser Val Leu Leu Asn Ala Pro Ser Glu Ala Pro Gln Ile
 325 330 335
 Val Arg Gly Ala Ser Glu Asp Val Arg Lys Gln Pro Tyr Asn Leu Thr
 340 345 350
 Ile Ala Trp Phe Arg Met Gly Gly Asn Cys Ala Ile Pro Ile Thr Val
 355 360 365
 Met Glu Tyr Thr Glu Cys Ser Tyr Asn Lys Ser Leu Gly Ala Cys Pro
 370 375 380
 Ile Arg Thr Gln Pro Arg Trp Asn Tyr Tyr Asp Ser Phe Ser Ala Val
 385 390 395 400
 Ser Glu Asp Asn Leu Gly Phe Leu Met His Ala Pro Ala Phe Glu Thr
 405 410 415
 Ala Gly Thr Tyr Leu Arg Leu Val Lys Ile Asn Asp Trp Thr Glu Ile
 420 425 430
 Thr Gln Phe Ile Leu Glu His Arg Ala Lys Gly Ser Cys Lys Tyr Ala
 435 440 445
 Leu Pro Leu Arg Ile Pro Pro Ser Ala Cys Leu Ser Pro Gln Ala Tyr
 450 455 460
 Gln Gln Gly Val Thr Val Asp Ser Ile Gly Met Leu Pro Arg Phe Ile
 465 470 475 480
 Pro Glu Asn Gln Arg Thr Val Ala Val Tyr Ser Leu Lys Ile Ala Gly
 485 490 495
 Trp His Gly Pro Lys Ala Pro Tyr Thr Ser Thr Leu Leu Pro Pro Glu
 500 505 510
 Leu Ser Glu Thr Pro Asn Ala Thr Gln Pro Glu Leu Ala Pro Glu Asp
 515 520 525
 Pro Glu Asp Ser Ala Leu Leu Glu Asp Pro Val Gly Thr Val Ala Pro
 530 535 540

ES 2 667 622 T3

Gln Ile Pro Pro Asn Trp His Ile Pro Ser Ile Gln Asp Ala Ala Thr
545 550 555 560

Pro Tyr His Pro Pro Ala Thr Pro Asn Asn Met Gly Leu Ile Ala Gly
565 570 575

Ala Val Gly Gly Ser Leu Leu Ala Ala Leu Val Ile Cys Gly Ile Val
580 585 590

Tyr Trp Met Arg Arg Arg Thr Gln Lys Ala Pro Lys Arg Ile Arg Leu
595 600 605

Pro His Ile Arg Glu Asp Asp Gln Pro Ser Ser His Gln Pro Leu Phe
610 615 620

Tyr
625

<210> 43

<211> 1953

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> gD de VHS y anticuerpo monocatenario

<400> 43

atgggggggg ctgccgccag gttggggggc gtgattttgt ttgtcgtcat agtgggcctc 60
catgggggtcc gcggcaaaata tgccttgggc gatgcctctc tcaagatggc cgacccaat 120
cgctttcgcg gcaaaggaat tccgggtctcc gatatccaga tgacccagtc cccgagctcc 180
ctgtccgcct ctgtgggcga tagggtcacc atcacctgcc gtgccagtca ggatgtgaat 240
actgctgtag cctggatatca acagaaacca ggaaaagctc cgaagcttct gatttactcg 300
gcaccccttc tctactctgg agtcccttct cgcttctctg gtagccgttc cgggacggat 360
ttcaactctga ccatcagcag tctgcagccg gaagacttcg caacttatta ctgtcagcaa 420
cattatacta ctccctccac gttcggacag ggtaccaagg tggagatcaa atcggatatg 480
ccgatggctg atccgaaccg ttcccgcggt aagaacctgg ttttccattc tgagggttcag 540
ctggtggagt ctggcggtgg cctgggtgcag ccagggggct cactccgttt gtccgtgtgca 600
gcttctggct tcaacattaa agacacctat atacactggg tgcgtcaggc cccgggtaag 660
ggcctggaat gggttgcaag gatttatcct acgaatggtt atactagata tgccgatagc 720
gtcaagggcc gtttcaactat aagcgcagac acatccaaaa acacagccta cctacaaatg 780
aacagcttaa gagctgagga cactgccgtc tattattgta gccgctgggg aggggacggc 840
ttctatgcta tggactactg ggggtcaagga acactagtca ccgtctcctc gagtggcggt 900
ggctctgggt ccgggtctgga ccagctgacg gatccctccg ggggtccggc cgtgtaccac 960
atccaggcgg gcctaccaga cccgttccag cccccagcc tcccgatcac ggtttactac 1020

ES 2 667 622 T3

```

gccgtgttg agcgcgcctg ccgcagcgtg ctcctaaacg caccgtcgga ggccccccag 1080
attgtcccg gggcctccga agacgtccgg aaacaaccct acaacctgac categcttgg 1140
tttcggatgg gaggaactg tgctatcccc atcacggtca tggagtacac cgaatgctcc 1200
tacaacaagt ctctgggggc ctgtcccatc cgaacgcagc cccgttgaa ctactatgac 1260
agcttcagcg ccgtcagcga ggataacctg gggttcctga tgcacgcccc cgcgtttgag 1320
accgccggca cgtacctgcg gctcgtgaag ataaacgact ggacggagat tacacagttt 1380
atcctggagc accgagccaa gggctcctgt aagtacgccc tcccgtcgcg catccccccg 1440
tcagcctgcc tgtcccccca ggcctaccag caggggggtga cgggtggacag catcgggatg 1500
ctgccccgct tcatccccga gaaccagcgc accgtcgcg tatacagctt gaagatcgcc 1560
gggtggcacg ggccaaggc ccatacacg agcacctgc tgcccccgga gctgtccgag 1620
acccccaacg ccacgcagcc agaactcgcc ccggaagacc ccgaggattc ggccctcttg 1680
gaggaccocg tggggacggt ggcgcgcaa atcccaccaa actggcacat accgtcgatc 1740
caggacgccg cgacgcctta ccatcccccg gccaccccg acaacatggg cctgatcgcc 1800
ggcgcggttg ggggcagtct cctggcagcc ctggtcattt gcggaattgt gtactggatg 1860
cgccgcgca ctcaaaaagc cccaaagcgc atacgcctcc ccacatccg ggaagacgac 1920
cagccgtcct cgcaccagcc cttgttttac tag 1953

```

REIVINDICACIONES

1. Virus del herpes simple (VHS) modificado que comprende una envoltura glucoproteica, que presenta un ligando peptídico heterólogo que permite al VHS penetrar en una célula mediante la interacción con un receptor dado que está concebido para unirse, en el que el receptor dado está sobreexpresado o expresado selectivamente por células enfermas, y en el que el ligando peptídico sustituye una parte de gD de la envoltura glucoproteica del VHS eliminada entre las posiciones 1 a 8 y 38 a 55, o entre las posiciones 40 a 61 y 210 a 218.
2. VHS modificado según la reivindicación 1, en el que el ligando peptídico heterólogo puede unirse al receptor dado a 37°C en unas condiciones fisiológicas.
3. VHS modificado según la reivindicación 2, en el que las condiciones fisiológicas son unas condiciones para el crecimiento de células en un cultivo.
4. VHS modificado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la parte eliminada se encuentra entre las posiciones 6 y 38 o en el que la parte eliminada se encuentra entre las posiciones 61 y 218.
5. VHS modificado según una de las reivindicaciones anteriores, en el que el ligando peptídico y la gD forman una proteína de fusión.
6. VHS modificado según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la gD presenta una identidad de por lo menos 80% con respecto a SEC ID n°: 1.
7. VHS modificado según una de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho receptor dado presenta una identidad de por lo menos 90% con respecto al receptor HER2/ErbB2.
8. VHS modificado según la reivindicación 7, en el que dicho receptor dado es el HER2/ErbB2.
9. VHS modificado según una de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho receptor dado es seleccionado de entre el grupo que consiste en: receptor 1 del factor de crecimiento epidérmico (EGFR1), receptor 3 del factor de crecimiento epidérmico (EGFR3), antígeno asociado con la membrana prostática (PMSA), antígeno carcinoembrionario (CEA), disialogangliósido (GD2), receptores 1 y 2 del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR1 y 2).
10. VHS modificado según una de las reivindicaciones anteriores, en el que el ligando peptídico es un anticuerpo monocatenario.
11. VHS modificado según la reivindicación 10, en el que dicho ligando consiste en por lo menos trescientos aminoácidos.
12. VHS modificado según cualquiera de las reivindicaciones 10 u 11, en el que el anticuerpo monocatenario sustituye la parte plegada de Ig incluida en la gD.
13. VHS modificado según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, en el que el anticuerpo monocatenario comprende un primer dominio (VL) y un segundo dominio (VH) y un primer enlazador (L1), que está ubicado entre y conecta los primer y segundo dominios (VL, VH) y que puede permitir que los primer y segundo dominios (VL, VH) tomen una posición relativa adecuada; estando concebidos los primer y segundo dominios (VL, VH) para unirse en unas condiciones específicas a dicho receptor dado.
14. VHS modificado según la reivindicación 13, en el que el anticuerpo monocatenario comprende un segundo enlazador (L2); estando el segundo dominio (VH) ubicado entre y conectando los primer y segundo enlazadores (L1, L2).
15. VHS modificado según la reivindicación 14, en el que el anticuerpo monocatenario comprende un tercer enlazador (L3); estando el primer dominio (VL) ubicado entre y conectando los primer y tercer enlazadores (L1, L3).
16. VHS modificado según una de las reivindicaciones 13 a 15, en el que el primer dominio (VL) consiste en por lo menos cien aminoácidos; el segundo dominio (VH) consiste en por lo menos ciento diez aminoácidos; consistiendo el primer enlazador (L1) en por lo menos doce aminoácidos.
17. VHS modificado según la reivindicación 16, en el que el primer dominio (VL) consiste en no más de ciento diecisiete aminoácidos; el segundo dominio (VH) consiste en no más de ciento treinta aminoácidos; y/o el primer enlazador (L1) consiste en no más de treinta aminoácidos.
18. VHS modificado según una de las reivindicaciones 13 a 17, en el que el primer dominio (VL) presenta una identidad de por lo menos 80% con respecto a SEC ID n°: 2; presentando el segundo dominio (VH) una identidad de

por lo menos 80% con respecto a SEC ID n°: 3.

19. VHS modificado según una de las reivindicaciones 13 a 18, en el que el primer enlazador (L1) presenta una identidad de por lo menos 50% con respecto a SEC ID n°: 4.

20. VHS modificado según una de las reivindicaciones 13 a 19, en el que el segundo enlazador (L2) presenta una identidad de por lo menos 50% con respecto a SEC ID n°: 5.

21. VHS modificado según una de las reivindicaciones 13 a 20, en el que el tercer enlazador (L3) consiste en por lo menos dos y no más de ocho aminoácidos.

22. VHS modificado según una de las reivindicaciones 13 a 21, en el que el tercer enlazador (L3) es seleccionado de entre el grupo que consiste en: una secuencia peptídica que presenta una identidad de por lo menos 50% con respecto a SEC ID n°: 6, y una secuencia peptídica que presenta una identidad de por lo menos 50% con respecto a SEC ID n°: 7.

23. VHS modificado según una de las reivindicaciones anteriores, en el que el ligando peptídico es insertado en la gD (glucoproteína D) de la envoltura glucoproteica y una parte de la gD es eliminada de manera que la gD modificada obtenida es seleccionada de entre el grupo que consiste en: una secuencia que presenta una identidad de por lo menos 70% con respecto a SEC ID n°: 10, y una secuencia que presenta una identidad de por lo menos 70% con respecto a SEC ID n°: 9.

24. VHS modificado según la reivindicación 23, en el que la gD modificada consiste en una secuencia que presenta dicho porcentaje de identidad con respecto a SEC ID n°: 10, o en el que la gD modificada consiste en una secuencia que presenta dicho porcentaje de identidad con respecto a SEC ID n°: 9.

25. VHS modificado según una de las reivindicaciones anteriores, en el que la gD modificada está N-glucosilada en las secuencias consenso Asn-X-Ser y/o Asn-X-Thr y posiblemente O-glucosilada en uno o más residuos Ser y/o Thr.

26. VHS modificado según una de las reivindicaciones anteriores, que comprende además un marcador.

27. VHS modificado según una de las reivindicaciones anteriores, para su utilización como un medicamento.

28. VHS modificado según una de las reivindicaciones anteriores, para su utilización en el tratamiento de una enfermedad tumoral.

29. VHS modificado para su utilización en el tratamiento de una enfermedad tumoral según la reivindicación 28, en el que dicho tumor es seleccionado de entre el grupo que consiste en un tumor de ovario, un tumor de mama, un tumor de próstata, un tumor de colon, un melanoma, un neuroblastoma, un carcinoma de cabeza y cuello, un tumor de estómago y un tumor de glándulas salivales.

30. VHS modificado para su utilización en el tratamiento de una enfermedad tumoral según la reivindicación 28, en el que es tratado el tejido neoangiogénico de un tumor.

31. VHS modificado para su utilización en el tratamiento de una enfermedad tumoral según la reivindicación 28, en el que es tratada una metástasis de un tumor.

32. VHS modificado para su utilización en el tratamiento de una enfermedad tumoral según la reivindicación 31, en el que dicho tumor es seleccionado de entre el grupo que consiste en un tumor de ovario, un tumor de mama, un tumor de próstata, un tumor de colon, un melanoma y un neuroblastoma.

33. VHS modificado según la reivindicación 26, para su utilización en el diagnóstico de una afección fisiológica.

34. VHS modificado según la reivindicación 33, para su utilización en el diagnóstico de una metástasis tumoral.

35. Preparación farmacéutica que comprende un VHS modificado según una de las reivindicaciones 1 a 25 y por lo menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

36. Procedimiento de preparación de un VHS modificado según una de las reivindicaciones 1 a 26, que comprende las etapas de insertar una secuencia de nucleótidos que codifica el ligando en el ADN del VHS de manera que el VHS modificado así obtenido expresa sobre su envoltura el ligando, y de eliminar una parte de gD de la envoltura glucoproteica de VHS entre las posiciones 1 a 8 y 38 a 55, o entre las posiciones 40 a 61 y 210 a 218.

37. Procedimiento según la reivindicación 36, que comprende además una etapa de determinar, que es anterior a la etapa de insertar y durante la cual se identifica dicho ligando expresado por el VHS modificado obtenido.

38. Procedimiento según la reivindicación 37, en el que, durante la etapa de determinar, se analiza la capacidad de los ligandos expresados por el VHS modificado obtenido para unirse a por lo menos un receptor expresado por las células enfermas.

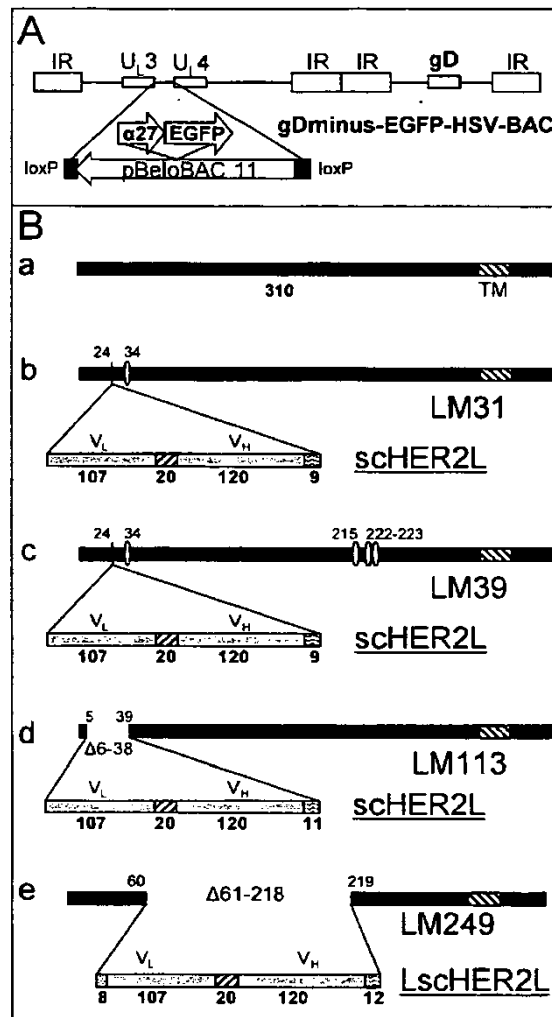


Fig. 1

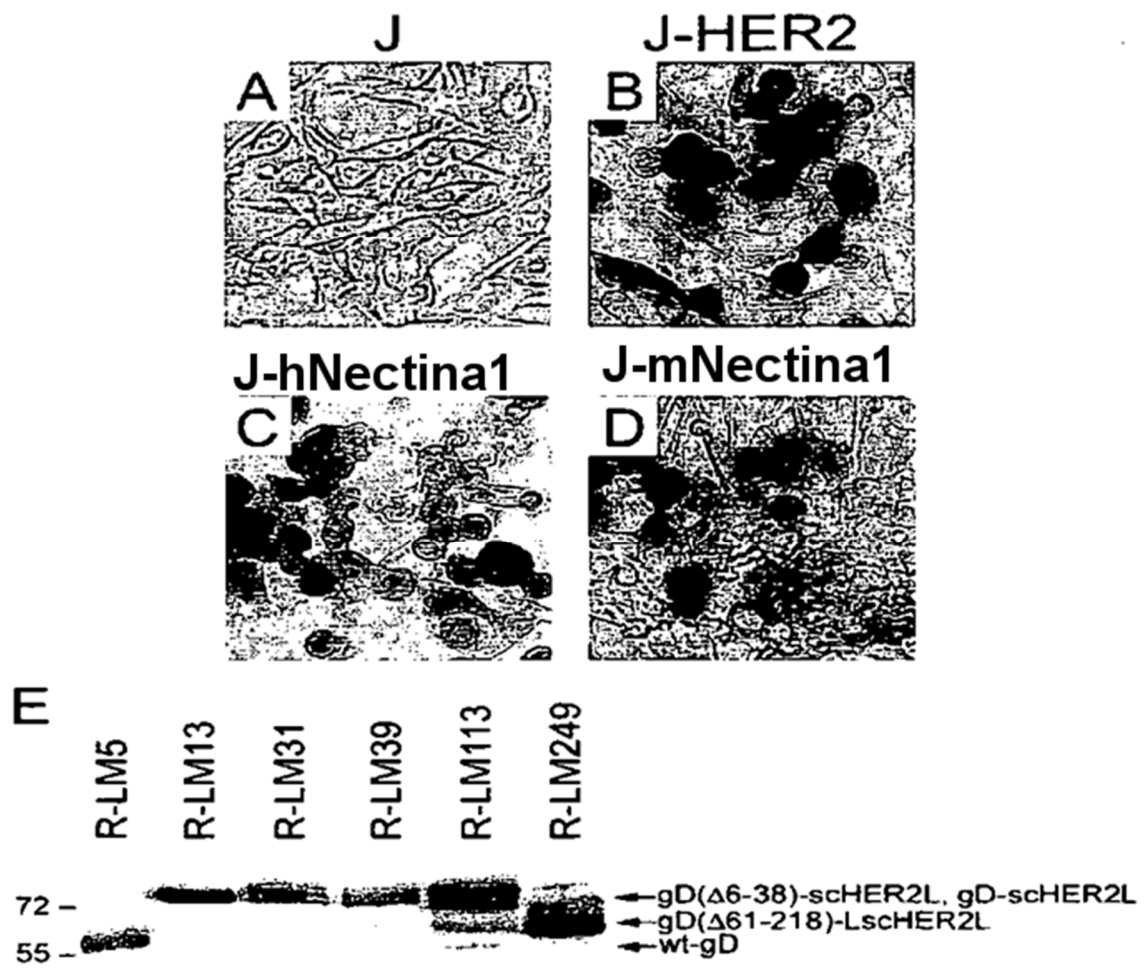


Fig. 2

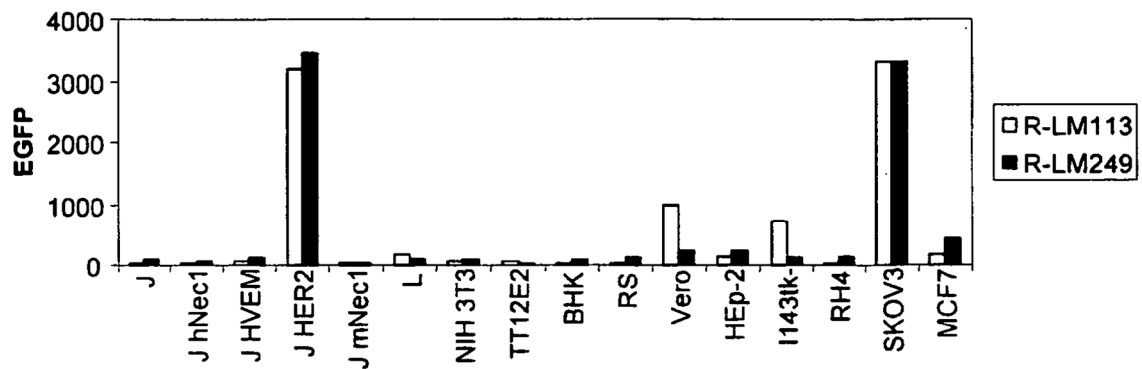


Fig. 3

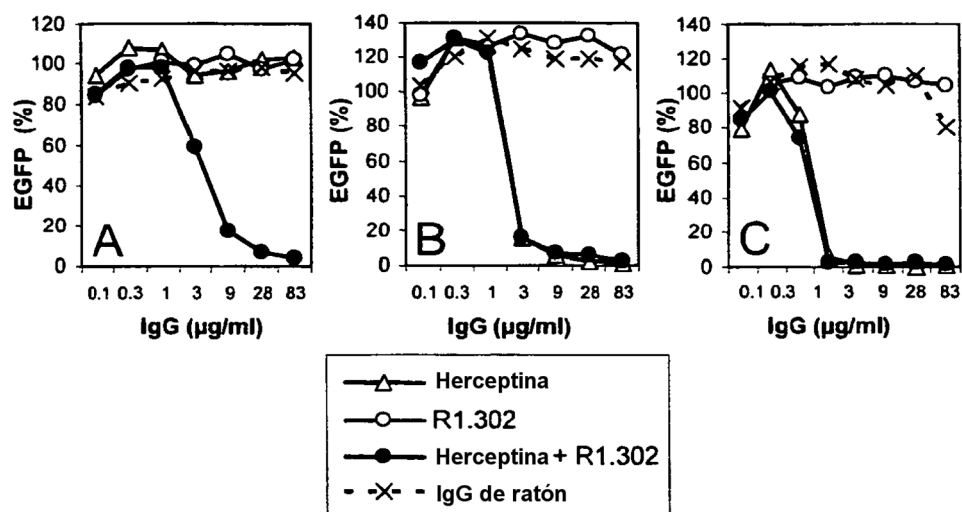


Fig. 5

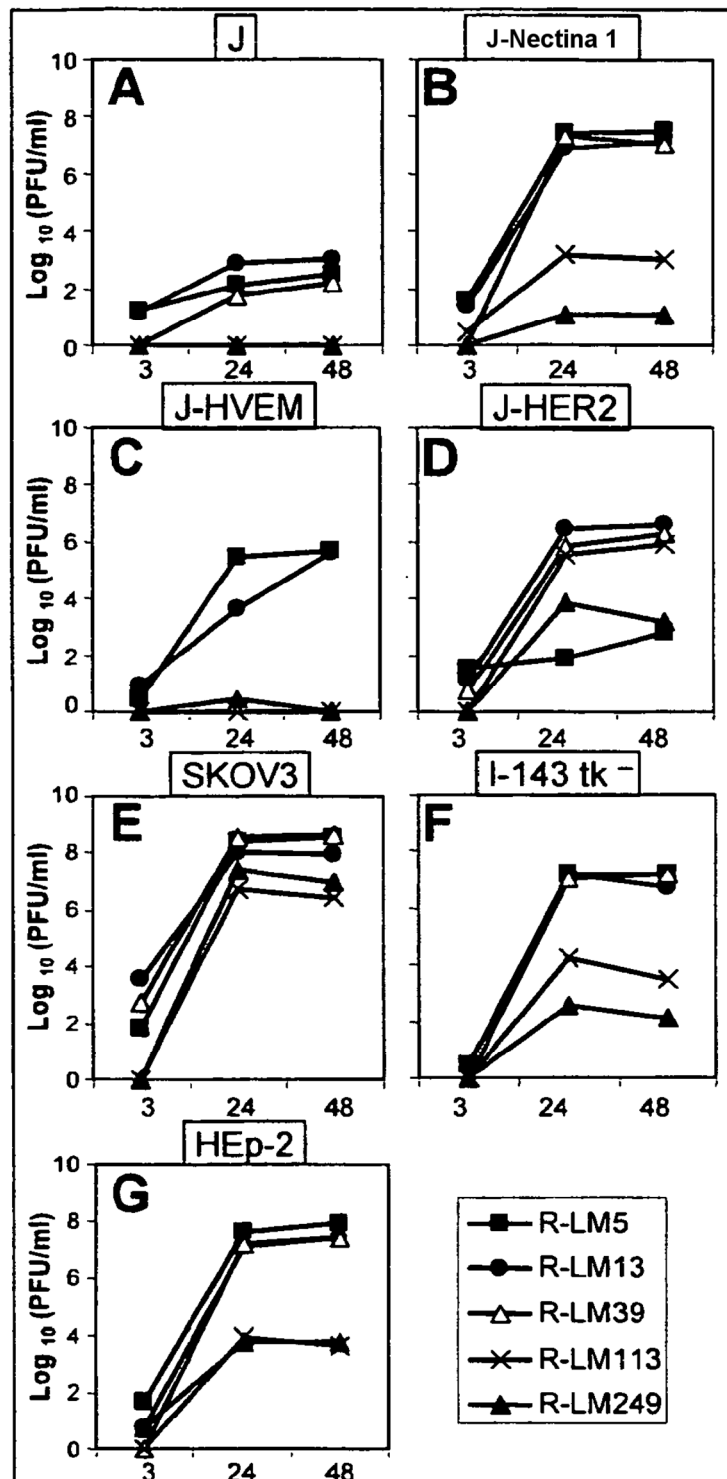


Fig. 4

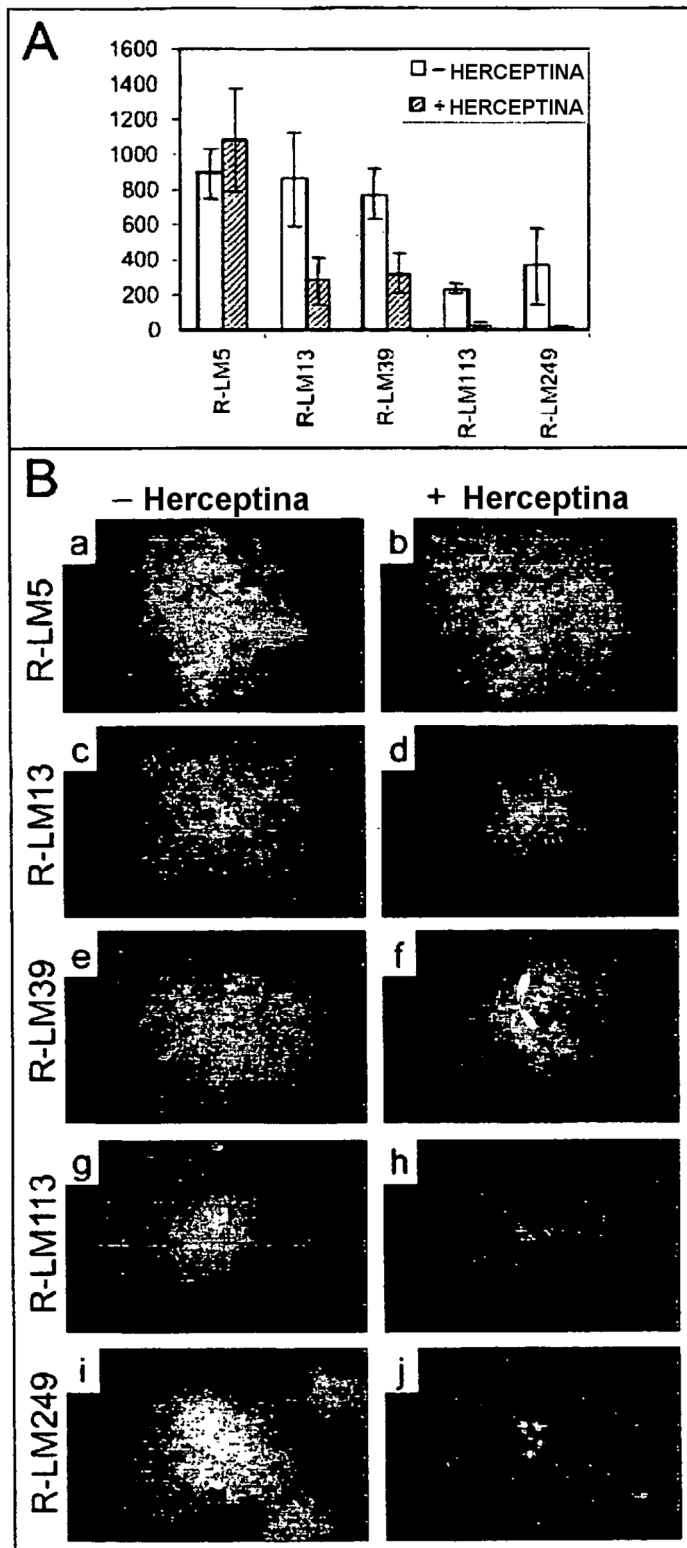


Fig. 6

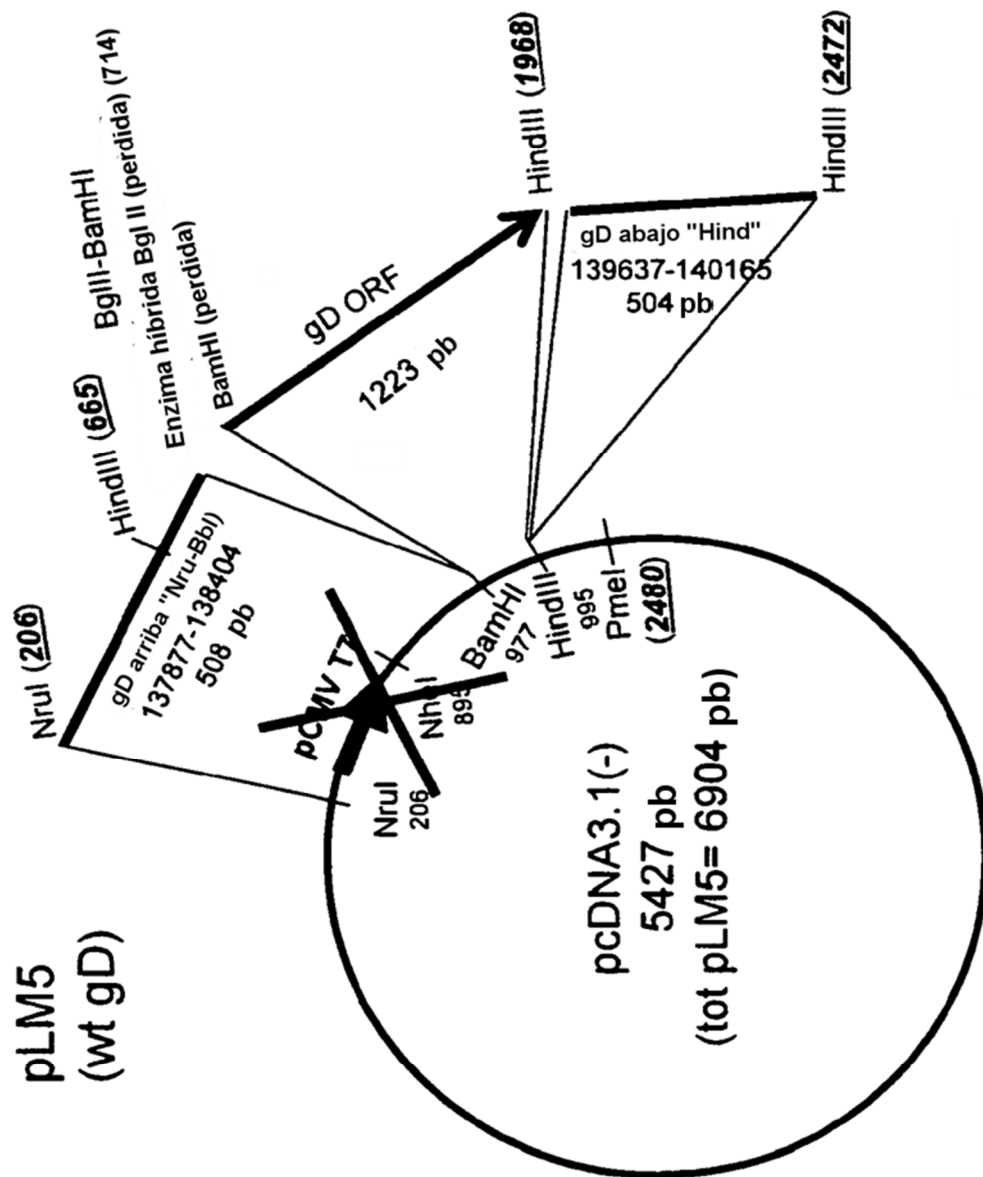
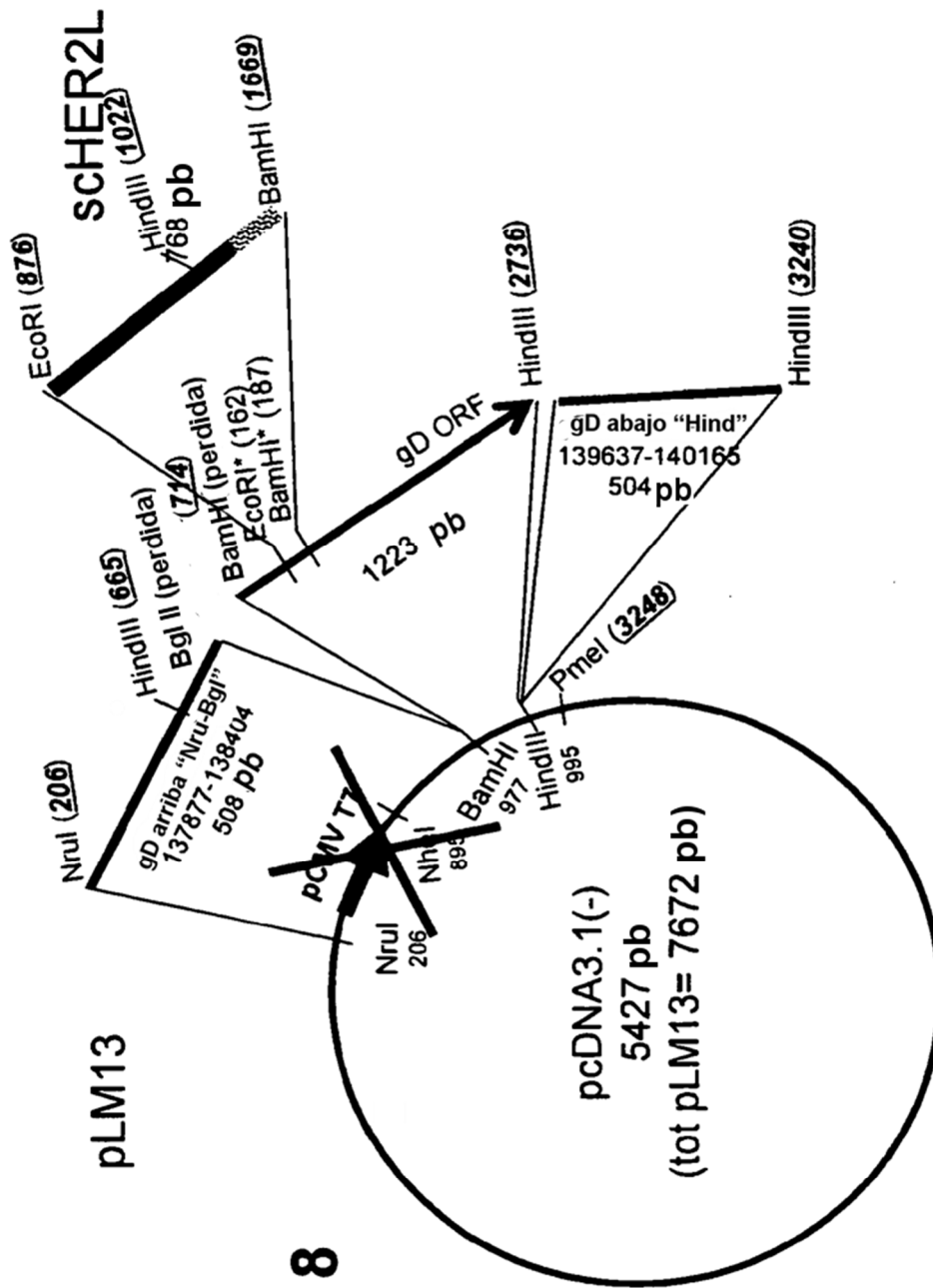


Fig. 7



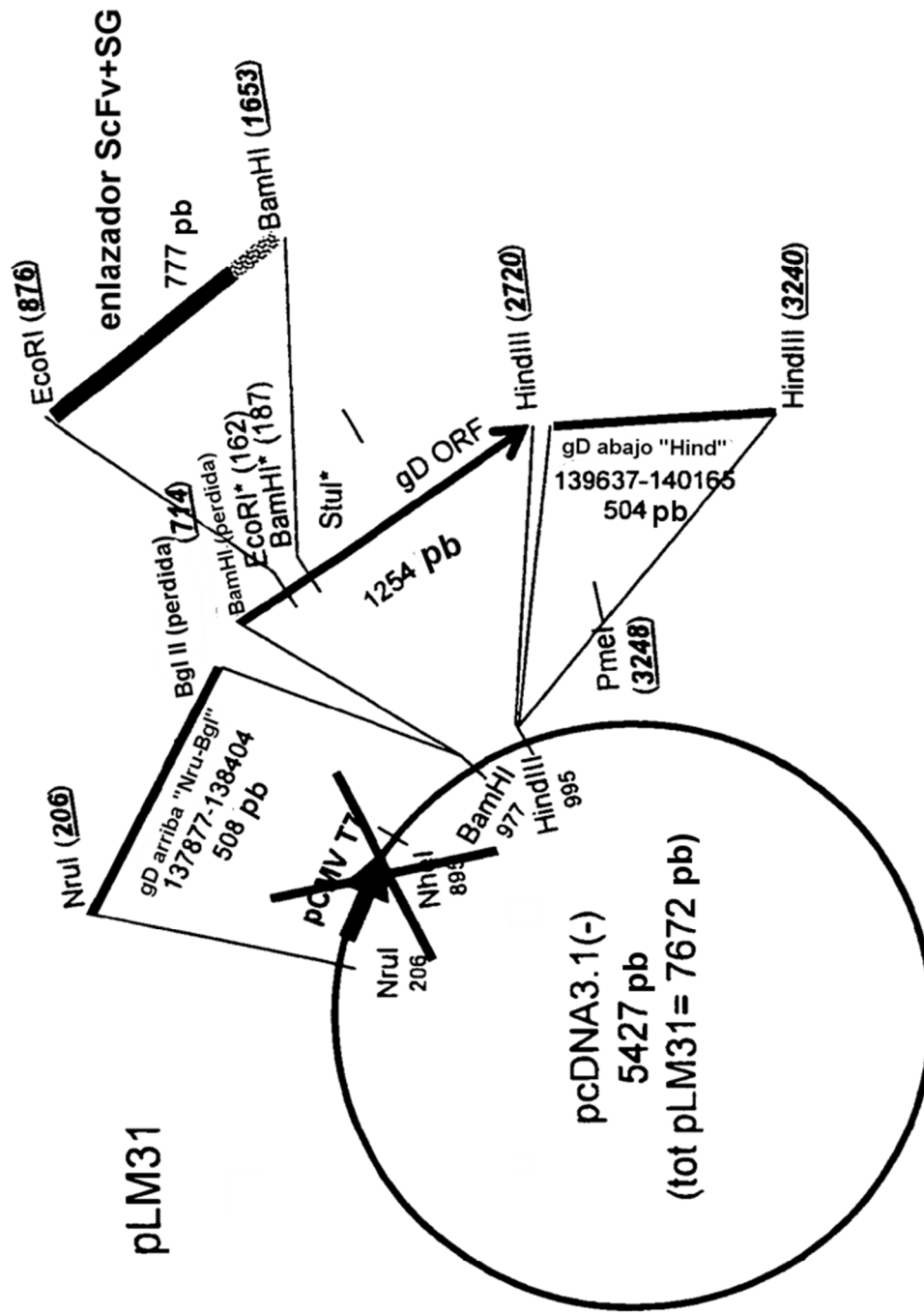


Fig. 9

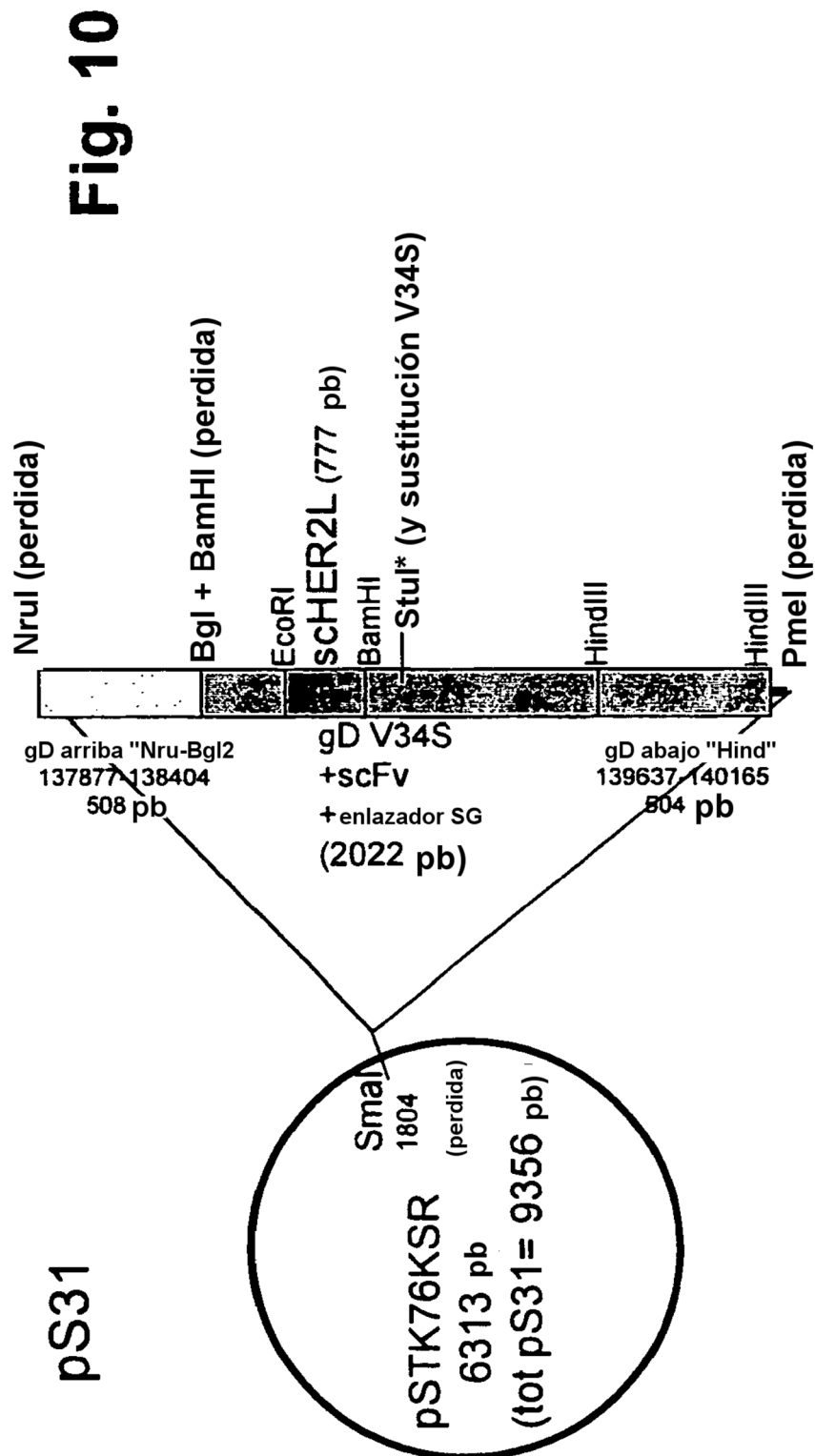
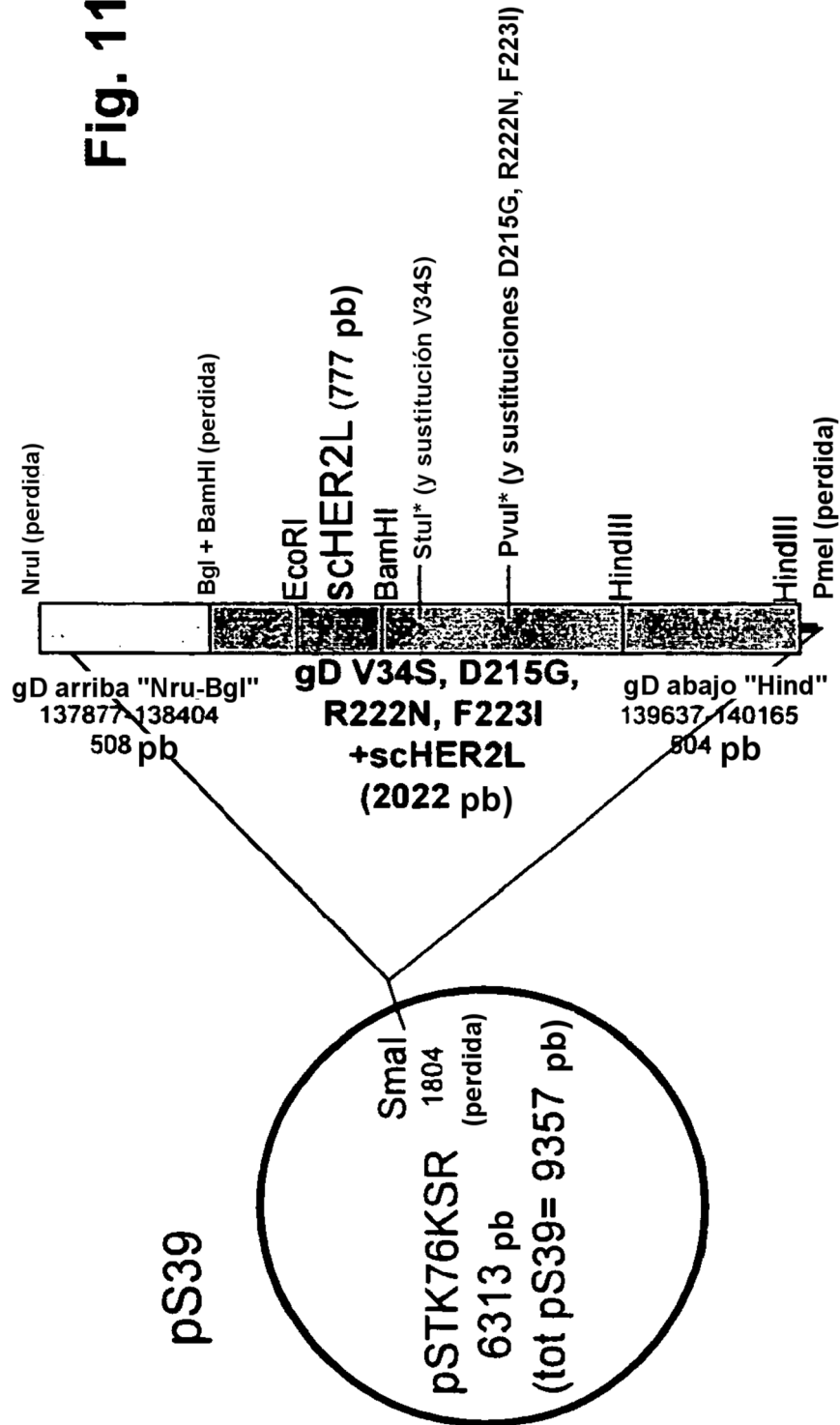
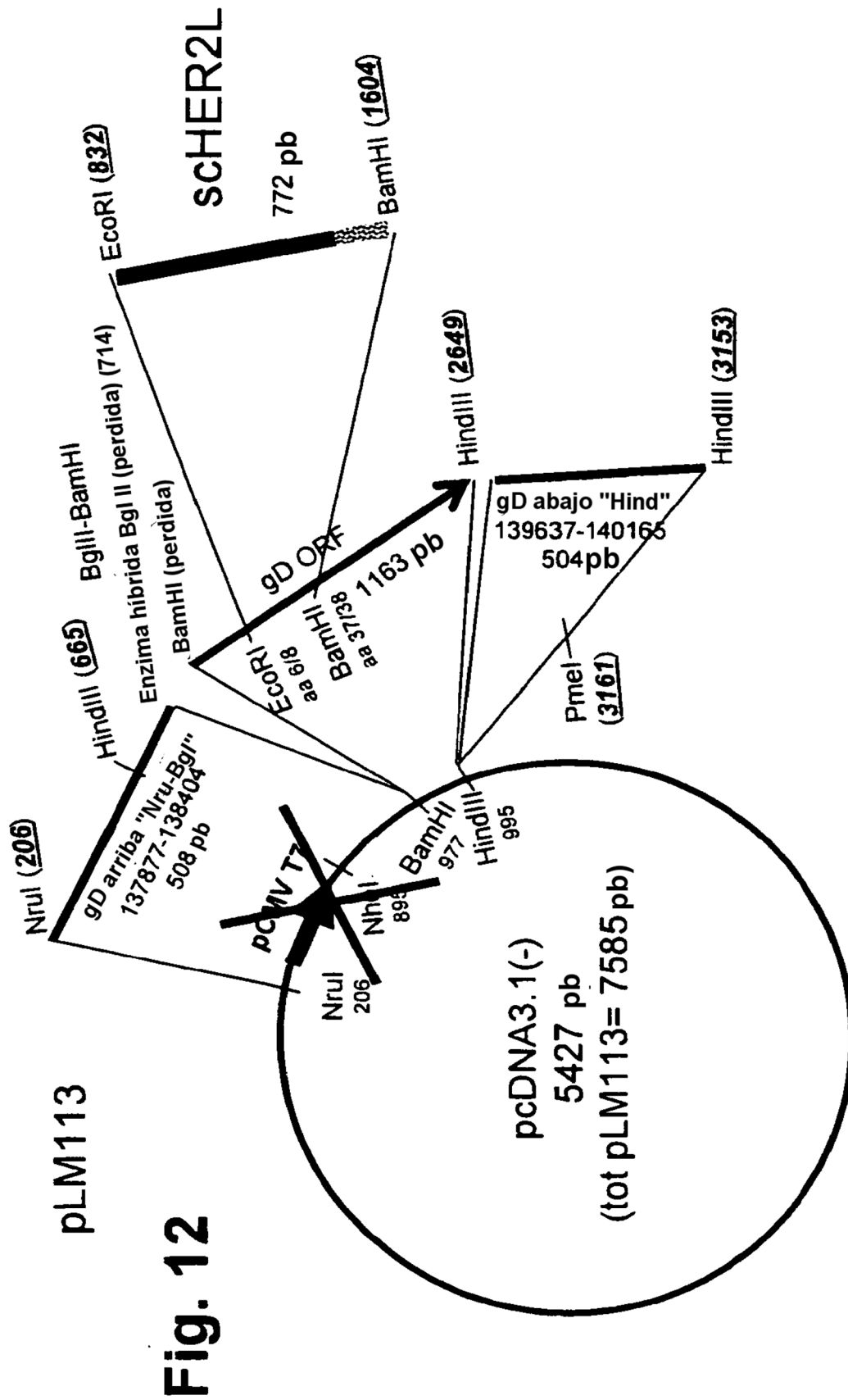


Fig. 11





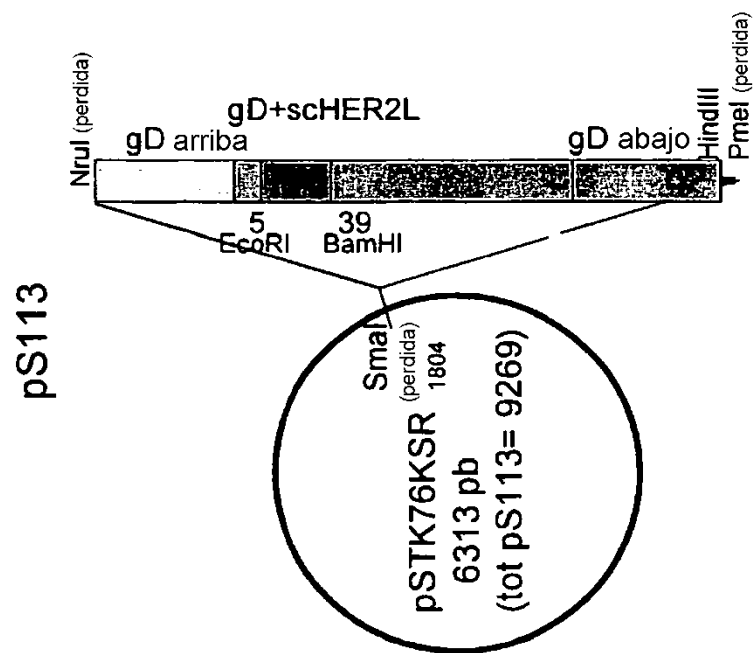
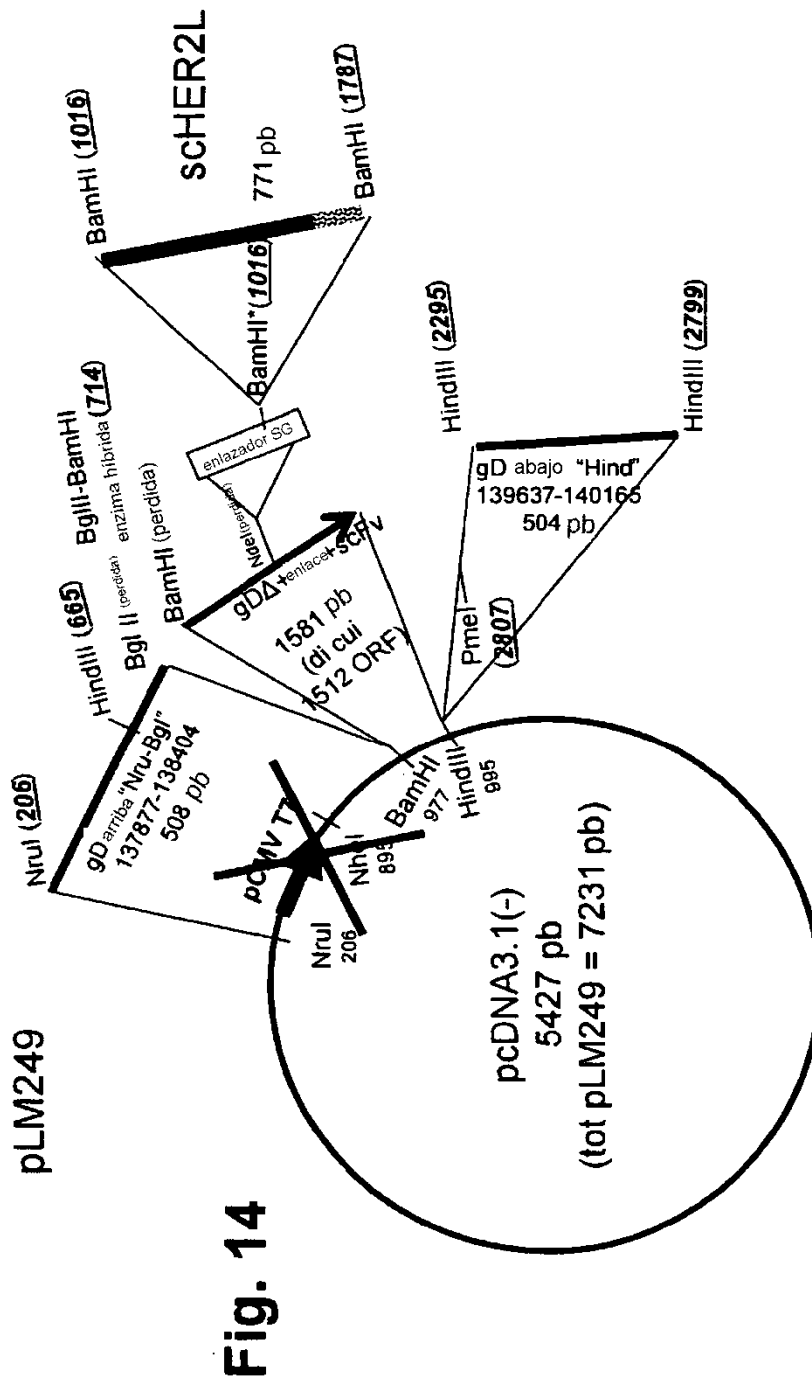


Fig. 13



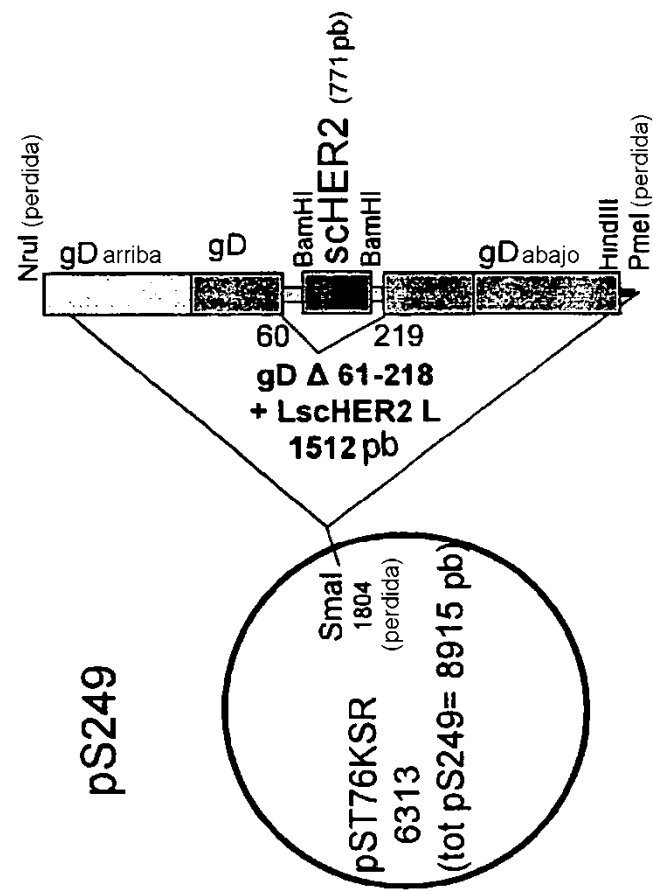


Fig. 15

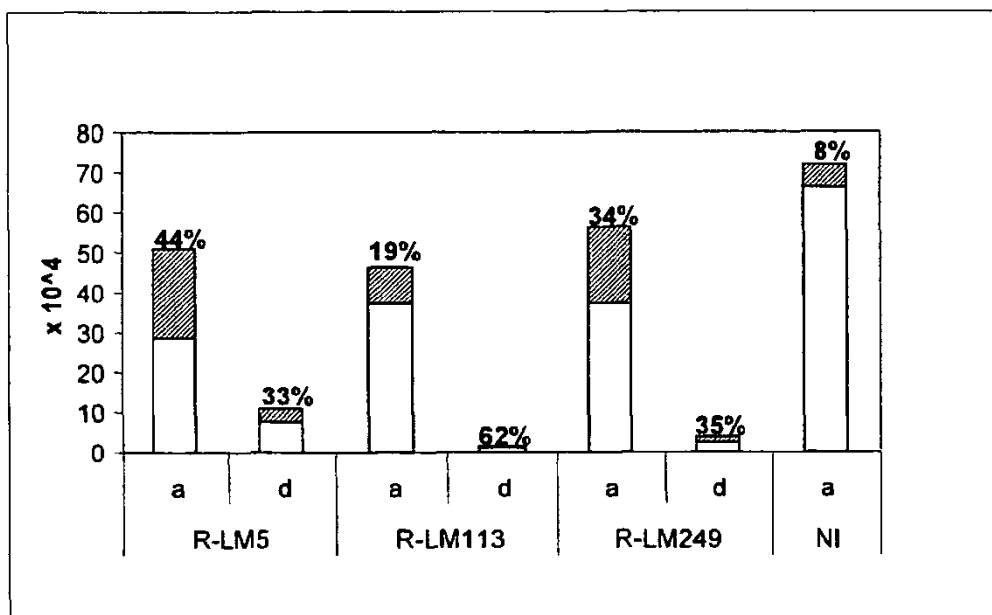


Fig. 16