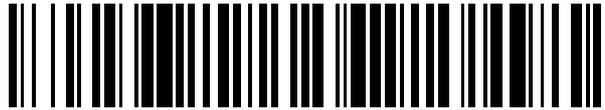


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 731 528**

51 Int. Cl.:

C12N 7/00 (2006.01)

A61K 35/76 (2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.11.2013 PCT/GB2013/053177**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **05.06.2014 WO14083362**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.11.2013 E 13801703 (3)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.04.2019 EP 2925865**

54 Título: **Adenovirus oncolíticos que tienen una proporción aumentada de la isoforma de escisión 156R de la proteína E1 B**

30 Prioridad:

30.11.2012 GB 201221590

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

15.11.2019

73 Titular/es:

**IXOGEN LTD (100.0%)
9 Mansfield Street
London, W1G 9NY, GB**

72 Inventor/es:

ÖBERG, HANS, DANIEL

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 731 528 T3

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

DESCRIPCIÓN

Adenovirus oncolíticos que tienen una proporción aumentada de la isoforma de escisión 156R de la proteína E1 B

5 **CAMPO TÉCNICO**

[0001] Esta invención se refiere a adenovirus oncolíticos y su uso en el tratamiento de la enfermedad neoplásica. Más particularmente, la invención se refiere a mutaciones del gen E1B que modulan los niveles de isoformas de empalme de este gen, mejorando así el índice terapéutico del adenovirus oncolítico.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCIONVirus oncolíticos

15 [0002] La viroterapia oncolítica es una plataforma de tratamiento emergente para la terapia del cáncer. Los virus oncolíticos son virus que se replican selectivamente en las células cancerosas que poseen fenotipos oncogénicos específicos, matando así las células cancerosas y evitando las células normales. La investigación inicial se centró en los virus no patógenos de origen natural, sin embargo, estos estudios tuvieron un éxito limitado. Aunque se observó que el crecimiento del tumor disminuía y el tejido normal no estaba dañado, no hubo alteración en el curso de la enfermedad.

20

[0003] Estudios recientes, por lo tanto, se han centrado en la modificación de virus recombinantes que se dirigen selectivamente a células cancerosas. Un ejemplo de esta clase de virus diseñados son los adenovirus que están mutados en la región E1B del genoma viral.

25

E1B y p53 adenovirales

[0004] Una función del tumor p53 supresor de la proteína de mamífero es mediar la detención del ciclo celular y/o apoptosis en respuesta al daño del ADN o síntesis de ADN extraño. En consecuencia, algunos virus, como el adenovirus, codifican proteínas que desactivan p53 en las células infectadas para permitir una replicación viral eficiente. Una de estas proteínas, la proteína de 55 kiloDalton de la región E1B del adenovirus (E1B-55K o E1B-496R), se une a p53, causando una pérdida sustancial de p53. En consecuencia, esto previene la apoptosis mediada por p53 de la célula infectada. E1B-496R es, por lo tanto, esencial para la replicación adenoviral en células que contienen p53 funcional.

30

35

[0005] Las células tumorales humanas son frecuentemente homocigotas o heterocigotas para alelos de p53 mutados (por ejemplo, sustitución, delección, cambio de marco mutado), y carecen de la función de p53 necesaria para el control normal del ciclo celular (Hollstein et al (1991) Science 253: 49; Levine y otros (1991) Nature; 351 (6326): 453-6). Muchas células neoplásicas son, por lo tanto, p53(-) porque carecen de niveles suficientes de p53 y/o porque expresan formas mutantes de p53 que son incapaces de una función sustancial de p53.

40

Adenovirus E1B mutados

[0006] Sieber T. (Dissertation, Universität Regensburg, mayo de 2008, páginas 1-158) describe estudios sobre el mecanismo de corte y empalme en el gen E1B al hacer mutantes de adenovirus.

45

[0007] Adenovirus oncolíticos han sido diseñados que se aprovechan de la diferencia en la funcionalidad de p53 entre las células neoplásicas y normales. Al mutar la proteína E1B-496R para eliminar las interacciones de unión con p53 o al hacer varias delecciones dentro del locus E1B (ver, por ejemplo, US5,677,178), los adenovirus resultantes pueden replicarse y finalmente lisar las células cancerosas que carecen sustancialmente de la función de p53, pero no en células que poseen una función p53 normal.

50

[0008] Un ejemplo es ONYX-015 (dl1520 originalmente llamado y también referido como H101), un adenovirus mutante que no expresa la proteína E1B-496R (Heise et al (1997) Nat Med 3 (6): 639-645). El virus contiene un codón de parada inmediatamente después del codón de inicio de la traducción y también tiene una gran eliminación de la secuencia de codificación E1B-496R. Como resultado, este virus carece de la capacidad de unirse e inactivar p53 y, por lo tanto, solo puede replicarse eficientemente en células defectuosas en la función de p53, como las células neoplásicas y los tumores. Desafortunadamente, E1B-496R lleva a cabo otras funciones además de unir e inactivar p53 (Eager et al. (2001) Cancer Gene Ther. 18 (5): 305-317). En consecuencia, el virus ONYX-015 es defectuoso en la acumulación citoplásmica de los ARNm tardíos virales, el apagado de la célula huésped y la traducción de los ARNm tardíos. Por lo tanto, la mutación en ONYX-015 compromete la capacidad del virus mutante para reproducirse en las células tumorales. Un problema adicional es que las grandes eliminaciones desestabilizan el genoma viral.

55

60

[0009] Ejemplos adicionales son ONYX-051 y ONYX-053, adenovirus mutantes que contienen mutaciones puntuales (R240A y H260A, respectivamente) en la proteína E1B-496R que impiden su unión a p53. Estas mutaciones permiten que el virus se replique selectivamente en las células que tienen una función p53 deficiente, sin comprometer la

65

capacidad del virus para replicarse en estas células (Shen et al. (2001) J. Virol. 75 (9): 4297-4307 y US 7.785.887).

[0010] Choi et al. (Advanced Drug Delivery Reviews (2012), 64: 720-729) revisa el desarrollo de los virus de la enfermedad para el tratamiento del cáncer.

[0011] Sin embargo, sigue habiendo una gran necesidad de mejorar los virus mutantes cuya capacidad oncolítica se ha mejorado y que son útiles en la terapia del cáncer.

RESUMEN DE LA INVENCION

[0012] La invención proporciona un adenovirus recombinante en el que la proporción de la isoforma E1B-156r aumenta en relación con el nivel en el adenovirus de tipo salvaje equivalente, en el que el adenovirus tiene un efecto oncolítico en una célula de cáncer, y en el que el adenovirus recombinante lleva una mutación en la secuencia del gen E1B del adenovirus y la mutación en el gen E1B es A3216G en donde la numeración es relativa al genoma Ad5 del adenovirus (número de acceso AC_000008,1) (SEQ ID NO: 41) (posición 1503 en el gen E1B (SEQ ID NO: 1) o una mutación puntual de guanina en una posición equivalente a 3216 en cualquier otro serotipo de adenovirus.

[0013] La invención también proporciona un polinucleótido que codifica el adenovirus recombinante de la invención, que es opcionalmente un vector adecuado para la producción de adenovirus en una célula huésped. La invención proporciona además una célula huésped aislada que comprende un polinucleótido que codifica el adenovirus recombinante de la invención.

[0014] La invención proporciona un adenovirus recombinante para uso en el tratamiento del cáncer, en el que el adenovirus recombinante se caracteriza porque la proporción de la isoforma E1B 156r aumenta en relación con el nivel en el adenovirus de tipo salvaje equivalentes, y en el que el adenovirus tiene un efecto oncolítico en una célula cancerosa.

[0015] La invención también proporciona una composición que comprende un adenovirus recombinante para su uso como un agente terapéutico, en el que el adenovirus recombinante se caracteriza porque la proporción de la isoforma E1B 156r aumenta en relación con el nivel en el adenovirus de tipo salvaje equivalente, y en el que el adenovirus tiene un efecto oncolítico en una célula de cáncer.

[0016] La invención proporciona además una composición que comprende un adenovirus recombinante para uso en el tratamiento de un paciente con cáncer, en el que el adenovirus recombinante se caracteriza porque la proporción de la isoforma E1B 156r aumenta en relación con el nivel en el adenovirus de tipo salvaje equivalente y en el que el adenovirus tiene un efecto oncolítico en una célula cancerosa.

[0017] La invención proporciona un método para hacer un adenovirus oncolítico mediante la modificación de la secuencia del gen E1B para aumentar el nivel de la isoforma de E1B-156r en relación con el nivel en el adenovirus de tipo salvaje equivalente, en el que el gen E1B está mutado a A3216G donde la numeración es relativa al genoma Ad5 del adenovirus (número de acceso AC_000008,1) (SEQ ID NO: 41) (posición 1503 en el gen E1B (SEQ ID NO: 1)) o una mutación puntual de guanina en una posición equivalente a 3216 en cualquier otro serotipo de adenovirus.

DECLARACION DETALLADA

[0018] Se ha encontrado ahora por el presente inventor de que modulando el nivel y tipo de isoformas de empalme del producto del gen E1B, expresado a partir del gen E1B, la actividad oncolítica de tales virus se puede mejorar. Por consiguiente, se describe un adenovirus recombinante en el que la proporción de la isoforma E1B-156R aumenta con respecto a los niveles de tipo salvaje, en donde el adenovirus tiene un efecto oncolítico en una célula cancerosa. El adenovirus recombinante puede llevar una mutación tal que la proporción de la isoforma E1B-156R se incrementa en relación con los niveles de tipo salvaje, de modo que el adenovirus tenga un efecto oncolítico en una célula cancerosa. La mutación puede estar en la secuencia del gen E1B del adenovirus. Un virus de acuerdo con la invención es, por lo tanto, inhibido de la replicación en células no neoplásicas, pero es capaz de expresar un fenotipo de replicación en células neoplásicas, incluidas las células neoplásicas que carecen sustancialmente de p53 funcional.

[0019] En los ejemplos específicos de los adenovirus descritos en el presente documento, se cree que la sobreexpresión de E1B-156r es un desequilibrio causado por un sitio de empalme 93R mutado en el gen E1B del adenovirus. La 156R es capaz de complementar algunas de las funciones de la 496R, pero no las esenciales para la oncoselectividad. A diferencia de los virus de la técnica anterior de tipo similar, los virus de acuerdo con la presente invención incluyen una región E3B funcional para una mejor eficacia *in vivo*. Por ejemplo, Onyx-015 carece de E3B. De hecho, el virus Onyx-015 y su selectividad son superados por los virus de acuerdo con la invención, en todos los aspectos. Además, la invención ha ensayado virus preparados según la invención en células normales y los resultados muestran que los virus tienen un perfil de seguridad excepcional, especialmente en comparación con el virus conocido Onyx-015.

[0020] Aquí, el término "virus de replicación inhibida" o "defectuoso en la replicación" se refiere a un virus que inhibe

preferentemente la proliferación celular o induce la apoptosis en una población celular predeterminada que se transforma en un estado canceroso o neoplásico. Dicho virus es sustancialmente incapaz de inhibir la proliferación celular, inducir la apoptosis o expresar un fenotipo de replicación en células que comprenden niveles de función de p53 normales que son característicos de células no replicadas, no transformadas. Dichas células transformadas pueden carecer sustancialmente de la función p53, que admite la expresión de un fenotipo de replicación de virus. Sin embargo, la selectividad de los virus de acuerdo con la invención para el tejido neoplásico podría ser más general que solo para el estado de p53; el estado transformado como tal podría ser la base para la selección. Por ejemplo, se ha sugerido que la selectividad oncolítica observada con el virus ONYX-015 puede deberse a la capacidad de algunas líneas celulares de cáncer para soportar la exportación tardía de ARN viral desde el núcleo, una función que se pierde en ONYX-015 en células normales debido a la eliminación E1B-496R. Un mecanismo similar puede operar en los adenovirus recombinantes de la presente invención, que tienen niveles reducidos de proteína E1B-496R. Aún no está claro exactamente cómo un aumento en los niveles de E1B-156R en los adenovirus recombinantes de la presente invención da como resultado la selectividad oncolítica.

[0021] Típicamente, un virus de replicación inhibido de acuerdo con la invención presenta una disminución sustancial en la eficiencia de formación de placas en células que comprenden la función de p53 normal (para un ensayo adecuado, ver Wang, Y., G. Hallden, et al. (2003). "Las manipulaciones del gen E3 afectan la actividad del adenovirus oncolítico en modelos de tumores inmunocompetentes". *Nature biotechnology* 21 (11): 1328-1335). Otro ejemplo de un ensayo adecuado que se puede usar es un ensayo de citotoxicidad para medir la pérdida de células viables, utilizando por ejemplo un tinte de tetrazolio como MTT, XTT, MTS o WST (ver Berridge et al., *Biotechnology Annual Review*, 11: 127-152 (2005)).

[0022] Tal como se utiliza aquí, el término "fenotipo de replicación" se refiere a una o más de las siguientes características fenotípicas de las células infectadas con un virus como un adenovirus inhibido por replicación: (1) la expresión sustancial de productos de los genes tardíos, tales como las proteínas de cápside (p. ej., polipéptido de base de penton adenovírico) o transcritos de ARN iniciados a partir de uno o más promotores de genes tardíos virales; (2) replicación de genomas virales o formación de intermediarios replicativos; (3) ensamblaje de cápsides virales o partículas de virión empaquetadas; (4) aparición de efecto citopático (CPE) en la célula infectada; (5) finalización de un ciclo lítico viral; y (6) otras alteraciones fenotípicas que suelen depender de la supresión de la función de p53 en células no neoplásicas infectadas con un virus de ADN competente para la replicación que codifica oncoproteínas funcionales. Un fenotipo de replicación según la presente invención comprende al menos una de las características fenotípicas enumeradas anteriormente, preferiblemente más de una de las características fenotípicas, tales como 2, 3, 4, 5, 6 o más características.

[0023] Las técnicas para la medición de estos fenotipos serán conocidas por los expertos en la técnica. Por ejemplo, los métodos para evaluar la apariencia de CPE se describen en los ejemplos de este documento y se evalúan utilizando una dosis infectiva de cultivo tisular al 50% (TCID₅₀) y el número de unidades formadoras de placa (pfu)/célula (recuento de células en el día de la infección).

[0024] El término "células neoplásicas" se refiere a células que exhiben un crecimiento relativamente autónomo, de forma que exhiben un fenotipo de crecimiento aberrante caracterizado por una pérdida significativa de control de la proliferación celular. Las células neoplásicas comprenden células que pueden replicarse activamente o en un estado de reposo no replicativo temporal (G1 o G0); de manera similar, las células neoplásicas pueden comprender células que tienen un fenotipo bien diferenciado, un fenotipo pobremente diferenciado o una mezcla de ambos tipos de células. Por lo tanto, no todas las células neoplásicas están replicando necesariamente células en un punto de tiempo dado. El conjunto de células definido aquí como células neoplásicas consiste en células en neoplasias benignas y células en neoplasias malignas (o francas). Las células francamente neoplásicas se denominan con frecuencia cancerosas, típicamente carcinoma si se originan a partir de células de origen histológico endodérmico o ectodérmico, o sarcoma si se originan a partir de tipos de células derivados del mesodermo. Los términos célula neoplásica y célula cancerosa se usan indistintamente en este documento.

[0025] En este documento, el término "función de p53" se refiere a la propiedad de tener un nivel esencialmente normal de un polipéptido codificado por el gen p53 (es decir, respecto a las células no neoplásicas del mismo tipo histológico), en donde el polipéptido p53 es capaz de la unión al polipéptido E1B-496R de adenovirus de tipo salvaje. Por ejemplo, la función de p53 puede perderse por la producción de una forma inactiva (es decir, mutante) de p53 o por disminución sustancial o pérdida total de la expresión del polipéptido p53. La función de p53 también puede estar sustancialmente ausente en las células neoplásicas que comprenden alelos p53 que codifican un polipéptido de tipo salvaje; por ejemplo, una alteración genética fuera del locus p53, como las mutaciones que resultan en un procesamiento subcelular aberrante o la localización de p53 (por ejemplo, una mutación que resulta en la localización de p53 predominantemente en el citoplasma en lugar del núcleo) puede resultar en la pérdida de la función de p53. Muchas células neoplásicas son, por lo tanto, p53(-) porque carecen de niveles suficientes de p53 y/o porque expresan formas mutantes de p53 que son incapaces de una función sustancial de p53. En el contexto de la presente invención, la función clave de p53 es la capacidad de mediar la detención del ciclo celular y/o mediar la apoptosis en respuesta al daño del ADN o la síntesis de ADN extraño. Las células neoplásicas carecen de p53 funcional, si dicha reducción en la función de p53 impide el control normal del ciclo celular y la apoptosis. Esto puede consistir en una disminución de p53 localizada y expresada correctamente procesada, localizada y expresada que se puede unir a E1B-496R en 2

veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces, 50 veces, 50 veces o más, en comparación con las células no neoplásicas correspondientes del mismo tipo. Por lo tanto, estas células se denominan "p53(-)".

[0026] Se cree que las especies de adenovirus deficientes en la replicación que carecen de la capacidad de p53 complejo pero sustancialmente retienen otras funciones replicativas virales esenciales que exhibirán un fenotipo de replicación en células que son deficientes en la función de p53 (por ejemplo, células que son homocigotas para alelos p53 sustancialmente eliminados, o células que comprenden proteínas p53 mutantes que son esencialmente no funcionales, pero no exhibirán sustancialmente un fenotipo replicativo en células no neoplásicas no replicantes. Dichas especies de adenovirus inhibidos de la replicación se mencionan aquí por conveniencia como adenovirus deficientes en la replicación E1B-p53(-).

[0027] Un "virus oncolítico" es un virus que infecta preferentemente y lisa las células cancerosas. El efecto oncolítico se ve cuando la comparación de la eficacia en las células de cáncer frente a células normales. Un virus se considera oncolítico si la proporción de células cancerosas lisadas y células no cancerosas es 2:1, 4:1, 10:1, 20:1, 50:1, 100:1 o más. Preferiblemente, un virus se identifica como oncolítico mediante la evaluación del índice oncolítico (ver más abajo). En este documento, el efecto oncolítico comprende a) infección viral de células; b) la replicación selectiva del genoma viral en células cancerosas (deficientes en la función de p53) que conduce a una lisis celular preferencial mediada por virus en células cancerosas (que puede ser deficiente en p53) y la liberación de partículas virales para futuros eventos de infección. El efecto oncolítico se puede medir utilizando varios ensayos. En estos ensayos se debe usar un virus de control, a menudo la versión de tipo silvestre/natural. Como tal, se puede usar cualquiera de los siguientes ejemplos de ensayos: MTS (citotoxicidad), TCID₅₀ (capacidad de replicación), ensayos de LDH (lactato deshidrogenasa (LDH) es una enzima estable, presente en todos los tipos de células, y se libera rápidamente en el medio de cultivo celular tras el daño de la membrana plasmática), FACS (clasificación celular), transferencia western y QPCR (expresión génica tardía o número de copia del genoma). Otros ejemplos serán claros para los expertos en la técnica.

[0028] Una ventaja de un virus de acuerdo con la presente invención es que un virus de este tipo tiene aberraciones genéticas mínimas. Las mutaciones puntuales (incluidas las inserciones, las eliminaciones, las adiciones y las sustituciones) son mejores para la salud del virus. Los cambios más grandes ponen una tensión evolutiva en el virus. Además, el tamaño genómico y la integridad pueden ser importantes.

[0029] Un virus de acuerdo con la presente invención tiene un índice de selección cáncer o el índice de oncolítico (los dos términos son intercambiables) que se ha mejorado mucho en comparación con los virus oncolíticos existentes que están disponibles, tales como el virus H101. Esto se refiere a la capacidad de replicación en células normales en comparación con las células cancerosas, que puede expresarse de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$(OVc/OVn)/(WTc/WTn) = \text{Índice de selección de cáncer}$$

en donde OV = capacidad de replicación del virus oncolítico; WT es la capacidad de replicación del virus de control; c es células cancerosas; n es células normales.

[0030] Un virus de acuerdo con la invención puede tener un índice de selección de cáncer de entre 2 y 10.000, dependiendo del tipo de célula, preferiblemente entre 5 y 5000, 10 y 1000, o 50 y 500. En el caso de un ejemplo representativo de un virus de acuerdo con la invención, Ixovex, este virus exhibe un índice de selección de cáncer frente al control de 3,5 en células HeLa; 14 en células A549; 2000 en células H1299 y 450 en células H460. En los mismos tipos de células, los valores para el virus Onyx-015 frente a Ixo-ctrl son HeLa = 0,1x; A549 = 0,1x; H1299 = 0,05x; y H460 = 0,004x. Como tal, es posible aplicar un virus de acuerdo con la invención a la mayoría de los tipos de tumores. Una teoría es que los virus oncolíticos de la invención son selectivos para el estado negativo de p53 y las células que se replican rápidamente.

[0031] Además, un virus de acuerdo con la invención será objeto de defensa inmune del huésped y en última instancia será limpiado, esto antes de la erradicación completa del tumor. Esto no solo se presenta como una forma de eliminar el virus, lo que anula cualquier posible toxicidad para el hígado como resultado de una sobrecarga viral, sino que también brinda la posibilidad de inducir una respuesta inmune contra el cáncer en el huésped, ya que se alertará al sistema inmunitario de la presencia viral en el tumor.

Adenovirus

[0032] Un virus de acuerdo con la invención es un adenovirus recombinante. Al momento de escribir este artículo, hay más de 65 serotipos descritos en humanos (HAdV-1 a 65) distribuidos en siete especies (adenovirus humano A a G) y tantos de otros mamíferos y aves (ver Strauss, "Infecciones por adenovirus en humanos", en The Adenoviruses (1984) ed. Ginsberg, pp. 451-596 Plenum Press, Nueva York. Para una descripción general de la biología del adenovirus, ver Virology, Segunda edición, eds. Fields y Knipe. Vol.2, pp1651-1740, Raven Press, Nueva York). El término "adenovirus" como se usa en el presente documento, abarca cualquiera de estas especies de adenovirus. Preferiblemente, un adenovirus según la invención es un adenovirus humano del grupo C de subfamilia, a saber, uno de los serotipos 1, 2, 5, 6 o 57. Más preferiblemente, el término adenovirus se aplica a dos serotipos humanos, Ad2 y

Ad5.

[0033] En una realización preferida de la invención, el adenovirus es un adenovirus de serotipo Ad5. El adenovirus puede ser adenovirus serotipo Ad5 cepa pTG3602. La cepa pTG3602 tiene aproximadamente 15 mutaciones puntuales dispersas a lo largo del genoma de adenovirus de 35.000 nucleótidos, sin embargo, ninguna de estas mutaciones está dentro del gen E1B. En este documento, el adenovirus tipo 5 proporciona un punto de referencia común para la convención de numeración de nucleótidos de los polinucleótidos virales y la numeración de aminoácidos de los polipéptidos codificados por virus en la región del gen viral E1B. Los expertos en la materia identificarán fácilmente las posiciones correspondientes en otros serotipos adenovirales. En este documento, el término "recombinante" indica que una construcción polinucleotídica (por ejemplo, un genoma de adenovirus) se ha generado, en parte, por modificación intencional por parte del hombre.

Gen E1B

[0034] El virus de acuerdo con la invención lleva una mutación en la secuencia del gen E1B. Todos los serotipos codifican un gen al que se hace referencia a través de los serotipos como región temprana 1B (E1B), que codifica los productos génicos de la fase temprana de la replicación del ADN. En este documento, el "gen E1B" se refiere a la unidad de transcripción de longitud completa del gen E1B en cualquier adenovirus, preferiblemente adenovirus humano. Un ejemplo representativo de un gen E1B es el del adenovirus tipo 5 (Ad5) que tiene la secuencia de polinucleótidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 1. El lector experto conocerá otros ejemplos y los detalles se pueden encontrar en las bases de datos de uso común, como, por ejemplo, Entrez Gene (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>). En el adenovirus humano tipo 5, la región de codificación E1B comienza en el número de nucleótido genómico 1714 y termina en el sitio poliA E1B en el número de nucleótido genómico 4043. Hay regiones similares en todos los adenovirus ensayados hasta ahora, por ejemplo, incluyendo especies tan diversas como la oveja, serpiente e incluso adenovirus murciélago.

[0035] La unidad de transcripción E1B del adenovirus humano codifica al menos cinco isoformas de empalme diferentes (véase la Figura 2) (Takayesu et al (1994) J. Gen. Virol. 75: 789-798). Nuevamente, dando el ejemplo de Ad5, el principal ARNm precursor de E1B de 2.28 kb codifica dos marcos de lectura superpuestos, uno para la proteína E1B-19K de 176 residuos (E1B-176R) y el otro para la proteína E1B-55K (496 residuos; E1B-496R). Las isoformas E1B-156R, E1B-93R, E1B-84R (nombradas por el número de aminoácidos en el producto expresado) se generan mediante un empalme alternativo del ARNm precursor para E1B-496R, entre un donante de empalme común (SD1) y uno de los tres sitios aceptores de empalme (SA1-3). Los ARNm resultantes codifican los 79 aminoácidos del término N de E1B-496R, y mientras que E1B-93R y E1B-84R tienen términos C únicos, E1B-156R se completa con los 77 residuos C-terminales de E1B-496R. El empalme alternativo se explica en Kelemen, O., P. Convertini, et al. (2012). "Función de empalme alternativo". Gene. Será evidente para la persona experta que las isoformas E1B en otros serotipos de adenovirus pueden tener longitudes ligeramente diferentes a las analizadas anteriormente para Ad5 (por ejemplo, el equivalente de E1B-156R en Ad2 tiene una longitud de 155 aminoácidos y, por lo tanto, a menudo se denomina 155R). Aquí, los nombres de las isoformas E1B-156R, E1B-93R, E1B-84R, E1B-176R y E1B-496R se refieren a la isoforma equivalente del mismo tamaño aproximado en todos los adenovirus, independientemente del número real de aminoácidos en la isoforma equivalente.

[0036] Se ha confirmado que existe la isoforma E1B-156r en una amplia sección transversal de variantes de adenovirus, mediante el uso de PCR para amplificar los ADNc específicos para E1B-156r utilizando cebadores de inicio y parada específicos para cada gen E1B-55K respectivo (Fig. 14). Nuestros experimentos muestran patrones de empalme similares en virus representativos de cada uno de los diferentes géneros (A-Ad12, B1-Ad3, B2-Ad11, C-Ad5, D-Ad37, E-Ad4 y F-Ad40). De hecho, Ad1wt y Ad57wt tienen secuencias de proteínas E1B-156R idénticas; Ad2wt y Ad6wt también tienen secuencias idénticas; y Ad5wt difiere solo un poco de todos ellos. Esto hace que solo tres secuencias de proteínas E1B-156R diferentes en toda la subfamilia C difieran en un total de cinco posiciones de aminoácidos individuales y en la longitud de un estiramiento interno de polialanina. Por lo tanto, se espera que los resultados demostrados en este documento en los serotipos Ad2 y Ad5 se reflejen en otras variantes de adenovirus.

[0037] Una serie de experimentos de complementación se han realizado para demostrar que un aumento de E1B-156r es responsable (por lo menos en parte) para el aumento del índice oncolítico (OI) que se ha observado, de manera que la sobreexpresión de la Ad5-156R da un aumento potente en la OI de los adenovirus en general. En las Figuras 11A, B y C y en la Figura 12 en este documento, se muestra que el adenovirus tipo 5 E1B-156R es un potente potenciador de la OI en el grupo C de la subfamilia. Además, el equivalente E1B-156R de Ad2wt mostró un positivo efecto en la OI de Ad5wt, lo que significa que el efecto parece no estar limitado a un serotipo de adenovirus en particular.

[0038] En este documento, la isoforma E1B-156r de Ad5 humano tiene la secuencia de polinucleótidos de acuerdo con SEQ ID NO: 2 y la secuencia de polipéptido de acuerdo con SEQ ID NO: 3. En este documento, la isoforma 496R tiene la secuencia de polinucleótidos de acuerdo con SEQ ID NO: 4 y una secuencia de polipéptidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 5. En este documento, la isoforma E1B-93R tiene la secuencia de polinucleótidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 6 y la secuencia de polipéptidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 7. En este documento, la isoforma E1B-84R tiene la secuencia de polinucleótidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 8 y la secuencia de polipéptidos de acuerdo

con la SEQ ID NO: 9. El lector experto apreciará que existe un grado de variación en la secuencia en las variantes virales naturales; por consiguiente, la invención abarca secuencias de isoformas que difieren de las secuencias específicas expuestas en las secuencias de referencia referidas aproximadamente, pero son 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% o más homólogas o idénticas a esas secuencias, según lo calculado por los programas comunes de alineación de secuencias, por ejemplo, BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), que puede ser el nucleótido BLAST (blastn) o la proteína BLAST (blastp). Se dice que dos secuencias son "homólogas", como se usa el término en este documento, si una de las secuencias tiene un grado suficientemente alto de identidad o similitud con la otra secuencia. "Identidad" indica que en cualquier posición particular en las secuencias alineadas, el nucleótido es idéntico entre las secuencias. La "similitud" indica que, en cualquier posición particular en las secuencias de polipéptidos alineadas, el residuo de aminoácido es de un tipo similar entre las secuencias. Los grados de identidad y similitud se pueden calcular fácilmente (Biología Molecular Computacional, Lesk, AM, editor, Oxford University Press, Nueva York, 1988; Biocomputación. Informática y proyectos del genoma, Smith, DW, editor, Academic Press, Nueva York, 1993; Análisis por computadora de los datos de secuencia, Parte 1, Griffin, AM y Griffin, HG, eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Análisis de secuencia en biología molecular, von Heinje, G., Academic Press, 1987; y Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. y Devereux, J., eds., M Stockton Press, Nueva York, 1991).

[0039] Por consiguiente, las realizaciones de la invención incluyen adenovirus recombinantes variantes en los que la isoforma E1B-156R tiene una secuencia polinucleotídica que tiene al menos un 80% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 2 y una secuencia polipeptídica que tiene al menos un 80% de identidad de secuencia para SEQ ID NO: 3; donde la isoforma E1B-496R tiene una secuencia de polinucleótidos que tiene al menos un 80% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 4 y una secuencia de polipéptidos que tiene al menos un 80% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 5; donde la isoforma E1B-93R tiene una secuencia polinucleotídica que tiene al menos un 80% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 6 y una secuencia polipeptídica que tiene al menos un 80% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 7; y donde la isoforma E1B-84R tiene una secuencia polinucleotídica que tiene al menos un 80% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 8 y una secuencia polipeptídica que tiene al menos un 80% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 9. Ejemplos representativos de las secuencias de isoformas E1B 156R variantes se dan aquí (Fig. 13). Las secuencias equivalentes incluidas para Ad5 E1B-156R son aquellas con 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% o más identidad con las secuencias proporcionadas en la FIG. 13 (como se describe anteriormente para Ad5).

Modulación de los niveles de isoformas por modificación.

[0040] Según la descripción, el nivel y/o el tipo de isoformas de empalme del producto del gen E1B, expresada a partir del gen E1B, se modifica, y como resultado los virus se vuelven oncolíticos. Los niveles y/o tipos de isoformas E1B pueden modularse por cualquier medio, por ejemplo, utilizando ribozimas diseñadas para escindir específicamente los ARNm de isoforma E1B en posiciones seleccionadas y, por lo tanto, evitar la traducción de los ARNm en polipéptidos funcionales. Los métodos alternativos serán evidentes para los expertos en la técnica, e incluyen la inserción de múltiples copias de la secuencia del gen E1B, o formas que codifican E1B-156R; activación de la regulación de la expresión del gen E1B, o formas que codifican E1B-156R, por ejemplo, mediante la modulación de secuencias promotoras o potenciadoras; inserción de secuencias reguladoras, etc.

[0041] En el presente documento se describen ejemplos de adenovirus variantes que incluyen una o más mutaciones en las regiones de empalme del gen E1B que logran este efecto. Como se sabe que el reconocimiento del sitio de empalme por el spliceosoma se ve afectado por la estructura secundaria del ARNm, las mutaciones en el gen E1B que afectan la estructura secundaria de su ARNm también pueden modular los niveles y tipos de isoformas E1B. Por ejemplo, la mutación puede eliminar un sitio de empalme cambiando la secuencia de polinucleótidos y polipéptidos del gen E1B; o puede eliminar un sitio de empalme cambiando la secuencia polinucleotídica del gen E1B y conservando la secuencia polipeptídica original.

[0042] Este efecto se puede lograr cuando el gen E1B está mutado en una o más de las regiones de reconocimiento de corte y empalme que comprende: a) el sitio donante de corte y empalme 1 (SD1); el aceptador de empalme E1B-93R (SA1); c) aceptador de empalme E1B-156R (SA2); d) aceptador de empalme E1B-84R (SA3); y/o e) empalme el sitio donante 2 (SD2).

[0043] En el caso del ejemplo de Ad5, estos sitios de empalme se encuentran en las siguientes posiciones y tienen las siguientes secuencias: SD1 tiene la secuencia de GTGGC en la posición 2251 a 2255 del genoma Ad5 (posición 2256 a 2260 del número de acceso del genoma Ad5 AC_000008,1 (SEQ ID NO: 41) y posición 543-547 en el gen E1B (SEQ ID NO: 1)). El aceptador de empalme E1B-93R (SA1) tiene la secuencia AACAG en la posición 3218-3222 del genoma Ad5 (posición 3213-3217 del número de acceso del genoma Ad5 AC_000008,1 (SEQ ID NO: 41) y la posición 1500-1504 en el Gen E1B (SEQ ID NO: 1)). El aceptador de empalme E1B-156R (SA2) tiene la secuencia TTGAG en la posición 3276-3280 del genoma Ad5 (posición 3271-3275 del número de acceso del genoma Ad5 AC_000008,1 (SEQ ID NO: 41) y la posición 1558-1562 en el gen E1B (SEQ ID NO: 1)). El aceptador de empalme E1B-84R (SA3) tiene la secuencia TGCAG en la posición 3595-3599 del genoma Ad5 (posición 3590-3594 del número de acceso del genoma Ad5 AC_000008,1 (SEQ ID NO: 41) y la posición 1877-1881 en el Gen E1B (SEQ ID NO: 1)). El sitio donante de empalme 2 (SD2) tiene la secuencia GTACT en la posición 3506-3510 del genoma Ad5 (posición 3511-3515 del número de acceso del genoma Ad5 AC_000008,1 (SEQ ID NO: 41) y posición 1798-1802 en la E1B gen (SEQ ID NO:

1)). Los sitios equivalentes en posiciones equivalentes en otros serotipos humanos serán fácilmente evidentes para los expertos en la técnica, imbuidos de las enseñanzas de este documento.

[0044] Por consiguiente, un aspecto de la presente divulgación es un adenovirus recombinante en el que las regiones de reconocimiento de empalme del gen E1B se mutan en una o más de las siguientes posiciones en el genoma de Ad5: a) nucleótido 3216 del genoma de adenovirus Ad5 (número de acceso AC_000008.1) (SEQ ID NO: 41) (posición 1503 en el gen E1B (SEQ ID NO: 1); b) nucleótido 3218 del genoma Ad5 del adenovirus (número de acceso AC_000008,1) (SEQ ID NO: 41) (posición 1505 en el gen E1B (SEQ ID NO: 1) y/o c) nucleótido 3221 del genoma Ad5 del adenovirus (número de acceso AC_000008,1) (SEQ ID NO: 41) (posición 1508 en el gen E1B (SEQ ID NO: 1) En algunos aspectos de la divulgación, el gen E1B puede contener una o más de las siguientes mutaciones: a) A3216G en el genoma Ad5 del adenovirus (posición 1503 en el gen E1B (SEQ ID NO: 1)); b) G3218A en el genoma Ad5 de adenovirus (posición 1505 en el gen E1B (SEQ ID NO: 1)); y/o c) G3221A en el genoma Ad5 de adenovirus (posición 1508 en el gen E1B (SEQ ID NO: 1)). En este documento, las posiciones de todas las mutaciones puntuales se numeran de acuerdo con el número de acceso del genoma de Ad5 AC_000008,1 (SEQ ID NO: 41).

[0045] La siguiente tabla identifica las secuencias y posiciones de las regiones de reconocimiento de corte y empalme del gen de E1B en el genoma de Ad5. La "posición del genoma del Ad5" y la "posición del gen E1B" corresponden a los cinco residuos inmediatamente aguas arriba de los sitios donantes de empalme (SD1 y SD2), e inmediatamente

Sitios de empalme E1B	Posición del genoma Ad5	Posición del gen E1B	Secuencia	ID SEQ NO:
Donante de empalme 1 (SD1)	2251-2255	538-542	cag/ <u>GTGGC</u> TGAAC	ID SEQ NO: 10
Aceptor de empalme E1B-93R (SA1)	3218-3222	1505-1509	TCCTTGCATTTGGGT <u>AACAG</u> /gag	ID SEQ NO: 11
Aceptor de empalme E1B-156R (SA2)	3276-3280	1563-1567	ACACTAAGATATTGCT <u>TTGAG</u> /ccc	ID SEQ NO: 12
Aceptor de empalme E1B-84R (SA3)	3595-3599	1882-1886	GTCTTATGTAGTTTTTGTATCTGTTTT <u>TGC</u> <u>AG</u> /cag	ID SEQ NO: 13
Donante de empalme 2 (SD2)	3506-3510	1793-1797	gag/ <u>GTACT</u> GAAAT	SEQ ID NO. 14

aguas abajo de los sitios aceptores de empalmes (SA1, SA2 y SA3).

[0046] La "barra diagonal" indica el sitio de empalme real.

[0047] La mutación de la secuencia viral dentro de las regiones de reconocimiento de empalme del gen E1B puede involucrar a) eliminar un sitio de empalme cambiando la secuencia polinucleotídica y polipeptídica del gen E1B; o b) eliminar un sitio de empalme cambiando la secuencia de polinucleótidos del gen E1B y conservando la secuencia polipeptídica original. Como apreciarán los expertos, existe una redundancia en el código genético, es decir, algunos aminoácidos están codificados por múltiples codones. Las secuencias de sitios de empalme pueden eliminarse del ARNm de E1B transcrito mutando el ADN adenoviral correspondiente para usar uno o más codones alternativos para los aminoácidos que codifica la secuencia de polinucleótidos en estos sitios. Por lo tanto, la proteína traducida resultante preferiblemente no contendrá ningún cambio de aminoácidos. La siguiente tabla de codones muestra la redundancia en el código genético.

Aminoácidos			Codones	
5	Alanina	Ala	A	GCA GCC GCG GCU
	Arginina	Arg	R	AGA AGG CGA CGC CGG CGU
	Ácido aspártico	Áspid	D	GAC GAU
	Asparagina	Asn	N	AAC AAU
10	Cisteína	Cys	C	UGC UGU
	Ácido glutámico	Glu	E	GAA GAG
	Glutamina	Gln	Q	CAA CAG
	Glicina	Gly	G	GGA GGC GGG GGU
15	Histidina	Su	H	CAC CAU
	Isoleucina	Ile	I	AUA AUC AUU
	Leucina	Leu	L	CUA CUC CUG CUU UUA UUG
	Lisina	Lys	K	AAA AAG
20	Metionina	Reunió	M	AGO
	Fenilalanina	Phe	F	UUC UUU
	Prolina	Pro	P	CCA CCC CCG CCU
	Serina	Ser	S	AGC AGU UCA UCC UCG UCU
25	Treonina	Thr	T	ACA ACC ACG ACU
	Triptófano	Trp	W	UGG
	Tirosina	Tyr	Y	UAC UAU
30	Valina	Val	V	GUA GUC GUG GUU
	Detener			TAA TGA TAG

35 **[0048]** El aumento de los niveles de la isoforma E1B-156r se consiguen como resultado de un sitio de empalme 93R mutado en el gen E1B.

40 **[0049]** En una realización preferida de la descripción, las regiones de reconocimiento de empalme de genes E1B están mutados en una o más de las siguientes posiciones: a) nucleótido 3216 (por ejemplo, cagGAGG -> cggGAGG) del genoma Ad5 del adenovirus (número de acceso AC_000008,1) (SEQ ID NO: 41); b) el nucleótido 3218 del genoma Ad5 de adenovirus (número de acceso AC_000008,1) (SEQ ID NO: 41); y/o c) el nucleótido 3221 del genoma Ad5 del adenovirus (número de acceso AC_000008,1) (SEQ ID NO: 41). Las mutaciones equivalentes en otros serotipos de adenovirus serán claras para el lector experto.

45 **[0050]** En una realización más preferida de la descripción, el gen E1B contiene una o más de las siguientes mutaciones: a) A3216G (cagGAGG -> cggGAGG); b) G3218A; y/o c) G3221A, correspondiente a las posiciones 1503, 1505 y 1508 en el gen E1B (SEQ ID NO: 1) respectivamente. Las mutaciones equivalentes en otros serotipos de adenovirus serán claras para el lector experto.

50 Niveles de isoformas

55 **[0051]** Cualquier mutación como la descrita se introduce en la secuencia de un genoma de adenovirus debería tener el efecto que la proporción de al menos una de las isoformas de empalme E1B, E1B-156R, E1B-496R, E1B-93R y E1B-84R, (y potencialmente dos, tres o las cuatro isoformas) varía con respecto a los niveles que están presentes en el tipo salvaje en condiciones similares. Preferiblemente, la proporción de la isoforma E1B-496R se reduce en relación con los niveles de tipo salvaje, o incluso se apaga totalmente. Alternativamente, la proporción de la isoforma E1B-156R aumenta con respecto a la isoforma E1B-496R, la proporción de la isoforma E1B-156R aumenta con respecto a la isoforma E1B-93R y/o la proporción de la isoforma E1B-156R aumenta en relación a la isoforma E1B-84R. Estos cambios en los niveles de isoformas particulares tienen el efecto de mejorar la oncolisis, que también puede expresarse como un aumento del índice oncolítico.

60 **[0052]** En un virus de acuerdo con la invención, el nivel de la isoforma de E1B-156r se incrementará en relación con el E1B-156r en la secuencia de adenovirus de tipo silvestre equivalente. En este documento, "incrementado" significa que la proporción de la isoforma E1B-156R se incrementa al menos 2 veces, 4 veces, 10 veces, 20 veces, 50 veces, 65 100 veces, 1,000 veces o 10,000 veces en relación con los niveles de tipo salvaje.

[0053] En este documento, "disminución" significa que la proporción de la isoforma de E1B-496R se reduce al menos 2 veces, 4 veces, 10 veces, 20 veces, 50 veces, 100 veces, 1000 veces o 10.000 veces en relación con los niveles de tipo salvaje.

5 **[0054]** En este documento, "niveles de tipo salvaje" se refiere a los niveles de isoformas que son evidentes por la expresión de estas proteínas a partir del adenovirus de tipo salvaje E1B-156r, E1B-496R, E1B-93R, y E1B-84R, sin mutaciones en la secuencia de referencia del gen E1B (es decir, SEQ ID NO: 1). Por ejemplo, la proporción de la isoforma E1B-156R de Ad5 mutante puede aumentar en relación con los niveles en el adenovirus Ad5 de tipo salvaje, de modo que el adenovirus mutante tenga un efecto oncolítico en una célula cancerosa. La isoforma mutante de Ad2
10 E1B-156R puede incrementarse en relación con los niveles en el adenovirus Ad2 de tipo salvaje.

[0055] Los virus preferidos de acuerdo con la invención pueden haberse disminuido o inhibido la expresión de E1B-93R, y preferiblemente no expresan E1B-93R. Por "no se expresa" se entiende aquí que el nivel detectable de la secuencia E1B-93R es menor que 50%, 10%, 1% del nivel de la secuencia E1B-93R en el adenovirus de tipo salvaje
15 en condiciones equivalentes, preferiblemente menos de 0,1%, menos de 0,01% o incluso menos. Esto tiene el efecto de elevar la expresión de E1B-156R.

[0056] Preferiblemente, una relación óptima de los niveles de proteína isoforma E1B-156r, E1B-496R, E1B-93R, y E1B-84R residiría lo largo de las líneas de aproximadamente 67:0:0:33, en comparación con aproximadamente
20 5:70:10:15 para virus de tipo salvaje. Sin embargo, como apreciará el lector experto, es difícil o imposible ser exacto con respecto a los niveles relativos de este tipo, ya que dependen del punto en el ciclo de infección evaluado, es decir, temprano/intermedio/tardío. Las proporciones cambian en beneficio de las formas de empalme más cortas a un costo de 496R (que es el ARN de longitud completa sin empalmes). En particular, proporciones favorecidas de la isoforma E1B-156r a la isoforma E1B-496R son 2:1, 5:1, 10:1, 20:1, 50:1, 100:1, 1000:1 o 10.000:1 o más. Se prefiere una
25 relación de 100:1 o más.

[0057] La referencia aquí a "la proporción" de las isoformas E1B-156r, E1B-496R, E1B-93R, o E1B-84R se refiere a:
a) el nivel de la proteína isoforma que se expresa; y/o b) el nivel del ARNm de isoforma que se produce.

30 **[0058]** Las técnicas para medir los niveles de ARNm serán conocidas por los expertos en la técnica para la cuantificación de polinucleótidos, tales como, por ejemplo, amplificación de ácidos nucleicos, por ejemplo, PCR, RT-PCR, metodologías basadas en TaqMan, Protección de RNasa, transferencia de Northern y técnicas de hibridación *in situ*, y versiones cuantitativas de estos métodos. Los cambios en los niveles de expresión de ARNm pueden ser de naturaleza temporal, espacial o cuantitativa. El número de copias de cada ARNm de la isoforma E1B se puede calcular
35 y comparar con una referencia, por ejemplo, un gen de mantenimiento como la beta-actina o GAPDH o un plásmido que lleva el "amplicón de interés" específico.

[0059] Si se va a controlar en los niveles de polipéptido, cualquier técnica de ensayo se puede usar que puede determinar niveles de un polipéptido específico, incluyendo radioinmunoensayos (RIA), ensayos de unión competitiva,
40 análisis de transferencia Western, FACS y ensayos de inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA). Los anticuerpos que se unen específicamente a isoformas particulares de empalme pueden usarse, por ejemplo. Los anticuerpos pueden usarse con o sin modificación, y pueden etiquetarse uniéndolos, ya sea covalentemente o no covalentemente, con un reactivo analíticamente detectable tal como un radioisótopo, una molécula fluorescente o una enzima u otra molécula informadora. Se puede usar una amplia variedad de moléculas informadoras conocidas en la técnica.
45

Isoformas E1B

[0060] Se sabe muy poco acerca de la E1B-156r, E1B-93R, isoformas de E1B-84R. La producción de diferentes ARNm de E1B se regula durante el proceso de infección. Aunque principalmente la forma de 2,28 kb se produce temprano en la infección, la proporción de ARNm empalmados más cortos aumenta con el tiempo y el transcrito E1B-84R se vuelve predominante en la fase tardía de la infección. La expresión de la proteína isoforma sigue de cerca el patrón de transcripción de los ARNm (Chow et al (1979) J. Mol Biol 134: 265-303; Montell et al (1984) Mol Cell Biol 4:966-972; Spector et al (1978) J. Mol Biol 126: 395-414; Virtanen y Pettersson (1985) J. Virol. 54: 383-391; Wilson y Darnell (1981) J. Mol Biol 148: 231-251).
50
55

[0061] Se ha demostrado que diferentes espliceotipos pueden interactuar tanto hetero como homogéneamente entre sí a través del N-terminal y el C-terminal debe llevar a funciones específicas que no pueden ser complementadas por espliceotipos E1B alternativos. Cuando se infecta con virus que carecen de la expresión de un espliceotipo específico, la pérdida de viabilidad puede complementarse mediante la cotransfección con un plásmido de expresión para el correspondiente espliceotipo. La cotransfección con un espliceotipo alternativo no complementa la pérdida.
60

Adenovirus mutantes

65 **[0062]** La siguiente tabla resume los detalles de algunos mutantes de adenovirus representativos proporcionados como ejemplos de la enseñanza de este documento, junto con algunos virus de control experimental.

Virus	Mutaciones ^a	Descripción
Ixovex	A3216G	E1B-93R mutante en el sitio de empalme No expresa la isoforma E1B-93R Destabiliza E1B-496R debido al cambio de secuencia Aumentos en los niveles de E1B-156R
Ixo-ctrl		Virus de control (tipo salvaje)
Ixo-156	T3272G/G3275A	E1B-156R mutante en el sitio del aceptor de empalme No expresa la isoforma E1B-156R La secuencia E1B-496R no se modifica Expresa otros productos del gen E1B Aumento de los niveles 93R
Ixo-93	G3218A/G3221A	Mutante en el sitio del aceptor de empalme E1B-93R No expresa la isoforma E1B-93R La secuencia E1B-496R no se modifica Aumentos en los niveles de E1B-156R
Ixo-SD	G2255A/T2258C	E1B mutante del sitio del donante de empalme 1 No expresa las secuencias E1B-93R, -156R y -84R Las secuencias de E1B-496R no se modifican
Ixo-Stop	G2274T	Inserta un codón de parada corriente abajo del sitio del donante de empalme E1B No expresa la proteína E1B-496R Expresa las isoformas E1B-93R, -156R y -84R
^a Numerado según la posición en el número de acceso del genoma de Ad5 AC_000008,1 (SEQ ID NO: 41)		

[0063] El adenovirus en el presente documento denominado el virus Ixovex ha disminuido o inhibe la expresión de E1B-93R, y preferiblemente no expresa E1B-93R. Por "no expresa" se entiende en este documento que el nivel detectable de la secuencia de E1B-93R es de menos de 50%, 10%, 1% del nivel de la secuencia de E1B-93R en el adenovirus de tipo salvaje en condiciones equivalentes, preferiblemente menos de 0,1%, menos de 0,01% o incluso menos. Esto tiene el efecto de elevar la expresión de E1B-156R.

[0064] Además, en este virus completo la proteína de longitud E1B E1B-496R se desestabiliza. Por "desestabilizado" se entiende que la proteína se vuelve sustancialmente indetectable debido a la mutación. Esto deja solo E1B-156R y E1B-84R aún expresados desde el marco de lectura 496. La naturaleza inestable de E1B-55k se discute en Gabler et al. 1998 J. Virol.; y González 2002, J. Virol.

[0065] La eficacia de Ixovex en comparación con H101 sugiere que, en cierta medida, E1B-496R y E1B-156R tienen funciones superpuestas (Sieber et al (2007) J. Virol 81 (1): 95-105). Se ha encontrado que E1B-496R y E1B-156R se unen a muchos factores similares. E1B-156R puede unirse a E4orf6, el socio de enlace con el que E1B-496R utiliza la mayoría de sus funciones importantes. Curiosamente, también se ha encontrado que E1B-156R se une a p53, aunque con menos afinidad. E1B-156R puede sustituir a E1B55k en experimentos de transformación celular. Además, E1B-156R induce tumores en modelos *in vivo*, cuando se sobreexpresan junto con E1A. Específicamente, se encontró que el espliceómero E1B-156R tiene un potencial de transformación celular separado de la proteína E1B-496R.

[0066] Es una ventaja de la presente invención que con el fin de lograr el efecto oncogénico descrito, los virus según la presente invención no requieren la eliminación de la totalidad del gen E1B.

55 Métodos de generación de virus recombinantes.

[0067] Se describen polinucleótidos que codifican los adenovirus recombinantes, opcionalmente codificados dentro de un vector adecuado para la producción de virus en una célula huésped.

60 [0068] Se describen células huésped que comprenden polinucleótidos que codifican el adenovirus recombinante.

[0069] También se describe un método para hacer un adenovirus oncolítico. Dicho método implica la modificación de un adenovirus mutante en el que la secuencia del gen E1B se ha modificado para aumentar el nivel de la isoforma E1B-156R en relación con el nivel en el adenovirus equivalente de tipo salvaje. El tipo de adenovirus puede ser cualquiera de los descritos anteriormente, y preferiblemente es un adenovirus humano de grupo subfamilia C, a saber, uno de los serotipos 1, 2, 5, 6, o 57, incluso más preferiblemente, el término adenovirus se aplica a dos serotipos

humanos, Ad2 y Ad5. De manera similar, la mutación puede ser cualquiera de las descritas o ejemplificadas en el presente documento. En ciertas realizaciones, un virus híbrido puede diseñarse, por ejemplo, en el que un E1B-156R de una variante de adenovirus se expresa en otra variante de adenovirus. Por ejemplo, un Ad2 E1B-156R puede expresarse en un adenovirus Ad5; se ha demostrado en este documento que agregar Ad2 E1B-156R a Ad5 aumenta la actividad oncolítica en 10 veces.

[0070] Las técnicas adecuadas para diseñar mutaciones en adenovirus alternativos serán conocidas por los expertos en la técnica. Un método preferido podría ser usar el sistema pShuttle ampliamente utilizado (Agilent Technologies) o usar el método desarrollado por el Dr. Oberg (la invención de IXOvex y miembro de la junta directiva de IXOgen)) utilizando el sistema pSuperShuttle (ver Ingemarsdotter, CK, SK Baird, CM Connell, D. Oberg, G. Hallden y IA McNeish. 2010. Paclitaxel en dosis bajas sinergiza con adenovirus oncolíticos a través del deslizamiento mitótico y la apoptosis en el cáncer de ovario (Oncogene 29: 6051-6063). Esto permite la inserción o mutación de cualquier secuencia en cualquier parte del adenovirus, lo que pShuttle no puede hacer, estando limitado a las regiones finales del genoma adenoviral. En breve, las secuencias flanqueantes (brazo izquierdo y derecho) de la región de interés pueden clonarse en el plásmido pSuperShuttle en cada lado de un gen de selección de antibióticos (ASG). Si se desea una mutación de cualquier tipo (sustitución, eliminación o adición), se puede incorporar en cualquiera de los brazos. Para la inserción de un gen de interés o un casete de expresión completo en el virus, se pueden usar los sitios de clonación múltiple extensos en cada lado del ASG. Cuando el constructo pSupershuttle completo está secuenciado y listo, se fusiona con el virus mediante recombinación homóloga. El ASG insertado permite una selección positiva. El ASG se digiere, dejando una pequeña cicatriz en forma de un sitio único de enzimas de restricción, que se puede utilizar en futuras modificaciones del virus. Los expertos en la técnica conocerán otras variaciones adecuadas de esta técnica.

Construcción de mutantes E1B-55K de adenovirus

[0071] Los métodos para la construcción de mutantes adenovirales son generalmente conocidos en la técnica. Ver, Mittal (1993) Virus Res., 28: 67-90 y Hermiston et al., Methods in Molecular Medicine: Adenovirus Methods and Protocols (1999) ed. Wold, Humana Press. Además, el genoma del adenovirus 5 está registrado como Secuencia de referencia NCBI: AC_000008.1, y el virus está disponible en la American Type Culture Collection, Rockville, Md., EE.UU., con el número de acceso: VR-1516.

[0072] En general, la construcción de adenovirus vector implica una delección inicial o la modificación de una región deseada del genoma adenoviral, preferiblemente del genoma de Ad5, en un casete de plásmido usando técnicas convencionales.

[0073] Algunos de los materiales y métodos utilizados para construir mutantes de adenovirus se describen por Hanke et. Alabama. (1990) Virology, 177: 437-444 y Bett et. al., (1993) J. Virol. 67: 5911-5921, y en PCT/CA96/00375. Muchos de los materiales utilizados para construir mutantes de adenovirus se proporcionan comercialmente. Ver también, Hermiston et al., Methods in Molecular Medicine: Adenovirus Methods and Protocols (1999) ed. Wold, Humana Press. Otros detalles se proporcionan aquí.

[0074] Las líneas celulares que se utilizaron para llevar a cabo los experimentos descritos en este documento son fácilmente disponibles de instituciones depositarias reconocidas. Por ejemplo, las siguientes líneas celulares se usaron aquí para evaluar la citotoxicidad: H1299, FaDu, H460, A549, HeLa, Hek293, JH293 y NHBE.

[0075] Un procedimiento preferido para la construcción de los mutantes del gen E1B adenovirales de la presente invención es hacer mutaciones específicas de sitio en el genoma adenoviral en un casete de plásmido utilizando técnicas bien establecidas de la biología molecular, o modificaciones de estas técnicas, se hace referencia en el presente documento. Esto se puede realizar utilizando diversos materiales y métodos.

Métodos de tratamiento del cáncer.

[0076] Se divulgan adenovirus recombinantes que producen un efecto oncolítico en una célula cancerosa. La célula cancerosa puede ser una célula neoplásica. También se describen nuevos métodos para tratar el cáncer, caracterizados por células neoplásicas. Las células neoplásicas pueden preferiblemente carecer sustancialmente de la función de p53 (p53^{-/-}). Dicho método puede comprender:

- a) administrar una dosis del adenovirus recombinante de acuerdo con la invención, que porta una mutación en el gen E1B, a un paciente que necesita tratamiento;
- b) dejar suficiente tiempo para que el adenovirus recombinante infecte células neoplásicas de dicho cáncer, en el que el adenovirus mutante tiene un efecto oncolítico que es selectivo para las células cancerosas en relación con las células no neoplásicas; y
- c) opcionalmente, administrar dosis adicionales del adenovirus recombinante.

[0077] La célula de cáncer o célula neoplásica puede carecer sustancialmente de la función de p53.

[0078] En el presente documento se describen adenovirus recombinantes para uso como un agente terapéutico en el tratamiento de un paciente con cáncer. Preferiblemente el cáncer se caracteriza por células neoplásicas. Preferiblemente, esas células neoplásicas carecen sustancialmente de la función de p53.

[0079] Las composiciones también descritas comprenden los adenovirus recombinantes de la invención y las composiciones farmacéuticas que comprenden un adenovirus recombinante de la invención.

[0080] Los procesos para preparar una composición farmacéutica que implica la combinación de un adenovirus recombinante de la invención con un vehículo farmacéuticamente aceptable también se describen.

[0081] Las composiciones pueden comprender adicionalmente un agente para la quimioterapia.

[0082] En el presente documento se describen varios métodos y composiciones novedosas para la ablación de células neoplásicas infectando las células neoplásicas con un adenovirus recombinante que es sustancialmente deficiente en replicación en células no neoplásicas y que exhibe al menos un fenotipo de replicación parcial en células neoplásicas. La diferencia en el fenotipo de replicación de las construcciones de adenovirus de la invención en células neoplásicas y no neoplásicas proporciona una base biológica para la terapia del cáncer basada en virus.

[0083] Una población celular (como un cultivo celular mixto, paciente de cáncer humano o sujeto mamífero no humano) que comprende una subpoblación de células neoplásicas que carecen de la función de p53 y una subpoblación de células no neoplásicas que expresan la función de p53 esencialmente normal puede ser contactada en condiciones infecciosas (es decir, condiciones adecuadas para la infección adenovírica de la población celular, típicamente condiciones fisiológicas) con una composición que comprende una dosis infecciosa de un adenovirus inhibido por replicación E1B-p53⁽⁻⁾. Dicha etapa de contacto da como resultado la infección de la población celular con el adenovirus deficiente en la replicación E1B-p53⁽⁻⁾. La infección produce una expresión preferencial de un fenotipo de replicación en una fracción significativa de las células que comprenden la subpoblación de células neoplásicas que carecen de la función p53, pero no produce una expresión sustancial de un fenotipo replicativo en la subpoblación de células no neoplásicas que tienen una función p53 esencialmente normal. La expresión del fenotipo de replicación en una célula p53⁽⁻⁾ infectada provoca la muerte de la célula, como el efecto citopático (CPE), la lisis celular, la apoptosis o similar, lo que da como resultado una ablación selectiva de células neoplásicas p53⁽⁻⁾ de la población celular.

[0084] Es deseable que el virus mutante sea replicable y forme viriones infecciosos que contengan el genoma viral mutante que puede propagarse e infectar otras células, amplificando así la acción antineoplásica de una dosificación inicial de virus mutante.

[0085] En este documento, la replicación de E1B-p53⁽⁻⁾ del adenovirus inhibe construcciones adecuadas para la destrucción selectiva de las células neoplásicas p53⁽⁻⁾ son las descritas anteriormente.

[0086] Mutantes de adenovirus antineoplásicos candidatos se pueden evaluar además por su capacidad para reducir tumorigénesis o la carga de células neoplásicas en ratones nu/nu que albergan un trasplante de células neoplásicas que carecen de la función de p53, en comparación con los ratones no tratados que albergan un trasplante equivalente de las células neoplásicas.

[0087] Los mutantes de adenovirus deficientes en replicación antineoplásica pueden formularse para administración terapéutica, profiláctica y, potencialmente, diagnóstica a un paciente que tiene una enfermedad neoplásica. Para usos terapéuticos o profilácticos, se administra a un paciente una composición estéril que contiene una dosis farmacológicamente eficaz de una o más especies de mutantes adenovirus inhibidos de la replicación antineoplásica para el tratamiento de una afección neoplásica. Un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable se emplea a menudo en tales composiciones estériles. Se puede usar una variedad de soluciones acuosas, por ejemplo, agua, agua tamponada, solución salina al 0,4%, glicina al 0,3% y similares. Estas soluciones son estériles y generalmente están libres de partículas diferentes a los viriones adenovirales deseados. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables según se requiera para aproximarse a condiciones fisiológicas, tales como agentes de ajuste de pH y tampones, agentes de ajuste de toxicidad y similares, por ejemplo, acetato de sodio, cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio, lactato de sodio, etc. Se puede incluir excipientes que mejoran de la infección de las células por el adenovirus.

[0088] La terapia de la enfermedad neoplásica puede proporcionarse administrando a un paciente o sujeto una composición que comprende los adenovirus defectuosos de la replicación de la invención. Diversas neoplasias humanas y de mamíferos que comprenden células que carecen de la función de p53 pueden tratarse con construcciones adenovirales inhibidas por replicación. Por ejemplo (pero sin limitarse a) un paciente humano o un mamífero no humano que tiene un carcinoma broncogénico, carcinoma nasofaríngeo, carcinoma de laringe, carcinoma de pulmón de células pequeñas y células no pequeñas, adenocarcinoma de pulmón, hepatocarcinoma, carcinoma pancreático, carcinoma de vejiga, carcinoma de colon, carcinoma de mama, carcinoma de cervix, carcinoma de ovario o leucemias linfocíticas se pueden tratar administrando una dosis antineoplásica eficaz de un adenovirus inhibido por replicación adecuada.

[0089] Las suspensiones de partículas infecciosas de adenovirus pueden aplicarse al tejido neoplásico por varias vías, incluidas la intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, subdérmica y tópica. Una suspensión de adenovirus, preferiblemente una suspensión acuosa, que contiene entre aproximadamente 10^3 y 10^{15} o más partículas de virión por ml (como por ejemplo entre aproximadamente 10^5 a 10^{12} o más partículas de virión por ml, entre aproximadamente 10^7 y 10^{10} o más virión). las partículas por ml, o aproximadamente 10^9 partículas de virión por ml) se pueden inhalar como una neblina (por ejemplo, para el suministro pulmonar para tratar el carcinoma broncogénico, el carcinoma pulmonar de células pequeñas, el carcinoma pulmonar de células no pequeñas, el adenocarcinoma pulmonar o el cáncer de laringe). Alternativamente, dicha suspensión se puede limpiar directamente en un sitio del tumor para tratar un tumor (por ejemplo, carcinoma broncogénico, carcinoma nasofaríngeo, carcinoma de laringe, carcinoma cervical) o se puede administrar por infusión (por ejemplo, en la cavidad peritoneal para tratar el cáncer de ovario, en la vena porta para el tratamiento de hepatocarcinoma o metástasis hepáticas de otros tumores no primarios hepáticos) u otra vía adecuada, incluida la inyección directa en una masa tumoral (por ejemplo, un tumor de mama), enema (por ejemplo, cáncer de colon) o catéter (por ejemplo, cáncer de vejiga).

[0090] Virus inhibidos por replicación también se pueden suministrar a las células neoplásicas por entrega de liposoma o inmunoliposoma; dicha administración puede dirigirse selectivamente a las células neoplásicas sobre la base de una propiedad de la superficie celular presente en la población de células neoplásicas (por ejemplo, la presencia de una proteína de la superficie celular que se une a una inmunoglobulina en una inmunoliposoma). Por ejemplo, una suspensión de viriones de adenovirus inhibidos de la replicación se puede encapsular en micelas para formar inmunoliposomas por métodos convencionales (por ejemplo, véase la Patente de EE.UU. N° 5.043,164, Patente de EE.UU. N° 4.957.735, Patente de EE.UU. N° 4.925.661; Connor y Huang (1985) Cell J. Biol 101: 582; Lasic DD (1992) Nature 355: 279; Novel Drug Delivery (1989) eds Prescott y Nimmo, Wiley, Nueva York; y Reddy et al (1992) J. Immunol. 148: 1585). Los inmunoliposomas que comprenden un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno de células cancerosas (por ejemplo, CALLA, CEA) presente en las células cancerosas del individuo pueden usarse para dirigir viriones a esas células.

[0091] Las composiciones que contienen los presentes adenovirus o cócteles de replicación deficiente antineoplásicos de los mismos pueden administrarse para tratamientos profilácticos y/o terapéuticos de enfermedades neoplásicas. En la aplicación terapéutica, las composiciones se administran a un paciente ya afectado por la enfermedad neoplásica particular, en una cantidad suficiente para curar o al menos detener parcialmente la enfermedad y sus complicaciones. Una cantidad adecuada para lograr esto se define como una "dosis terapéuticamente eficaz" o "dosis eficaz". Las cantidades efectivas para este uso dependerán de la gravedad de la afección, el estado general del paciente y la vía de administración.

[0092] En aplicaciones profilácticas, las composiciones que contienen la replicación antineoplásica inhibieron adenovirus o cócteles de los mismos se administran a un paciente no presentemente en un estado de enfermedad neoplásica para mejorar la resistencia del paciente a la recurrencia de un neoplasma o para prolongar el tiempo de remisión. Dicha cantidad se define como una "dosis profilácticamente eficaz". En este uso, las cantidades precisas dependen nuevamente del estado de salud del paciente y del nivel general de inmunidad.

[0093] Las administraciones únicas o múltiples de las composiciones pueden llevarse a cabo con niveles y patrones de dosis seleccionados por el médico tratante. En cualquier caso, las formulaciones farmacéuticas deben proporcionar una cantidad de adenovirus inhibidos por la replicación antineoplásica de esta invención, suficientes para tratar al paciente de manera efectiva.

[0094] La terapia adenovírica inhibida por replicación antineoplásica de la presente invención puede combinarse con otros protocolos antineoplásicos, tales como quimioterapia convencional.

General

[0095] El término "que comprende" abarca "que incluye" así como "que consiste en", por ejemplo, una composición "que comprende" X puede consistir exclusivamente en X o puede incluir algo adicional por ejemplo X + Y.

[0096] La palabra "sustancialmente" no excluye "completamente", por ejemplo, una composición que está "sustancialmente libre" de Y puede estar completamente libre de Y. Cuando sea necesario, la palabra "sustancialmente" puede omitirse de la definición de la invención.

[0097] La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de biología molecular, microbiología, tecnología de ADN recombinante e inmunología, que están dentro de la experiencia de los que trabajan en la técnica.

[0098] La mayoría de las técnicas de biología molecular general, la microbiología de tecnología de ADN recombinante e inmunológicas se pueden encontrar en Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual (2001) Cold Harbor-Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY o Ausubel et al., Protocolos actuales en biología molecular (1990) John Wiley and Sons, NY

[0099] A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la técnica a la que pertenece esta invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

5

[0100]

FIGURA 1. Descripción esquemática de un virus oncolítico.

10 FIGURA 2. Mapa de empalme E1B que muestra los productos del gen E1B alternativo. La transcripción completa de E1B lleva el marco de lectura abierto (ORF) E1B-176R y E1B-496R. Mediante el empalme alternativo en el ORF E1B-496 se expresan otras tres proteínas, E1B-93R, E1B-156R y E1B-84R. Las proteínas menores tienen los 79 aminoácidos amino terminales en común con E1B-496R pero difieren en el terminal carboxi, excepto en E1B-156R, que se empalma en el marco con E1B-496R.

15 FIGURA 3. Un cambio de aminoácido en Ixovex en la proteína E1B-55k inhibe su expresión. Las células A549 se infectaron con el virus respectivo a 5 pfu/célula y el lisado celular total se recogió 48 horas después de la infección (hpi). Se muestra una transferencia de Western teñida con anticuerpo policlonal Ab6982 de proteína α -cápsida (panel superior), anticuerpo monoclonal α -E1B-55k 2A6 (panel medio) y anticuerpo monoclonal α -actina I-19-SC como control de carga (panel más bajo).

20 FIGURA 4. La mutación puntual en el marco de lectura abierto E1B55k en Ixovex inhibe el empalme del aceptador de empalme 93R. Las células A549 se infectaron con el virus respectivo a 5 pfu/célula y el ARN total se recolectó a 48 hpi. El ADNc se hizo usando un cebador oligo-dT. La PCR se realizó utilizando un cebador de sentido común corriente arriba del donante de empalme de 55k y cebadores específicos corriente abajo del respectivo aceptor de empalme. Las reacciones de PCR se realizaron en un gel de agarosa TBE al 2% teñido con GelRed.

25 FIGURA 5. Ixovex se inhibe para inducir la degradación de p53. Las células A549 se infectaron con el virus respectivo a 5 pfu/célula y el lisado celular se recogió 48 hpi. Se muestra una tinción de transferencia western con un anticuerpo monoclonal α -p53 n.º 9282 CS (panel superior) y el anticuerpo monoclonal α -actina I-19-SC como control de carga (panel inferior).

30 FIGURA 6. Ensayo de replicación en líneas celulares de cáncer. Cada línea celular se infectó con 5 pfu/célula del virus respectivo. Las células y los medios se recogieron a 24, 48 y 72 hpi y se analizaron mediante un ensayo de dilución limitada. El CPE se anotó visualmente después de 10 días y se calcularon los resultados de TCID₅₀ (pfu/célula), como se describe en los materiales y métodos.

35 FIGURA 7. La citotoxicidad relativa de los virus Ixovex, Ad5wt y Onyx-015 en células cancerosas. La línea celular respectiva se infectó con los virus indicados en una serie de dilución de 5 veces. La citotoxicidad se midió 6 días después de la infección (ppp) utilizando el ensayo MTS y se calcularon los valores de EC₅₀.

40 FIGURA 8. Eficacia de la replicación en células epiteliales bronquiales humanas normales. Cada línea celular se infectó con 5 pfu/célula del virus respectivo. Las células y los medios se recogieron a 24, 48 y 72 hpi y se analizaron mediante un ensayo de dilución limitada. El CPE se anotó visualmente después de 10 días y se calcularon los resultados de TCID₅₀ (pfu/célula), como se describe aquí.

45 FIGURA 9. Ixovex muestra más de 500 veces menos citotoxicidad para las células normales en comparación con el virus no modificado (Ad5wt). Se presenta la inhibición del pliegue de la citotoxicidad en relación con Ad5wt (fila inferior) y los valores de CE₅₀ sin procesar (fila superior). La citotoxicidad se midió a 6 dpi utilizando el ensayo MTS.

50 FIGURA 10. La proteína E1B-156R está sobreexpresada por Ixovex. La transferencia western se realizó en proteína total extraída a 48 hpi de células H1299 infectadas con 10 pfu/célula de Ixovex o Ad5wt.

55 FIGURA 11. Las proteínas Ad5 y Ad2-156R mejoraron el índice oncolítico (OI) en células cancerosas en comparación con las células normales. **A)** Los plásmidos de expresión Ad5 y Ad2-156R se transfectaron en células HeLa y NHBE infectadas con Ad5wt. En paralelo, se incluyó una línea celular de cáncer adicional (H460, carcinoma de pulmón de células grandes) en la complementación de Ad5-156R. **B)** Ad5-156R se transfectó en células infectadas con ONYX-015. **C)** Ad5-156R se transfectó en células infectadas con Ad2wt. Las células se infectaron con 2,5 pfu/célula y se complementaron de forma cruzada con plásmidos de expresión para el respectivo E1B-156R. Las muestras se analizaron con un ensayo de Ráfaga (replicación viral), en el hpi indicado.

60 FIGURA 12. Tabla que muestra los puntos de datos de 48 hpi para las Figuras 11A-C (excepto los puntos de datos H460 que se recolectaron 72 hpi) y el cálculo de los índices oncolíticos, donde $OI = ((a/b)/(c/d))$. a =

65

pfu/células de cáncer de células + 156R, b = pfu/células de células normales + 156R, c = pfu/células de cáncer de células - 156R, d = pfu/células de células normales - 156R.

5 FIGURA 13. La secuencia proteica de E1B-156R para los serotipos de la subfamilia C de adenovirus alineada con las secuencias para los serotipos de las subfamilias B, D y E. Campo sombreado: las similitudes dentro del grupo C. Las brechas indican dónde difieren. Subrayado en Ad5: los aminoácidos que separan a Ad5-156R de las otras proteínas E1B-156R en la subfamilia C.

10 FIGURA 14. Geles de ADN que muestran bandas de ADNc amplificadas correspondientes a E1B-156R en Ad2, Ad4 y Ad11. Todas las bandas en los geles se clonaron en el vector romo de PCR Topo-II (Invitrogen) y se secuenciaron para confirmar que las bandas indicadas correspondían a la E1B-156R de cada virus respectivo.

15 EJEMPLOS

Materiales y métodos

Construcción de virus

20 **[0101]** Los nucleótidos 1 a 5.055 de adenovirus serotipo 5 (Ad5) se amplificaron por PCR con Phusion PFU polimerasa usando oligonucleótidos Ad5start (SEQ ID NO: 15 - ccacctgagttaattaacatcatcaataatataccttatttg) y Ad5wt5055as (SEQ ID NO: 16 - gtgggttaaacggttggtcagggaaacatg). El ADN genómico viral extraído de un lote de Ad5 purificado con CsCl se utilizó como plantilla. El producto de la PCR se clonó en pShuttle (Stratagene) utilizando las enzimas de restricción NotI y PmeI (NEB). Para producir mutaciones en el sitio de empalme E1B 93R en pShuttle-5055, los oligonucleótidos Mut93Rs (SEQ ID NO: 17 - ccttgattgggtaatagaagaggagtgttctaccttaccatg) y Mut93Ras (SEQ ID NO: 18 - cattgtaaggtaggaacactcctcttattacccaatgcaagg) se utilizaron en una reacción PCR Mutagenesis XL (Stratagene), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los clones fueron seleccionados y enviados para secuenciación. Se linealizaron cinco µg del clon correcto utilizando PmeI (NEB), se trataron con fenol/cloroformo y se precipitaron con etanol. Se mezclaron 200 ng junto con 100 ng del plásmido pTG3602. La mezcla se sometió a electroporación en células BJ5183 (Stratagene) y se colocó en placas de kanamicina (25 µg/ml) que contenían placas de agar. Los clones se seleccionaron por exclusión de tamaño en un gel de craqueo. En resumen, el sedimento de 1 µl de cultivo bacteriano se resuspendió en 50 µl de agua y se trató con 50 µl de fenol/cloroformo. La mezcla se centrifugó durante 1 minuto a 13.000 rpm y se recogió la fase acuosa. La fase acuosa que contenía todo el ADN y el ARN de la bacteria se trató durante 5 minutos con un colorante de carga de ADN que contenía RNasaH y luego se aplicó en un gel de agarosa al 0,7%. El ADN se preparó a partir de los clones seleccionados (kit Qiagen Maxi Prep) y se secuenció para garantizar que se había introducido la mutación correcta. Se digirieron cinco µg del mutante pT3602 correcto con PacI para extirpar el genoma viral, se trataron con fenol/cloroformo y se precipitó con etanol. Dos µg del plásmido digerido se transfectaron en 10e5 células Hek293 en una placa de 6 pocillos utilizando transfecteno (Biorad). Cinco días después, las células se recogieron, se sometieron a tres rondas de congelación/descongelación y se aplicaron a una botella de T175 con un 80% de subconfluentes con células A549 para aumentar el volumen del lisado de células infectadas.

45 **[0102]** Un CF-10 (Thermo Scientific) se sembró con células HEK293 y se infectó a 80% de confluencia con una tercera parte del lisado celular. Tres días después se cosechó el CF-10. El sedimento celular se congeló/descongeló tres veces, se centrifugó para limpiar el lisado y se aplicó a un gradiente de CsCl de 1,25/1,4 g/ml y se centrifugó a 25.000 rpm en una ultracentrífuga. La banda del virus se recogió con una jeringa 21G y se distribuyó en columnas de CsCl de 1,35 g/ml. Las columnas se hicieron girar a 40.000 rpm durante la noche y la banda del virus se recogió con una jeringa 21G. El virus extraído se inyectó en un casete Slide-A-Lyzer (Thermo Scientific) y se dializó durante la noche a 4°C en TRIS 50 mM, pH 7,8, NaCl 150 mM, MgCl₂ 1 mM, glicerol al 10%. La actividad del virus, evaluada por el 50% de la dosis infecciosa de cultivo tisular (TCID₅₀) (pfu/ml), se determinó mediante el uso de células JH293 como se describe en la sección de Replicación Viral a continuación. El ADN viral se purificó a partir de una pequeña alícuota y se determinó el número de genomas virales por µl (partículas/µl) utilizando un espectrofotómetro. Las relaciones entre las partículas y las actividades de todos los virus utilizados en este documento fueron menores que 20. El virus Ixo-ctrl es un clon de tipo salvaje de la cepa pTG3602 de serotipo 5 adenoviral.

55 **[0103]** En paralelo, se hicieron plásmidos pShuttle en los que todos los sitios de empalme se mutaron individualmente sin cambiar la secuencia de aminoácidos de la proteína E1B-496R, utilizando el Kit de Mutagénesis por PCR XL (Stratagene) según las recomendaciones del fabricante.

Oligonucleotides for PCR Mutagenesis	Oligonucleotide sequences	SEQ ID NO:
Ixo-CtrlS (wt)	CTTGCATTTGGGTAACAGgaggggggtgtcct acc	SEQ ID NO: 19
Ixo-CtrlAS (wt)	ggtaggaacacccccctcCTGTTACCCAAATGCA AG	SEQ ID NO: 20
Ixo-156Rs	ctaaGATATTGCTgGAaccggagagcatgtcc	SEQ ID NO: 21
Ixo-156Ras	ggacatgctctcgggtTCcAGCAATATCttag	SEQ ID NO: 22
Ixo-93Rs	CATTTGGGTAACAGaagaggggtgttcc	SEQ ID NO: 23
Ixo-93Ras	ggaacacccctctCTGTTACCCAAATG	SEQ ID NO: 24
Ixo-SDs	gaatgaatgtgtacaaGTcGCTGAACTGTATC	SEQ ID NO: 25
Ixo-SDas	GATACAGTTCAGCgACTgtacaacattcattc	SEQ ID NO: 26
Ixo-StopS	gtggctgaactgtatccataactgagacgcattttg	SEQ ID NO: 27
Ixo-StopAS	caaatgcgtctcagttatggatacagttcagccac	SEQ ID NO: 28
IxovexSense	CATTTGGGTAACGGGgaggggggtgttcc	SEQ ID NO: 39
IxovexAS	ggaacacccctcCCCGTTACCCAAATG	SEQ ID NO: 40

[0104] Todos estos plásmidos pShuttle se usaron en recombinación homóloga para generar un gran conjunto de virus (ver tabla 1).

Tabla 1. Mutantes de adenovirus descritos en el presente documento.

Virus	Mutaciones ^a	Descripción
Ixovex	A3216G	E1B-93R mutante en el sitio de empalme No expresa la isoforma E1B-93R Destabiliza E1B-496R debido al cambio de secuencia Aumentos en los niveles de E1B-156R
Ixo-ctrl		Virus de control (tipo salvaje)
Ixo-156	T3272G/G3275A	E1B-156R mutante en el sitio del aceptor de empalme No expresa la isoforma E1B-156R La secuencia E1B-496R no se modifica Expresa otros productos del gen E1B Aumento de los niveles 93R
Ixo-93	G3218A/G3221A	Mutante en el sitio del aceptor de empalme E1B-93R No expresa la isoforma E1B-93R La secuencia E1B-496R no se modifica Aumentos en los niveles de E1B-156R

Virus	Mutaciones ^a	Descripción
Ixo-SD	G2255A/T2258C	E1B mutante del sitio del donante de empalme 1 No expresa las secuencias E1B-93R, -156R y -84R Las secuencias de E1B-496R no se modifican
Ixo-Stop	G2274T	Inserta un codón de parada corriente abajo del sitio del donante de empalme E1B No expresa la proteína E1B-496R Expresa las isoformas E1B-93R, -156R y -84R

^a Numerado según la posición en el número de acceso del genoma de Ad5 AC_000008,1 (SEQ ID NO: 41).

Cultivo de tejidos

[0105] Todas las células se cultivaron a 37°C y 5% de CO₂ y se analizaron regularmente para determinar la contaminación por micoplasma. Las líneas celulares utilizadas en este estudio se enumeran a continuación.

Nombre de célula	Tipo	Medio cultural	Fuente
H1299	Carcinoma pulmonar de células no pequeñas	DMEM + 10% FCS	BCI *
FaDu	Carcinoma de células escamosas faríngea	DMEM + 10% FCS	BCI
H460	Carcinoma pulmonar de células grandes	DMEM + 10% FCS	BCI
A549	Carcinoma pulmonar de células no pequeñas	DMEM + 10% FCS	Universidad de Uppsala
HeLa	Cáncer de cuello uterino	DMEM + 10% FCS	BCI
Hek293	Células renales embrionarias humanas	DMEM + 10% FCS	Universidad de Uppsala
JH293	Células renales embrionarias humanas	DMEM + 10% FCS	Universidad de Uppsala
NHBE	Epitelio bronquial humano normal	Kit de balas (Lonza)	Lonza

Ensayo de citotoxicidad

[0106] Se utilizó el 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5 (3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolim (MTS) de ensayo (CellTiter Cell 96 Aqueous Non-Radioactive Ensayo de proliferación (Promega, Wisconsin, EE.UU.) para evaluar la citotoxicidad de Ixovex y los virus de control. Con el objetivo de que las células fueran confluentes en el día 6, se sembraron 1,000-4,000 células/pozo (dependiendo de la tasa de crecimiento) en una placa de 96 pocillos en 90 µl de medio y 5% de FCS. Los virus (en 10 µl de medio y 5% de FCS) se agregaron 18 horas más tarde a nueve diluciones en serie de 1:10 comenzando a 10,000 partículas virales (vp)/célula, junto con un positivo (solo células sin virus) y un control negativo (sin células solo medianas).

[0107] Seis días después de la infección, la supervivencia se determinó usando el ensayo MTS. El MTS se mezcló con fenazinetosulfato (PMS) en una proporción de 20:1 y se añadió a las células. Después de tres horas de incubación, se midió la absorbancia a 490 nm usando el Opsy MR de 96 pocillos lector de placas y software Revelación Quicklink 4.04 (Dynex Technologies, Virginia, EE.UU.). Los valores se establecieron para cada dilución y se compararon con el control negativo (100% de muerte celular) y el control positivo (0% de muerte celular). Los valores de CE₅₀ (la mitad de la concentración efectiva máxima para destruir el 50% de las células - CE₅₀) se calcularon mediante regresión no lineal (curva de dosis-respuesta sigmoideal) utilizando GraphPad Prism (GraphPad Software, California, EE.UU.), utilizando la siguiente fórmula:

$$Y = \text{abajo} + (\text{arriba} - \text{abajo}) / (1 + 10^{[\log_{10}(\text{CE}_{50}^{-X}) \times \text{pendiente}]})$$

[0108] Y es la respuesta y comienza en "abajo" y va a "arriba" de una manera sigmoideal.

[0109] Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

Ensayo de replicación viral

[0110] Las células se sembraron en placa de 6 pocillos en medio con 10% de FCS 24 horas antes de la infección. Se usaron 100 vp/célula para infectar 80% de células confluentes en un medio FCS al 2%. Dos horas después de la infección, el medio se reemplazó con un medio FCS al 10% (infección primaria). A las horas posteriores a la infección (especificada en la figura respectiva), el medio y las células se recolectaron (mediante raspado), se congelaron y descongelaron tres veces en nitrógeno líquido y 37°C, respectivamente, y se almacenaron a -80°C hasta su uso. Se sembraron células JH293 a 10.000 células por pocillo en una placa de 96 pocillos en 200 µl de medio con 5% de FCS. En la primera fila de la TCID₅₀, la dilución inicial de las diferentes muestras fue entre sin diluir y 1:1000 dependiente de hpi y virus, estas diluciones de la infección primaria se usaron para infectar las células JH293. La última fila se dejó sin infectar como control negativo. Entre los días 9 y 11, las placas se inspeccionaron para determinar el efecto citopatógeno (CPE). El 50% de la dosis de infección de cultivo tisular (TCID₅₀) y el número de pfu/célula (recuento de células en el día de la infección) se calcularon utilizando el método acumulativo Reed-Muench. Vea el ejemplo a continuación:

Ejemplo de una placa de 96 pocillos (+ indica bien con evidencia de CPE):

[0111]

Dilución% con CPE														
10 ⁻³	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100%
10 ⁻⁴	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100%
10 ⁻⁵	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100%
10 ⁻⁶			+	+			+		+					42%
10 ⁻⁷														0%
10 ⁻⁸														0%
10 ⁻⁹														0%
Controles negativos														

- Calcule la distancia proporcional: (% siguiente por encima del 50% - 50%)/(% siguiente por encima del 50% - % siguiente por debajo del 50%) = (100% - 50%) / (100% - 42%) = 0,86
- Calcule el punto final del 50%: \log_{10} (dilución en la que la posición está por encima del 50%) = $\log_{10} 10^{-5} = -5$
- Combine los valores para obtener el $\log_{10} \text{TCID}_{50} = -5 - 0,86 = -5,86$
- TCID_{50} título = $10^{-5,86}$ (o 1 en $7,24 \times 10^5$ de dilución de la cantidad agregada a la fila superior). Como 22 μl (0,022 ml) se añadió a la fila superior, $\text{TCID}_{50}/\text{ml} = 7,24 \times 10^5 / 0,022 = 3,29 \times 10^7$
- Multiplique por una constante: $3,29 \times 10^7 \times 0,69 = 2,27 \times 10^7$ pfu/ml

[0112] Para pfu/célula, multiplique lo anterior con el volumen de virus agregado a cada pocillo de la placa de 6 pocillos (2 ml) y divídalo por el recuento de células el día de la infección (por ejemplo, $2,4 \times 10^5$): $(2,27 \times 10^7 \times 2) / 2,4 \times 10^5 = 189$ pfu/célula.

Transferencia western

[0113] Las células A549 o H1299 se infectaron con 5 pfu/célula, la proteína total se extrajo a las 48 h después de la infección usando tampón RIPA. La concentración de proteína se determinó utilizando reactivo de Bradford. Veinte μg de proteína total de cada muestra se cargaron en un gel PAGE al 10%. Las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF (BioRad) mediante transferencia húmeda. La membrana se bloqueó utilizando una solución de BSA TBS al 3% durante 1 h. Los anticuerpos primarios utilizados fueron: proteínas de la cápside Ad (AbCam-6982), E1B-55k (2A6, Sarnow, Sullivan Levine 1982, dilución 1: 500), E1A (Santa cruz, M73), actina (Santa Cruz, I-19) y p53 (Señalización Celular, N° 9282). Todos los anticuerpos se diluyeron según lo recomendado en 1,5% BSA TBS. Las membranas se incubaron con los anticuerpos primarios durante 15-24 horas a 4°C, donde después se lavaron con 1xTBS 3% Tween-20 tres veces durante 10 min. Los anticuerpos secundarios acoplados con HRP contra el anticuerpo primario respectivo se diluyeron 1:5000 en BSA TBS al 1,5% y se aplicaron a la membrana durante 1 h. Después de eliminar la dilución del anticuerpo, las membranas se lavaron con 1xTBS Tween-20 al 3% tres veces durante 10 min. Cada membrana se expuso durante 1 minuto con ECL Plus (GE, RPN2132). Después de envolverse en una lámina de plástico, las membranas se colocaron en un Hypercassette junto con Hyperfilm (GE) y las películas se desarrollaron a intervalos de tiempo seleccionados. Alternativamente, se usaron anticuerpos secundarios marcados con IRDyes de LI-COR. El análisis se llevó a cabo utilizando un Odyssey Imager.

RT-PCR

[0114] Las células A549 se infectaron con 5 pfu/célula de virus respectivo, el ARN total se extrajo a las 48 h después de la infección utilizando Trizol (Invitrogen). El ARN se trató con ADNasa (NEB, ADNasa I), se trató con fenol/cloroformo y se precipitó con etanol. Una RNA total μm se utilizó para la síntesis de ADNc (Invitrogen, Superscript® III) de acuerdo con recomendaciones de los fabricantes. ADNc se usó como plantilla en las reacciones de PCR (NEB Taq DNA Polimerase) con un oligonucleótido de sentido común (55kSense, SEQ ID NO: 29 - gctgctactgtgtcttccg) y cualquiera de los siguientes nucleótidos antisentido: 93Ras, SEQ ID NO: 30 - caccctctctgtacaac, 156Ras, SEQ ID NO: 31 - gacatgctctcgggctgtacaac o 84Ras, SEQ ID NO: 32 caaacgagtggtgctcatg. La longitud del amplicón de cada uno fue de aproximadamente 200 nucleótidos. La reacción de PCR se detuvo después de 20 ciclos y se realizó una alícuota en un gel de agarosa al 2%.

Fabricación del mutante aceptor de sitio de empalme E1B-93R adenoviral

[0115] Los primeros 5000 nucleótidos del genoma Ad5wt (NCBI Referencia de secuencia: AC_000008,1) fueron amplificados por PCR (cebadores Ad5wt5000 inicio: SEQ ID NO: 15 - ccacctcgagttaattaaCATCATCAATAATATACCTTATTTTG; Ad5wt5000as: SEQ ID NO: 16 - gtgggtttaaacGGATTTGGTCAGGGAAAACATG) y gel de agarosa purificado. El producto purificado se digirió con las enzimas de restricción NotI y Pml (New England Biolabs) y se clonó en el plásmido pShuttle (gen Stratagene), reemplazando el brazo izquierdo existente para la recombinación homóloga, produciendo pShuttle-LA, según Agilent

Technologies, AdEasy <http://www.genomics.agilent.com/CollectionSubpage.aspx?PageType=Product&SubPageType=ProductData&PageID=592>. Este plásmido se recombinó con el plásmido pTG3602, que contiene el genoma completo Ad5wt, según lo recomendado por Agilent Technologies en su sistema AdEasy utilizando células competentes para la recombinación BJ5183. Después de la recombinación, las bacterias BJ5183 se colocaron en placas de agar que contenían kanamicina. Se seleccionaron colonias individuales, se cultivaron y se preparó ADN a partir de cultivos grandes. Cada preparación de ADN se seleccionó para el evento de recombinación correcto. La digestión de los genomas se realizó con PacI (New England Biolabs). Después de que los clones correctos se habían cultivado en placas de agar, los genomas se digirieron y se transfecionaron en células HEK293 usando un reactivo de transfección de transfectina (Bio-Rad) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Cuatro días después de la transfección, se recogieron los lisados del virus [se recogieron las células mediante raspado junto con el medio y se recogieron en un tubo de halcón de 15 ml. La muestra se congeló/descongeló tres veces y se usó para infectar una botella de T175 aproximadamente 90% confluyente con células Hek293. Tres días después, las células y los medios se recolectaron y congelaron/descongelaron tres veces] y luego se usaron para infectar las fábricas de producción viral llamadas CF-10s (Nunc). Éstas tienen el área de superficie aproximada de cuarenta botellas T175, es decir, 7000 cm², y se utilizan para cultivar un gran número de células para la producción de un gran número de virus. Brevemente, las células de cuatro botellas confluentes de T175 fueron transferidas en 1 L de 5% de medio FCS DMEM a un CF10. Se aplicaron veinticinco ml (1/40) de los medios que contienen células a un nuevo T175 como control de crecimiento. El día en que el T175 era 90% confluyente, el CF10 estaba en la misma etapa. La mitad del lisado celular se inyectó en el CF10 y el medio se movió para una distribución uniforme. Tres días después, el CF10 se agitó para desalojar las células que aún no habían comenzado a flotar debido a una infección viral. La CF10 se vació, las células se centrifugaron, se lavaron en PBS y finalmente se suspendieron en Tris-HCl 50 mM, pH 7,8. La purificación se llevó a cabo mediante bandas de cloruro de cesio. Los virus se purificaron y se analizaron para determinar el título (partículas) y la actividad (pfu). La proporción de unidades vp:pfu (unidades vp:pfu) para todos los virus estaba entre 10-20. La secuenciación de uno de los clones virales mostró que tenía una mutación puntual en el sitio del aceptador de empalme E1B-93R.

Confirmar la existencia de E1B-156R en Ad2, Ad4 y Ad11

[0116] Las células A549 se infectaron con 5 pfu/célula de cada virus. A las 48 hpi, se extrajo el ARN total y 1 µg se convirtió en ADNc utilizando Superscript-II (Invitrogen) con hexámeros aleatorios. Una µl de la 50ml total se utiliza como molde en una PCR con cebadores específicos de serotipo (Ad2 *sentido*, SEQ ID NO: 33 - ctcgaggaattgccaccatggagcgaagaaccatc, Ad2 *antisentido*, SEQ ID NO 34 - cactctagatcaatctgtatcttcacgctag, Ad4 *sentido*, SEQ ID NO 35 - ggagattggacggtcttg, Ad4 *antisentido*, SEQ ID NO 36 - ggatccatcacatttgacg, Ad11 *sentido*, SEQ ID NO 37 - catccatggaggttgccc, Ad11 *antisentido*, SEQ ID NO 38 - cctaaaagaaggctttgccc). La Figura 14 muestra un gel de ADN que muestra las bandas de ADNc y resalta las bandas correspondientes al ADNc de E1B-156R. Todas las bandas en los geles se purificaron (NucleoSpin Gel y PCR Clean-up, Macherey-Nagel) y se clonaron en un vector como Topo-II PCR (Invitrogen). Los clones fueron enviados para su secuenciación. Ad2-156R y Ad5-156R se clonaron en el vector p3xFlag-CMV-14 utilizando EcoRI y XbaI.

Ensayar si la proteína E1B-156R mejora el índice oncolítico

[0117] El ADNc para E1B-156r de Ad2 y Ad5 fueron amplificados mediante PCR utilizando cebadores específicos de inicio y parada para cada respectivo E1B-55K como se discutió anteriormente. Los cebadores incluían un EcoRI en el cebador de inicio y un sitio XbaI en el cebador de parada. Los fragmentos de PCR se digirieron con las dos enzimas y se ligaron en p3xFlag-CMV-14 (Sigma-Aldrich). Las construcciones fueron secuenciadas para el inserto correcto.

[0118] Las células cancerosas (HeLa y H460) y células normales (NHBE) se transfectaron con 2 µg Ad2-156R o plásmidos de expresión Ad5-156R (o un plásmido de control) y se co-infectaron con Ad5wt, ONYX-015 o Ad2wt. La transfección se realizó utilizando el reactivo JetPRIME (POLIPlus) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La infección con los virus se realizó como se discutió anteriormente. Brevemente, cada pocillo en una placa de 6 pocillos se transfectaron con 2 µl de reactivo JetPRIME y 200 µl de tampón de transfección. Los pocillos de control se transfectaron con 2 µg de plásmido inerte, en forma de pUC19.

[0119] La replicación viral se midió en varios puntos de tiempo después de la infección usando los ensayos descritos anteriormente. Los datos se muestran en las Figuras 11A, B y C. El índice oncolítico se calculó como se muestra en la FIG. 12.

Resultados

Se pierde la proteína E1B-55k

[0120] Lisados de proteínas totales de células A549 infectadas con Ad5wt, Onyx-015, Ixovex e Ixo-CTRL mostraron que a 48 hpi todos los virus expresaron la proteína tardía (Fig. 3, panel superior), es decir, habían alcanzado la fase tardía de la replicación adenoviral. Tanto el virus Ixovex como el Onyx-015 expresaron menos proteínas tardías que Ad5wt e Ixo-ctrl, lo que refleja la reducción de la eficiencia de replicación que se observa en la FIG. 6 para las células A549. La mutación puntual de un solo nucleótido de Ixovex (SNP, ubicación genómica 3216), que cambia el

aminoácido en la posición 400 en la proteína E1B-55k de una arginina a una glicina, indujo su desestabilización (Fig. 3, panel central). La cantidad reducida de E1B-55k en Ixo-ctrl en comparación con Ad5wt refleja la eficiencia de replicación ligeramente menor de Ixo-ctrl en las células A549 (Fig. 6, panel A549).

5 *Dinámica en el uso de los aceptores de empalme E1B.*

[0121] El SNP también inhibió el uso del aceptor de empalme E1B-93R (Fig 4, segundo panel.) Cambiando la secuencia de aceptor de empalme putativo de CAG:GA a CGG:GA. Curiosamente, como efecto secundario de la inhibición del sitio de empalme 93R, hay un interruptor compensatorio para el uso del aceptor de empalme E1B-156R (Fig. 4, panel central). En ausencia de la mutación del aceptor de empalme E1B-93R, es decir, Ixo-ctrl, se restaura el uso relativo del sitio de empalme 93R (Fig. 4, panel inferior) en comparación con el virus Ad5wt (Fig. 4, panel superior). Onyx-015 no se pudo usar en este experimento ya que este virus se elimina en toda la región del gen E1B-55k.

15 *Ixovex es incapaz de inducir la degradación de p53*

[0122] El análisis de transferencia Western mostró que el SNP en Ixovex inhibió el virus de la inducción de la degradación de p53 (Fig. 5). En ausencia de la mutación aceptora de empalme E1B-93R (es decir, Ixo-ctrl), se restableció la capacidad del virus para inhibir p53. Curiosamente, hubo una expresión mucho mayor de p53 en las células infectadas con Onyx-015.

Eficacia de la replicación en células cancerosas.

[0123] Un ensayo de replicación se realizó utilizando Ad5wt, Onyx-015, Ixovex y virus Ixo-CTRL en las células A549, HeLa, H460, H1299 y FaDu. La eficiencia de replicación de todos los virus estaba por debajo del límite de detección en las células FaDu. En las células A549 y HeLa, todos los virus mostraron una eficiencia de replicación de hasta dos órdenes de magnitud inferior al virus Ad5wt (Fig. 6, paneles superiores). La atenuación de la replicación no se observó, o fue mucho menos pronunciada, en las células H460 y H1299 (Fig. 6, paneles inferiores). En las dos líneas celulares de cáncer más permisivas, se produjo de 100 a 1000 veces más el virus Ixovex, en comparación con Onyx-015.

Citotoxicidad en células cancerígenas.

[0124] La Fig. 7 muestra la citotoxicidad de los virus Onyx-015 e Ixovex en relación con el virus Ad5wt en células cancerosas. En comparación con Onyx-015, Ixovex fue más eficiente en todas las células analizadas (aparte de las células H460, en las que Onyx-015 fue 2,5 veces más tóxico). La citotoxicidad del virus Ixovex fue similar (o mucho mayor que) al virus Ad5wt en las líneas de células de cáncer A549, HeLa y H1299.

Perfil de toxicidad en células normales.

[0125] La citotoxicidad de la Ad5wt, Onyx-015, Ixovex y virus Ixo-CTRL se midió en las células NHBE (células epiteliales bronquiales humanas normales). Como se ve en la FIG. 9, los virus Ad5wt, Onyx-015 e Ixo-ctrl son relativamente tóxicos en las células normales en comparación con las células cancerosas. Sin embargo, el virus Ixovex mostró un valor de CE_{50} de 23 pfu/célula, que fue más alto que su CE_{50} en las líneas celulares de cáncer A549, HeLa y H1299. Los virus Ad5wt y Ixo-ctrl tenían valores de CE_{50} de 0,042 y 0,031 pfu/célula, respectivamente, mientras que Onyx-015 tenía 0,63 pfu/célula. Por lo tanto, Ad5wt fue mayor que 500 veces, Ixo-ctrl más que 700 veces y Onyx-015 fue más tóxico para las células normales que Ixovex.

Eficacia de la replicación en células NHBE

[0126] A las 48 hpi, la actividad del virus fue 30 veces mayor en Ixo-ctrl y Onyx-015 y 500 veces mayor en Ad5wt en comparación con virus Ixovex (Fig. 8). Estas diferencias fueron aún más pronunciadas a las 72 hpi, donde la actividad del virus fue 50 veces mayor en Ixo-ctrl y Onyx-015 y más de 2000 veces mayor en Ad5wt. De hecho, estas diferencias podrían ser incluso más pronunciadas, ya que la replicación de Ixovex apenas alcanzó el límite de detección en todos los momentos.

Ixovex sobreexpresó la proteína E1B-156R

[0127] Los niveles de proteína de E1B-156r, proteínas de la cápside de adenovirus y E1A expresadas por Ad5wt- y Ixovex-infectaron células H1299 se analizaron por Transferencia western. La Figura 10 muestra que Ixovex expresó cantidades similares de todas las proteínas virales, excepto la proteína E1B-156R, cuyos niveles aumentaron en más de 20 veces, en comparación con Ad5wt.

La proteína E1B-156R mejora el índice oncolítico

[0128] Tenemos la hipótesis de que la adición de la proteína E1B-156r *en trans* mejoraría el índice oncolítico (OI) para Ad5wt si la proteína E1B-156r era responsable del efecto oncolítico. La transfección de un plásmido de expresión

Ad5-156R y la coinfección con Ad5wt aumentaron la OI en 4 veces utilizando células Hela y NHBE (FIG. 11A y FIG. 12). También se observó un aumento en el índice oncolítico cuando se realizó el mismo experimento en una línea celular de cáncer alternativa, H460 (carcinoma de pulmón de células grandes). La adición de Ad5-156R a las células infectadas con Ad5wt también tuvo un efecto de mejora en la replicación viral (FIG. 11A). Ad5-156R se transfectó en células coinfectadas con el virus ONYX-015, que carece por completo del gen E1B-156R. La adición de Ad-156R aumentó la OI del ONYX-015 más de 5 veces en el punto temporal de 48 hpi (FIG. 11B y FIG. 12). De manera similar, la adición de Ad5-156R a las células infectadas con Ad2 aumentó la OI en 15 veces. Los serotipos de adenovirus de la misma subfamilia tienen una diferencia muy pequeña en la secuencia de proteínas en comparación (FIG. 13). El miembro de la familia de adenovirus más cercano a Ad5 es Ad2. La adición de Ad2-156R a las células infectadas con Ad5wt aumentó la OI casi el triple.

Discusión

[0129] Se descubrió pronto que el ARN expresado a partir de la región del gen de adenovirus E1B tenía un patrón de empalme complejo. El ARN de longitud completa de 2,28 kb es policistrónico y tiene dos marcos de lectura superpuestos. El uso alternativo de un sitio de inicio de traducción de flujo descendente temprano fuerte o débil produce E1B-19k y E1B-55k, respectivamente (Perricaudet, Akusjarvi et al. 1979; Bos, Polder et al. 1981). Un donante de empalme común al inicio del ORF de 55 k se usa para empalmar a tres aceptadores de empalme alternativos, 93R SA, 156R SA y 84R SA (Anderson, Schmitt et al. 1984; Virtanen y Pettersson 1985; Anderson, Maude et al. 1987). El 93R AS se empalma fuera de cuadro con el ORF de 55 k agregando un término C de 15 aminoácidos. El 156R AS se empalma en el marco con E1B-55k eliminando los 340 aminoácidos medios. El 84R SA es un sitio de flujo descendente que agrega 6 aminoácidos al término N común.

[0130] Al crear un gran conjunto de virus modificados genéticamente en base a la cepa pTG3602 de adenovirus de tipo salvaje, un clon viral se mutó en una posición de un solo nucleótido (SNP) en la región del gen E1B-55k. La mutación se realizó dentro de la secuencia del aceptor de empalme de E1B-93R, o más precisamente, cambió el sitio putativo de cag/ga a cGg/ga. La mutación no solo cambió el sitio de empalme, sino que también cambió el aminoácido E1B-55k 400 de una arginina a una glicina. Este virus ha sido nombrado Ixovex. Hemos caracterizado este virus cuando se trata del potencial oncolítico, es decir, la retención de la capacidad de replicación y la citotoxicidad en las células cancerosas mientras se inhibe en ambas cuentas en las células normales.

[0131] Nuestros resultados muestran que la mutación conduce a una falta de la proteína E1B-55K expresada en las células infectadas (FIG. 3). Creemos que esto se debe a que el cambio de aminoácidos desestabiliza la proteína E1B-55k. Otros han introducido cambios de aminoácidos en E1B-55k y varios de ellos hicieron que el nivel de proteína fuera inestable. Además, nuestra mutación cambia un importante nucleótido en el sitio 93R aceptor de empalme E1B-55k, lo que anula el empalme a ese sitio de empalme particular (FIG. 4). Para compensar, el empalme parece ser redirigido al aceptor de empalme E1B-156R. Con la falta de E1B-55k en la infección, la capacidad de Ixovex para inhibir la expresión de p53 se reduce considerablemente (FIG. 5). El nivel reducido de p53 inducido por Ixovex en células A549, es decir, las células están menos afectadas, por lo tanto, se expresa menos p53. Alternativamente, y lo que creemos, el aumento del empalme al aceptor de empalme 156R (FIG. 4) también puede aumentar la expresión de la proteína E1B-156R. El empalme 156R empalma en marco con la parte C-(carboxi)-terminal de E1B-55k. Esto elimina los 340 aminoácidos del medio, dejando los 78 aminoácidos C-terminales fusionados con los aminoácidos N-(amino)-terminal 79. El laboratorio de Dobner ha demostrado (Sieber y Dobner 2007) que la proteína E1B-156R conserva cierta capacidad para inhibir la p53 a través de su extremo C-terminal. También es posible que E1B-156R retenga otras funciones de la proteína E1B-55k. La proteína E1B-55k y E1B-156R interactúa con muchos factores similares (Sieber y Dobner 2007; Schreiner, Wimmer et al. 2010; Schreiner, Wimmer et al. 2011; Wimmer, Blanchette et al. 2012). A E1B-55k se le han asignado varias funciones además de mediar la degradación de p53. También está relacionado con la regulación de la exportación nuclear selectiva de ARN viral tardío (Dobner y Kzhyshkowska 2001; Flint y González 2003) e inhibe la traducción del ARN celular mientras promueve la traducción del ARN viral (Blackford y Grand 2009). Las funciones principales de E1B-55k están mediadas cuando la proteína está en complejo con otra proteína viral, la E4orf6. Curiosamente, se ha demostrado que la proteína E1B-156R interactúa con la proteína E4orf6 (Sieber y Dobner 2007). El E1B-156R puede compensar algunas de estas funciones, que se ajustan al aumento de la expresión de E1B-156R de Ixovex.

[0132] En las células normales, la toxicidad de cada virus reflejó en gran parte la respectiva capacidad de replicación. La falta de toxicidad y el cierre casi completo de la replicación en células normales indican un sorprendente perfil de seguridad de Ixovex. El hecho de que el virus Onyx-015 se replique mejor en células normales que en Ixovex es intrigante, ya que la eliminación que conlleva el virus Onyx-015 elimina todas las posibilidades de expresar las proteínas E1B-55k, -93R y -156R (Barker y Berk, 1987). Esto indica que es el desequilibrio de expresión en la región E1B que tuvo un impacto extenso en la atenuación de Ixovex en células normales en comparación con los otros virus. Curiosamente, la diferencia en la replicación en las células normales entre Onyx-015 y Ixo-ctrl por un lado y Ixovex por el otro no se observó en las células cancerosas. Esto indica que la infección por Ixovex en las células normales se ha vuelto no permisiva, es decir, es probable que haya un bloqueo importante al principio de la infección, lo que le da tiempo a las células para eliminar el virus, mientras que el estado transformado de las células cancerosas compensa la falta de algunas función(es) E1B-55k.

[0133] El efecto de la expresión de E1B desequilibrada en las células cancerosas era diferente dependiendo de la línea celular de cáncer. La citotoxicidad de Ixovex en las dos líneas celulares altamente permisivas para la replicación H1299 y H460 fue baja, mientras que la citotoxicidad fue alta en las líneas celulares atenuadas para la replicación, A549 y HeLa. La razón de esto es probablemente debido a la toxicidad, las células murieron antes de producir un alto número de virus.

[0134] La familia de adenovirus se divide en 7 géneros, llamado AG, con un total de más de 65 serotipos diferentes. El serotipo 5 (Ad5) pertenece a los géneros C. Creemos que el patrón de empalme observado en Ad5 se conserva entre todos los serotipos de adenovirus y que el desequilibrio a través de la mutación del sitio de empalme que causa una oncoselectividad muy ventajosa para Ad5 se reflejaría en la mayoría, si no en todos los otros serotipos. Nuestros experimentos preliminares muestran patrones de empalme similares en virus representativos de cada uno de los diferentes géneros (A-Ad12, B1-Ad3, B2-Ad11, C-Ad5, D-Ad37, E-Ad4 y F-Ad40).

[0135] La mayor eficacia global del virus Ad5wt a todos los otros virus es probablemente debido a la cepa de tipo salvaje pTG3602 (Oberg, Yanover et al. 2010), utilizado como columna vertebral del genoma para Ixovex y Ixo-ctrl. Esta columna vertebral transporta algunas mutaciones puntuales dispersas por todo el genoma. Nuestro virus Ixo-ctrl es en realidad pTG3602 en esencia. El SNP en Ixovex se revertió al estado de tipo salvaje que produce el virus Ixo-ctrl. En los numerosos experimentos en los que se ha empleado pTG3602, se ha observado una eficacia inferior constante, en comparación con el Ad5wt.

[0136] Una ventaja adicional de Ixovex en comparación con los vectores de adenovirus patentados de enfoque similar es que el Onyx-015 (Heise, Sampson-Johannes et al. 1997), -051 y -053 (Shen, Kitzes et al. 2001) todos faltan la región del gen E3B del virus. Esta región se eliminó originalmente para mejorar el perfil de seguridad de Onyx-015. Más tarde, se descubrió que la eliminación de esta región hacía que el vector se eliminara prematuramente del tumor mediante la defensa inmune (Wang, Hallden et al. 2003).

[0137] A través del análisis de transferencia Western en infecciones en células H1299 se demostró que Ixovex se replica y expresa proteínas virales al mismo nivel que Ad5wt. La única diferencia entre los virus se observó al usar un anticuerpo específico para la región N-terminal de E1B-55k (ratón-m2A6), un aumento drástico en la espliceoforma E1B-156R de la proteína E1B-55k (FIG. 10). Decidimos realizar una serie de experimentos de complementación para verificar si de hecho un aumento en E1B-156R podría ser responsable del aumento en el Índice Oncolítico (OI). En las figuras 11A, B y C y en la FIG. 12, mostramos que el adenovirus tipo 5 E1B-156R es un potente potenciador de el OI en el grupo C de la subfamilia. El equivalente E1B-156R de Ad2wt también demostró tener un efecto positivo en el OI de Ad5wt. Curiosamente, la adición de Ad5-156R a las células H460 infectadas con Ad5wt aumentó la replicación del virus, lo que estuvo en línea con el nivel de replicación mucho mayor de Ixovex en comparación con el virus ONYX-015 (que carece del gen E1B-156R) en las células H460 (Ver Figura 6).

[0138] Es importante señalar que estos experimentos, en los que E1B-156r se complementa a las células infectadas por virus no se parece completamente la infección con Ixovex u otro virus modificado que expresa E1B-156r. Por ejemplo, durante la infección viral con Ixovex Ad5-156R los niveles aumentan cuando el virus se replica, es decir, la cantidad de la plantilla de expresión (ADN viral) aumenta. En contraste, en los experimentos de complementación, el E1B-156R se proporciona a un nivel de plantilla constante, es decir, a medida que las células continúan dividiéndose durante la fase temprana de la infección, el plásmido que alberga el gen E1B-156R se diluye. Por lo tanto, cuando el virus comience a replicar la expresión de E1B-156R no aumentará exponencialmente (como sería el caso de una copia viral). Sin embargo, estos experimentos muestran claramente que la adición de E1B-156R tiene el efecto de aumentar el índice oncolítico y sugiere que E1B-156R es responsable de este efecto.

Referencias

[0139]

- Anderson, C. W., R. C. Schmitt, et al. (1984). "Early region 1B of adenovirus 2 encodes two coterminal proteins of 495 and 155 amino acid residues." *Journal of virology* 50(2): 387-396.
- Anderson, R. E., M. B. Maude, et al. (1987). "Abnormal plasma levels of polyunsaturated fatty acid in autosomal dominant retinitis pigmentosa." *Experimental eye research* 44(1): 155-159.
- Barker, D. D. and A. J. Berk (1987). "Adenovirus proteins from both E1B reading frames are required for transformation of rodent cells by viral infection and DNA transfection." *Virology* 156(1): 107-121.
- Beatty, M. S. and D. T. Curiel (2012). "Adenovirus strategies for tissue-specific targeting." *Advances in cancer research* 115: 39-67.
- Blackford, A. N. and R. J. Grand (2009). "Adenovirus E1B 55-kilodalton protein: multiple roles in viral infection and cell transformation." *Journal of virology* 83(9): 4000-4012.
- Bos, J. L., L. J. Polder, et al. (1981). "The 2.2 kb E1b mRNA of human Ad12 and Ad5 codes for two tumor antigens starting at different AUG triplets." *Cell* 27(1 Pt 2): 121-131.
- Bradshaw, A. C. and A. H. Baker (2012). "Gene therapy for cardiovascular disease: Perspectives and potential." *Vascular pharmacology*.

Bradshaw, A. C., L. Coughlan, et al. (2012). "Biodistribution and inflammatory profiles of novel penton and hexon double-mutant serotype 5 adenoviruses." *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*.

5 Dobner, T. and J. Kzhyshkowska (2001). "Nuclear export of adenovirus RNA." *Current topics in microbiology and immunology* 259: 25-54.

Flint, S. J. and R. A. Gonzalez (2003). "Regulation of mRNA production by the adenoviral E1B 55-kDa and E4 Orf6 proteins." *Current topics in microbiology and immunology* 272: 287-330.

Heise, C., A. Sampson-Johannes, et al. (1997). "ONYX-015, an E1B gene-attenuated adenovirus, causes tumorspecific cytolysis and antitumoral efficacy that can be augmented by standard chemotherapeutic agents." *Nature medicine* 3(6): 639-645.

10 Nasz, I., E. Adam, et al. (2001). "Alternate adenovirus type-pairs for a possible circumvention of host immune response to recombinant adenovirus vectors." *Acta microbiologica et immunologica Hungarica* 48(2): 143-146.

Oberg, D., E. Yanover, et al. (2010). "Improved potency and selectivity of an oncolytic E1ACR2 and E1B19K deleted adenoviral mutant in prostate and pancreatic cancers." *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 16(2): 541-553.

15 Perricaudet, M., G. Akusjarvi, et al. (1979). "Structure of two spliced mRNAs from the transforming region of human subgroup C adenoviruses." *Nature* 281(5733): 694-696.

Schreiner, S., P. Wimmer, et al. (2011). "Adenovirus type 5 early region 1B 55K oncoprotein-dependent degradation of cellular factor Daxx is required for efficient transformation of primary rodent cells." *Journal of virology* 85(17): 8752-8765.

20 Schreiner, S., P. Wimmer, et al. (2010). "Proteasome-dependent degradation of Daxx by the viral E1B-55K protein in human adenovirus-infected cells." *Journal of virology* 84(14): 7029-7038.

Shen, Y., G. Kitzes, et al. (2001). "Analyses of single-amino-acid substitution mutants of adenovirus type 5 E1B-55K protein." *Journal of virology* 75(9): 4297-4307.

25 Sieber, T. and T. Dobner (2007). "Adenovirus type 5 early region 1B 156R protein promotes cell transformation independently of repression of p53-stimulated transcription." *Journal of virology* 81(1): 95-105.

Virtanen, A. and U. Pettersson (1985). "Organization of early region 1B of human adenovirus type 2: identification of four differentially spliced mRNAs." *Journal of virology* 54(2): 383-391.

30 Wang, Y., G. Hallden, et al. (2003). "E3 gene manipulations affect oncolytic adenovirus activity in immunocompetent tumor models." *Nature biotechnology* 21(11): 1328-1335.

Wimmer, P., P. Blanchette, et al. (2012). "Cross-talk between phosphorylation and SUMOylation regulates transforming activities of an adenoviral oncoprotein." *Oncogene*.

35 LISTADO DE SECUENCIAS

[0140]

- 40 <110> Ixogen Ltd
- <120> Improved Oncolytic Viruses
- <130> P060739WO
- 45 <141> 2013-11-29
- <150> GB1221590.1
- <151> 2012-11-30
- 50 <160> 41
- <170> SeqWin2010, versión 1.0
- <210> 1
- 55 <211> 2330
- <212> ADN
- <213> Adenovirus
- 60 <400> 1

ES 2 731 528 T3

5 atggaggctt gggagtgttt ggaagattht tctgctgtgc gtaacttgct ggaacagagc 60
tctaacagta cctcttggtt ttggaggtht ctgtggggct catcccaggc aaagttagtc 120
tgcagaatta aggaggatta caagtgggaa tttgaagagc ttttgaatc ctgtggtgag 180
ctgthttgatt cthttgaatct gggtcaccag gcgctthttcc aagagaaggt catcaagact 240
ttggatthtt ccacaccggg gcgctgtgct gctgctgttg cthttttgag thttataaaag 300
gataaatgga gcaagaaac ccatctgagc ggggggtacc tgctggattt tctggccatg 360
catctgtgga gagcggtht gagacacaag aatcgctgc tactgttgct tcccgccgc 420
10 ccggcgataa taccgacgga ggagcagcag cagcagcagg aggaagccag gcggcggcgg 480
caggagcaga gcccatgga cccgagagcc ggctggacc ctcggaatg aatgthtac 540
aggtggctga actgtatcca gaactgagac gcathttgac aattacagag gatgggcagg 600
ggctaaaggg ggtaaagagg gagcgggggg cthtgtaggc tacagaggag gctaggaatc 660
15 tagctthtag cthaatgacc agacaccgct ctgagtgat tactthtcaa cagatcaagg 720
ataattgcgc taatgagctt gatctgctgg cgcagaagta thccatagag cagctgacca 780
cttactggct gcagccaggg gatgathttg aggaggctat tagggtatat gcaaaggtg 840
cacttaggcc agattgcaag tacaagatca gcaaactgt aatatcagg aatgthtgc 900
20 acathttctg gaacggggcc gaggtggaga tagatacggg gataggggtg gcctthtagat 960
gtagcatgat aatatgtgg ccgggggtgc thggcatgga cggggtggtt attatgaatg 1020
taaggthtac tggcccaat thtagcggta cgtthttcct ggccaatacc aacctatcc 1080
25 tacacggtg aagctthctat gggthtaaca atacctgtg ggaagcctg accgatgaa 1140
gggttcgggg ctgtgcctth tactgctgct ggaagggggg ggtgtgctgc cccaaaagca 1200
gggctthcaat taagaaatgc ctthttgaaa ggtgtacctt gggatcctg tctgagggt 1260
actccagggt gcgccacaat gtggcctccg actgtggtht cthcatgcta gtgaaaagcg 1320
30 tggctgtgat taagcataac atggtatgtg gcaactgcga ggacagggcc tctcagatgc 1380
tgacctgctc ggacggcaac tgtcacctgc tgaagaccat tcacgtagcc agccactctc 1440
gcaaggcctg gccagtgtth gagcataaca tactgaccg ctgttcctg cattgggta 1500
acaggagggg ggtgttccta ccttaccat gcaathttg tcacactaag atattgctg 1560
35 agcccgagag catgtccaag gtgaacctga acgggtgct tgacatgacc atgaagatct 1620
ggaaggtgct gaggtacgat gagaccgca ccagggtcag accctgcgag tgtggcgta 1680
aacatathag gaaccagcct gtgatgctg atgtgaccga ggagctgagg cccgatcact 1740
40 ttggtgctggc ctgcaccgc gctgagtht gctctagcga tgaagataca gattgaggta 1800
ctgaaatgtg tggcgctggc thagggtgg gaaagaatat aaaggtggg ggtcttatg 1860
agthttgtat ctgthttgca gcagcccgcc ccgcatgag caccactcg thtgatgga 1920
gcattgtgag ctcatatht acaacgcgca tgccccatg ggccggggg cgtcagaatg 1980
tgatgggctc cagcattgat ggtgccccc tctgcgccgc aaactctact acctgacct 2040
45 acgagaccgt gtctggaacg ccgthggaga ctgcagcctc cgcccgctc tcagccgctg 2100
cagccaccgc ccgcggtatt gtgactgact thgctthcct gagcccgctt gcaagcagtg 2160
cagctthccg thcatccgcc cgcgatgaca agthgacggc thttttggca caatggatt 2220
ctthgaccgg ggaacttht gcgthttctc agcagctgtt ggatctgcgc cagcaggtth 2280
50 ctgccctgaa ggctthcctc cthcccaatg cgtthtaaaa cataaataa 2330

<210> 2
<211> 471
<212> ADN
<213> Adenovirus

55 <400> 2
atggagcgaa gaaaccatc tgagcggggg gtacctgctg gathttctg ccatgcatct 60
gtggagagcg gthgtgagac acaagaatcg cctgctactg thgtcttccg tccgcccggc 120
60 gataataccg acggaggagc agcagcagca gcaggaggaa gccaggcggc gcggcagga 180
gcagagccca tggaaaccga gagccggcct ggaccctcg gaatgaatgt tgtacagccc 240
gagagcatgt ccaaggtgaa cctgaacggg gtgthtgaca tgaccatgaa gatctggaag 300
gtgctgaggt acgatgagc ccgaccagc tgcagaccct gcgagtggtg cggtaaacat 360
attaggaacc agcctgtgat gctggatgtg accgaggagc tgaggcccga tcacttggtg 420
65 ctggcctgca ccgctgctga gthtgctct agcagatgaa atacagattg a 471

<210> 3
<211> 156
<212> PRT
<213> Adenovirus

70
75

ES 2 731 528 T3

<400> 3
 Met Glu Arg Arg Asn Pro Ser Glu Arg Gly Val Pro Ala Gly Phe Ser
 1 5 10 15
 5
 Gly His Ala Ser Val Glu Ser Gly Cys Glu Thr Gln Glu Ser Pro Ala
 20 25 30
 10
 Thr Val Val Phe Arg Pro Pro Gly Asp Asn Thr Asp Gly Gly Ala Ala
 35 40 45
 15
 Ala Ala Ala Gly Gly Ser Gln Ala Ala Ala Ala Gly Ala Glu Pro Met
 50 55 60
 20
 Glu Pro Glu Ser Arg Pro Gly Pro Ser Gly Met Asn Val Val Gln Pro
 65 70 75 80
 25
 Glu Ser Met Ser Lys Val Asn Leu Asn Gly Val Phe Asp Met Thr Met
 85 90 95
 30
 Lys Ile Trp Lys Val Leu Arg Tyr Asp Glu Thr Arg Thr Arg Cys Arg
 100 105 110
 35
 Pro Cys Glu Cys Gly Gly Lys His Ile Arg Asn Gln Pro Val Met Leu
 115 120 125
 40
 Asp Val Thr Glu Glu Leu Arg Pro Asp His Leu Val Leu Ala Cys Thr
 130 135 140
 45
 Arg Ala Glu Phe Gly Ser Ser Asp Glu Asp Thr Asp
 145 150 155

<210> 4
 <211> 1491
 <212> ADN
 <213> Adenovirus

<400> 4
 50 atggagcgaa gaaacccatc tgagcggggg gtacctgctg gattttctgg ccatgcatct 60
 gtggagagcg gttgtgagac acaagaatcg cctgctactg ttgtcttccg tccgcccggc 120
 gataataaccg acggaggagc agcagcagca gcaggaggaa gccaggcggc ggcggcagga 180
 gcagagccca tggaaaccga gagccggcct ggaccctcgg gaatgaatgt tgtacagggtg 240
 gctgaactgt atccagaact gagacgcatt ttgacaatta cagaggatgg gcaggggcta 300
 55 aagggggtaa agagggagcg gggggcttgt gaggctacag aggaggctag gaatctagct 360
 ttagcttaa tgaccagaca ccgtcctgag tgtattactt ttcaacagat caaggataat 420
 tgcgctaata agcttgatct gctggcgag aagtattcca tagagcagct gaccacttac 480
 tggctgcagc caggggatga ttttgaggag gctattaggg tatatgcaaa ggtggcactt 540
 aggccagatt gcaagtacaa gatcagcaaa cttgtaaata tcaggaattg ttgctacatt 600
 60 tctgggaacg gggccgaggt ggagatagat acggaggata ggggtggcctt tagatgtagc 660
 atgataaata tgtggccggg ggtgcttggc atggacgggg tggttattat gaatgtaagg 720
 tttactggcc ccaattttag cggtagcgtt ttcttgcca ataccaacct tatcctacac 780
 ggtgtaagct tctatgggtt taacaatacc tgtgtggaag cctggaccga tgtaagggtt 840
 cggggctgtg ccttttactg ctgctggaag ggggtggtgt gtcgcccga aagcagggtt 900
 tcaattaaga aatgcctctt tgaaagggtg accttgggta tcctgtctga gggtaactcc 960
 65 aggggtgcgc acaatgtggc ctccgactgt ggttgcctca tgctagttaa aagcgtggct 1020
 gtgattaagc ataacatggt atgtggcaac tgcgaggaca gggcctctca gatgctgacc 1080
 tgctcggacg gcaactgtca cctgctgaag accattcacg tagccagcca ctctcgcaag 1140
 gcctggccag tgtttgagca taacatactg acccgctgtt ccttgcattt gggtaacagg 1200
 aggggggtgt tcctacctta ccaatgcaat ttgagtcaca ctaagatatt gcttgagccc 1260
 70 gagagcatgt ccaaggtgaa cctgaacggg gtgtttgaca tgaccatgaa gatctggaag 1320
 gtgctgaggt acgatgagac ccgcaccagg tgcagaccct gcgagtgtgg cggtaaacat 1380
 attaggaacc agcctgtgat gctggatgtg accgaggagc tgaggcccga tcacttgggtg 1440
 ctggcctgca cccgcgctga gtttggctct agcgatgaa atacagattg a 1491

ES 2 731 528 T3

<210> 5
 <211> 496
 <212> PRT
 <213> Adenovirus

5

<400> 5

	Met	Glu	Arg	Arg	Asn	Pro	Ser	Glu	Arg	Gly	Val	Pro	Ala	Gly	Phe	Ser
	1				5					10					15	
10	Gly	His	Ala	Ser	Val	Glu	Ser	Gly	Cys	Glu	Thr	Gln	Glu	Ser	Pro	Ala
				20					25					30		
	Thr	Val	Val	Phe	Arg	Pro	Pro	Gly	Asp	Asn	Thr	Asp	Gly	Gly	Ala	Ala
			35					40					45			
15	Ala	Ala	Ala	Gly	Gly	Ser	Gln	Ala	Ala	Ala	Ala	Gly	Ala	Glu	Pro	Met
		50					55					60				
	Glu	Pro	Glu	Ser	Arg	Pro	Gly	Pro	Ser	Gly	Met	Asn	Val	Val	Gln	Val
20	65					70					75				80	
	Ala	Glu	Leu	Tyr	Pro	Glu	Leu	Arg	Arg	Ile	Leu	Thr	Ile	Thr	Glu	Asp
					85					90					95	
	Gly	Gln	Gly	Leu	Lys	Gly	Val	Lys	Arg	Glu	Arg	Gly	Ala	Cys	Glu	Ala
25				100					105					110		
	Thr	Glu	Glu	Ala	Arg	Asn	Leu	Ala	Phe	Ser	Leu	Met	Thr	Arg	His	Arg
			115					120					125			
30	Pro	Glu	Cys	Ile	Thr	Phe	Gln	Gln	Ile	Lys	Asp	Asn	Cys	Ala	Asn	Glu
		130					135					140				
	Leu	Asp	Leu	Leu	Ala	Gln	Lys	Tyr	Ser	Ile	Glu	Gln	Leu	Thr	Thr	Tyr
	145					150					155					160
35	Trp	Leu	Gln	Pro	Gly	Asp	Asp	Phe	Glu	Glu	Ala	Ile	Arg	Val	Tyr	Ala
					165					170					175	
	Lys	Val	Ala	Leu	Arg	Pro	Asp	Cys	Lys	Tyr	Lys	Ile	Ser	Lys	Leu	Val
40				180					185					190		
	Asn	Ile	Arg	Asn	Cys	Cys	Tyr	Ile	Ser	Gly	Asn	Gly	Ala	Glu	Val	Glu

45

50

55

60

ES 2 731 528 T3

	195					200					205					
	Ile	Asp	Thr	Glu	Asp	Arg	Val	Ala	Phe	Arg	Cys	Ser	Met	Ile	Asn	Met
	210						215					220				
5	Trp	Pro	Gly	Val	Leu	Gly	Met	Asp	Gly	Val	Val	Ile	Met	Asn	Val	Arg
	225					230					235					240
	Phe	Thr	Gly	Pro	Asn	Phe	Ser	Gly	Thr	Val	Phe	Leu	Ala	Asn	Thr	Asn
10					245					250					255	
	Leu	Ile	Leu	His	Gly	Val	Ser	Phe	Tyr	Gly	Phe	Asn	Asn	Thr	Cys	Val
				260					265						270	
	Glu	Ala	Trp	Thr	Asp	Val	Arg	Val	Arg	Gly	Cys	Ala	Phe	Tyr	Cys	Cys
15			275					280					285			
	Trp	Lys	Gly	Val	Val	Cys	Arg	Pro	Lys	Ser	Arg	Ala	Ser	Ile	Lys	Lys
	290						295					300				
	Cys	Leu	Phe	Glu	Arg	Cys	Thr	Leu	Gly	Ile	Leu	Ser	Glu	Gly	Asn	Ser
20	305					310					315					320
	Arg	Val	Arg	His	Asn	Val	Ala	Ser	Asp	Cys	Gly	Cys	Phe	Met	Leu	Val
				325						330					335	
25	Lys	Ser	Val	Ala	Val	Ile	Lys	His	Asn	Met	Val	Cys	Gly	Asn	Cys	Glu
				340					345					350		
	Asp	Arg	Ala	Ser	Gln	Met	Leu	Thr	Cys	Ser	Asp	Gly	Asn	Cys	His	Leu
			355					360					365			
30	Leu	Lys	Thr	Ile	His	Val	Ala	Ser	His	Ser	Arg	Lys	Ala	Trp	Pro	Val
	370						375					380				
	Phe	Glu	His	Asn	Ile	Leu	Thr	Arg	Cys	Ser	Leu	His	Leu	Gly	Asn	Arg
35	385					390					395					400
	Arg	Gly	Val	Phe	Leu	Pro	Tyr	Gln	Cys	Asn	Leu	Ser	His	Thr	Lys	Ile
				405						410					415	
	Leu	Leu	Glu	Pro	Glu	Ser	Met	Ser	Lys	Val	Asn	Leu	Asn	Gly	Val	Phe
40				420					425					430		
	Asp	Met	Thr	Met	Lys	Ile	Trp	Lys	Val	Leu	Arg	Tyr	Asp	Glu	Thr	Arg
			435					440					445			
45	Thr	Arg	Cys	Arg	Pro	Cys	Glu	Cys	Gly	Gly	Lys	His	Ile	Arg	Asn	Gln
	450						455					460				
	Pro	Val	Met	Leu	Asp	Val	Thr	Glu	Glu	Leu	Arg	Pro	Asp	His	Leu	Val
	465					470					475					480
50	Leu	Ala	Cys	Thr	Arg	Ala	Glu	Phe	Gly	Ser	Ser	Asp	Glu	Asp	Thr	Asp
					485					490					495	

<210> 6

<211> 282

55 <212> ADN

<213> Adenovirus

<400> 6

60

ES 2 731 528 T3

atggagcgaa gaaacccatc tgagcggggg gtacctgctg gattttctgg ccatgcatct 60

5 gtggagagcg gttgtgagac acaagaatcg cctgctactg ttgtcttccg tccgcccggc 120
 gataataccg acggaggagc agcagcagca gcaggaggaa gccaggcggc ggcggcagga 180
 gcagagccca tggaaccgga gagccggcct ggaccctcgg gaatgaatgt tgtacaggag 240
 gggggtgttc ctaccttacc aatgcaatth gagtcacact aa 282

10 <210> 7
 <211> 93
 <212> PRT
 <213> Adenovirus

15 <400> 7

Met	Glu	Arg	Arg	Asn	Pro	Ser	Glu	Arg	Gly	Val	Pro	Ala	Gly	Phe	Ser
1				5					10					15	
Gly	His	Ala	Ser	Val	Glu	Ser	Gly	Cys	Glu	Thr	Gln	Glu	Ser	Pro	Ala
			20					25					30		
Thr	Val	Val	Phe	Arg	Pro	Pro	Gly	Asp	Asn	Thr	Asp	Gly	Gly	Ala	Ala
			35				40					45			
Ala	Ala	Ala	Gly	Gly	Ser	Gln	Ala	Ala	Ala	Ala	Gly	Ala	Glu	Pro	Met
			50			55					60				
Glu	Pro	Glu	Ser	Arg	Pro	Gly	Pro	Ser	Gly	Met	Asn	Val	Val	Gln	Glu
65					70					75					80
Gly	Gly	Val	Pro	Thr	Leu	Pro	Met	Gln	Phe	Glu	Ser	His			
				85					90						

35 <210> 8
 <211> 255
 <212> ADN
 <213> Adenovirus

40 <400> 8

atggagcgaa gaaacccatc tgagcggggg gtacctgctg gattttctgg ccatgcatct 60
 gtggagagcg gttgtgagac acaagaatcg cctgctactg ttgtcttccg tccgcccggc 120
 gataataccg acggaggagc agcagcagca gcaggaggaa gccaggcggc ggcggcagga 180
 gcagagccca tggaaccgga gagccggcct ggaccctcgg gaatgaatgt tgtacagcag 240
 45 cgcggccgc catga 255

50 <210> 9
 <211> 84
 <212> PRT
 <213> Adenovirus

55 <400> 9

Met	Glu	Arg	Arg	Asn	Pro	Ser	Glu	Arg	Gly	Val	Pro	Ala	Gly	Phe	Ser
1				5					10					15	
Gly	His	Ala	Ser	Val	Glu	Ser	Gly	Cys	Glu	Thr	Gln	Glu	Ser	Pro	Ala
			20					25					30		
Thr	Val	Val	Phe	Arg	Pro	Pro	Gly	Asp	Asn	Thr	Asp	Gly	Gly	Ala	Ala
			35				40					45			
Ala	Ala	Ala	Gly	Gly	Ser	Gln	Ala	Ala	Ala	Ala	Gly	Ala	Glu	Pro	Met
			50			55					60				
Glu	Pro	Glu	Ser	Arg	Pro	Gly	Pro	Ser	Gly	Met	Asn	Val	Val	Gln	Gln
65					70					75					80
Pro	Pro	Pro	Pro												

<210> 10
 <211> 13
 <212> ADN
 <213> Adenovirus
 5
 <400> 10
 caggtaggctg aac 13
 <210> 11
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Adenovirus
 10
 <400> 11
 tccttgatt tggtaacag gag 23
 15
 <210> 12
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Adenovirus
 20
 <400> 12
 acactaagat attgcttgag ccc 23
 25
 <210> 13
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Adenovirus
 30
 <400> 13
 gtcttatgta gttttgatc tgttttgcag cag 33
 <210> 14
 <211> 13
 <212> ADN
 <213> Adenovirus
 35
 <400> 14
 gaggtactga aat 13
 40
 <210> 15
 <211> 44
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 15
 ccacctcgag ttaattaaca tcatcaataa tataccttat tttg 44
 50
 <210> 16
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 55
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 16
 gtgggttaa acggattgg tcagggaataa catg 34
 60
 <210> 17
 <211> 46
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 65

<220>
 <223> Cebador
 5 <400> 17
 ccttgcatth gggtaataga agaggagtgt tcctacctta ccaatg 46
 <210> 18
 <211> 46
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 15 <400> 18
 cattggaag gtaggaacac tcctcttcta ttacccaaat gcaagg 46
 <210> 19
 <211> 36
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 25 <400> 19
 cttgcatttg ggaacagga ggggggtgtt cctacc 36
 30 <210> 20
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> Cebador
 <400> 20
 40 gtaggaaca cccccctct gttacccaaa tgcaag 36
 <210> 21
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> Cebador
 <400> 21
 50 ctaagatatt gctggaaccc gagagcatgt cc 32
 <210> 22
 <211> 32
 <212> ADN
 55 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 60 <400> 22
 ggacatgctc tcgggtcca gcaatatctt ag 32
 <210> 23
 <211> 28
 65 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador
 5 <400> 23
 catttgggta acagaagagg ggtgtcc 28
 <210> 24
 <211> 28
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 15 <400> 24
 ggaacacccc tcttctgta cccaatg 28
 <210> 25
 <211> 33
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 25 <400> 25
 gaatgaatgt tgtacaagtc gctgaactgt atc 33
 30 <210> 26
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> Cebador
 <400> 26
 40 gatacagttc agcgactgt acaacattca ttc 33
 <210> 27
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> Cebador
 <400> 27
 50 gttgctgaac tgtatccata actgagacgc attttg 36
 <210> 28
 <211> 36
 <212> ADN
 55 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 60 <400> 28
 caaatgcgt ctgattatg gatacagttc agccac 36
 <210> 29
 <211> 21
 65 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador
 5 <400> 29
 gcctgctact gttgtcttc g 21
 <210> 30
 <211> 19
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 15 <400> 30
 cacccccctc ctgtacaac 19
 <210> 31
 <211> 23
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 25 <400> 31
 gacatgctct cgggctgtac aac 23
 <210> 32
 <211> 20
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 35 <400> 32
 caaacgagtt ggtgctcatg 20
 <210> 33
 <211> 38
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 45 <400> 33
 ctcgaggaat tcgccacat ggagcgaaga aacccatc 38
 <210> 34
 <211> 33
 55 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 60 <400> 34
 cacttctaga tcaatctgta tcttcatcgc tag 33
 <210> 35
 <211> 20
 65 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador
 5 <400> 35
 ggagatttgg acggtcttgg 20
 <210> 36
 <211> 21
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 15 <400> 36
 ggatcccatc acattttgac g 21
 <210> 37
 <211> 19
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 25 <400> 37
 catccatgga ggtttggc 19
 30 <210> 38
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> Cebador
 <400> 38
 ccttaaaaga agcgtttcca c 21
 40 <210> 39
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> Cebador
 <400> 39
 catttgggta acgggagggg ggtgtcc 28
 50 <210> 40
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 55 <220>
 <223> Cebador
 <400> 40
 ggaacacccc cctcccgtta cccaaatg 28
 60 <210> 41
 <211> 35938
 <212> ADN
 <213> Adenovirus
 65

ES 2 731 528 T3

<400> 41

	catcatcaat	aatatacctt	atdddggatt	gaagccaata	tgataatgag	gggggtggagt	60
5	ttgtgacgtg	gcgcgggggcg	tgggaacggg	gcggggtgacg	tagtagtggtg	gcggaagtgt	120
	gatggtgcaa	gtgtggcgga	acacatgtaa	gcgacgggatg	tggcaaaagt	gacgtttttg	180
	gtgtgcgccg	gtgtacacag	gaagtgacaa	ttttcgcgcg	gttttagggcg	gatggtgtag	240
	taaatttggg	cgtaaccgag	taagatttgg	ccattttcgc	gggaaaactg	aataagagga	300
10	agtgaaatct	gaataatttt	gtgttactca	tagcgcgtaa	tatttgtcta	gggcccgggg	360
	gactttgacc	gtttacgtgg	agactcgccc	agggtgtttt	ctcaggtggt	ttccgcttc	420
	cgggtcaaaag	ttggcggttt	attattatag	tcagctgacg	tgtagtgtat	ttatacccgg	480
	tgagttcctc	aagaggccac	tcttgagtgc	cagcgagtag	agttttctcc	tccgagccgc	540
	tccgacaccg	ggactgaaaa	tgagacatat	tatctgccac	ggaggtgtta	ttaccgaaga	600
15	aatggccgcc	agtcttttgg	accagctgat	cgaagaggta	ctggctgata	atcttccacc	660
	tccatagccat	tttgaaccac	ctacccttca	cgaactgtat	gatttagacg	tgacggcccc	720
	cgaagatccc	aacgaggagg	cggtttcgca	gatttttccc	gactctgtaa	tgttggcggt	780
	gcaggaaggg	attgacttac	tcacttttcc	gccggcgccc	ggttctccgg	agccgcctca	840
	cctttcccgg	cagcccgagc	agcccggagca	gagagccttg	ggtccggttt	ctatgcaaaa	900
20	ccttgtaccg	gaggtgatcg	atcttacctg	ccacgaggct	ggctttccac	ccagtgcgca	960
	cgaggatgaa	gagggtgagg	agtttgtggt	agattatgtg	gagcaccocg	ggcacggttg	1020
	caggtcctgt	cattatcacc	ggaggaatac	gggggaccca	gatattatgt	gttcgctttg	1080
	ctatatgagg	acctgtggca	tgtttgtcta	cagtaagtga	aaattatggg	cagtgggtga	1140
25	tagagtgggtg	ggtttgggtg	ggtaattttt	tttttaattt	ttacagtttt	gtggtttaaa	1200
	gaattttgta	ttgtgatttt	tttaaaagggt	cctgtgtctg	aacctgagcc	tgagcccagag	1260
	ccagaaccgg	agcctgcaag	acctaccocg	cgtcctaaaa	tggcgccctg	tatcctgaga	1320
	cgcccagacat	cacctgtgtc	tagagaatgc	aatagtagta	cggatagctg	tgactccgggt	1380
	ccttctaaca	cacctcctga	gatacaccoc	gtgggtcccgc	tgtgccccat	taaaccagtt	1440
30	gccgtgagag	ttggtggggcg	tcgccaggct	gtggaatgta	tcgaggactt	gcttaacgag	1500
	cctgggcaac	ccttggactt	gagctgtaaa	cgcccaggcg	cataagggtg	aaacctgtga	1560
	ttgctgtgtg	ggttaaccgc	tttgtttgct	gaatgagttg	atgtaagttt	aataaagggt	1620
	gagataatgt	ttaacttgca	tggcgtgta	aatggggcgg	ggcttaaagg	gtatataatg	1680
	cgccgtgggc	taatcctggg	tacatctgac	ctcatggagg	cctgggagtg	tttgggaagat	1740
35	ttttctgctg	tgcgtaactt	gctggaacag	agctctaaca	gtacctcttg	gttttggagg	1800
	tttctgtggg	gctcatocca	ggcaaagtta	gtctgcagaa	ttaaggagga	ttacaagtgg	1860
	gaatttgaag	agcttttgaa	atcctgtggg	gagctgtttg	attccttgaa	tctgggtcac	1920
	cagggcgcttt	tccaagagaa	ggatcatcaag	actttggatt	ttccacacc	ggggcgcgct	1980
	gcggctgctg	ttgctttttt	gagttttata	aaggataaat	ggagcgaaga	aaccatctg	2040
40	agcgggggggt	acctgctgga	ttttctggcc	atgcatctgt	ggagagcggg	tgtgagacac	2100
	agaatcgcc	tgctactggt	gtcttccgct	cgcccggcga	taataccgac	ggaggagcag	2160
	cagcagcagc	aggaggaagc	cagggcggcg	cggcaggagc	agagcccacg	gaaccocgaga	2220
	gccggcctgg	accctcgga	atgaatggtg	tacaggtggc	tgaactgtat	ccagaactga	2280
45	gacgcatttt	gacaattaca	gaggatgggc	aggggctaaa	gggggtaaag	agggagcggg	2340
	gggcttgtga	ggctacagag	gaggctagga	atctagcttt	tagcttaatg	accagacacc	2400
	gtcctgagtg	tattactttt	caacagatca	aggataattg	cgctaagtgg	cctgatctgc	2460
	tggcgcagaa	gtattccata	gagcagctga	ccacttactg	gctgcagcca	ggggatgatt	2520
	ttgaggaggc	tattagggtg	tatgcaaagg	tggcacttag	gccagattgc	aagtacaaga	2580
50	tcagcaaaact	tgtaaatatc	aggaattggt	gctacatttc	tgggaacggg	gccgaggtgg	2640

55

60

65

	agatagatac	ggaggatagg	gtggccttta	gatgtagcat	gataaatatg	tggccggggg	2700
	tgcttggcat	ggacgggggtg	gttattatga	atgtaagggt	tactggcccc	aatttttagcg	2760
	gtacggtttt	cctggccaat	accaacctta	tcctacacgg	tgtaagcttc	tatgggttta	2820
	acaatacctg	tgtggaagcc	tggaccgatg	taagggttcg	gggctgtgcc	ttttactgct	2880
5	gctggaaggg	ggtggtgtgt	cgccccaaaa	gcagggcttc	aattaagaaa	tgcctctttg	2940
	aaagggtgtac	cttgggtatc	ctgtctgagg	gtaactccag	ggtgcccac	aatgtggcct	3000
	ccgactgtgg	ttgcttcatg	ctagtgaaaa	gcgtggctgt	gattaagcat	aacatgggat	3060
	tgggcaactg	cgaggacagg	gcctctcaga	tgctgacctg	ctcggacggc	aactgtcacc	3120
10	tgctgaagac	cattcacgta	gccagccact	ctcgcaaggc	ctggccagtg	tttgagcata	3180
	acatactgac	ccgctgttcc	ttgcatttgg	gtaacaggag	gggggtgttc	ctaccttacc	3240
	aatgcaatth	gagtcacact	aagatattgc	ttgagcccga	gagcatgtcc	aagggtgaacc	3300
	tgaacgggggt	gtttgacatg	accatgaaga	tctggaagggt	gctgaggtag	gatgagaccc	3360
	gcaccaggtg	cagaccctgc	gagtggtggcg	gtaaacatat	taggaaccag	cctgtgatgc	3420
15	tggatgtgac	cgaggagctg	aggcccgatc	acttgggtgct	ggcctgcacc	cgcgctgagt	3480
	ttggctctag	cgatgaagat	acagattgag	gtactgaaat	gtgtgggctg	ggcttaaggg	3540
	tgggaaagaa	tatataaggt	gggggtctta	tgtagttttg	tatctgtttt	gcagcagccg	3600
	ccgcccgcct	gagcaccaac	tcgtttgatg	gaagcattgt	gagctcatat	ttgacaacgc	3660
	gcatgcccc	atgggcccggg	gtgctgcaga	atgtgatggg	ctccagcatt	gatggtcgcc	3720
20	ccgtcctgcc	cgcaaacctc	actaccttga	cctacgagac	cgtgtctgga	acgccgttgg	3780
	agactgcagc	ctccgcccgc	gcttcagccc	ctgcagccac	cgcccgcggg	attgtgactg	3840
	actttgcttt	cctgagcccc	cttgcaagca	gtgcagcttc	ccgttcatcc	cccgctgatg	3900
	acaagttgac	ggctcttttg	gcacaattgg	attctttgac	ccgggaactt	aatgtcgttt	3960
	ctcagcagct	gttggatctg	cgccagcagg	tttctgccct	gaaggcttcc	tcccctccca	4020
25	atgcggttta	aaacataaat	aaaaaacccag	actctgtttg	gatttggatc	aagcaagtgt	4080
	cttgcctgtct	ttatthtaggg	gttttgccgcg	cgcggtaggc	ccgggaccag	cggtctcggt	4140
	cgttgaggggt	cctgtgtatt	ttttccagga	cgtggtaaag	gtgactctgg	atgctcagat	4200
	acatgggcat	aagcccgtct	ctgggggtgga	ggtagcacca	ctgcagagct	tcatgctgcg	4260
30	gggtggtggt	gtagatgatc	cagtcgtagc	aggagcgctg	ggcgtggtgc	ctaaaaatgt	4320
	ctttcagtag	caagctgatt	gccaggggca	ggcccttgggt	gtaagtgttt	acaaagcgggt	4380
	taagctggga	tgggtgcata	cgtggggata	tgagatgcat	cttggactgt	atthtttaggt	4440
	tggctatggt	cccagccata	tcctccgggg	gattcatggt	gtgcagaacc	accagcagac	4500
	tgtatccgggt	gcacttggga	aatthgtcat	gtagcttaga	aggaaatgcg	tggagaact	4560
35	tggagacgcc	cttgtgacct	ccaagattht	ccatgcattc	gtccataatg	atggcaatgg	4620
	gcccacggggc	ggcggcctgg	gcgaagatat	ttctgggatc	actaacgtca	tagttgtggt	4680
	ccaggatgag	atcgtcatag	gccatthtta	caaagcgcgg	gcggaggggtg	ccagactgcg	4740
	gtataatggt	tccatccggc	ccaggggctg	agttaccctc	acagatthgc	atthcccacg	4800
	ctthtagttc	agatgggggg	atcatgtcta	cctgcggggc	gatgaagaaa	acggthtccg	4860
40	gggtaggggga	gatcagctgg	gaagaaagca	ggttcctgag	cagctgcccac	ttaccgcagc	4920
	cggtggggccc	gtaaatcaca	cctattaccg	ggtgcaactg	gtagttaaga	gagctgcagc	4980
	tgccgtcatc	cctgagcagg	ggggccactt	cgthtaagcat	gtccctgact	cgcatgttht	5040
	ccctgaccaa	atccgcccaga	aggcgctcgc	cgcccagcga	tagcagttct	tgcaaggaaag	5100
45	caaagthttt	caacggthtg	agaccgtccg	cctgaggcat	gctthtgagc	gthtgaccaa	5160
	gcagthtccag	gcgggtcccac	agctcgggtca	ctgtctctac	ggcatctcga	tccagcatat	5220
	ctcctcgtht	cgcggtthtg	ggcggtcttc	gctgtaccggc	agtagtcgggt	gctcgtccag	5280
	acggggccagg	gtcatgtctt	tccacggggc	cagggtcctc	gtcagcgtag	tctgggtcac	5340
	ggtgaagggg	tgcgctccgg	gctgcgcgct	ggccaggggtg	cgcttgaggc	tggctcctgct	5400
50	ggtgctgaag	cgctgccgggt	cttcgccctg	cgctcggcc	aggtagcatt	tgaccatggt	5460
	gtcatagthc	agccccctccg	cgccgtggcc	cttggcgcgc	agcttgccct	tggaggaggc	5520
	gccgcacgag	gggcagtgca	gactthtgag	ggcgtagagc	ttggggcgcga	gaaataccga	5580
	ttccgggggag	taggcatccg	cgccgcaggc	cccgcagacg	gtctcgcatt	ccacgagcca	5640
	ggtgagctct	ggccgttccg	ggtcaaaaac	caggthtccc	ccatgcttht	tgatgcttht	5700
55	cttacctctg	gthtccatga	ggcgggtctc	acgctcgggtg	acgaaaaggc	tgtccgtgtc	5760
	cccgtataca	gacttgagag	gcctgtcctc	gagcgggtgt	ccgcggctct	cctcgtatag	5820
	aaactcggac	cactctgaga	caaaggctcg	cgtccaggcc	agcacgaagg	aggctaagtg	5880
	ggaggggtag	cggtcgttgt	ccactagggg	gtccactcgc	tccaggggtg	gaagacacat	5940
	gtcgcctct	tccgcatcaa	ggaagggtgat	tggthtgtag	gtgtaggcca	cgtgaccggg	6000
60	tgttcttgaa	ggggggctat	aaaagggggt	gggggcgcgt	tctcctcac	tctcttccgc	6060
	atcgtgtct	gagaggcca	gctgtgggg	tgagthtcc	ctctgaaaag	cgggcatgac	6120
	ttctgcgcta	agattgtcag	thtccaaaaa	cgaggaggat	ttgatattca	cctggcccgc	6180
	ggtgatgct	ttgagggtgg	ccgcatccat	ctggtcagaa	aagacaatct	thttgttgtc	6240
	aagcttgggtg	gcaaacgacc	cgtagagggc	gthtgacagc	aacttggcga	tggagcgcag	6300
65	ggtthtggtt	ttgtcgcgat	cgccgcgctc	cttggcccgc	atgthtagct	gcacgtattc	6360
	gcgcgcaacg	caccgccatt	cgggaaagac	ggtggtgccc	tctcggggca	ccagggtgcac	6420

ES 2 731 528 T3

5
 10
 15
 20
 25
 30
 35
 40
 45
 50
 55
 60
 65

```

gcgccaaccg cggttgtgca ggggtgacaag gtcaacgctg gtggctacct ctccgctgag 6480
gcgctcgttg gtccagcaga ggcggccgcc cttgcgcgag cagaatggcg gtagggggtc 6540
tagctgcgctc tcgctccgggg ggtctgcgctc cacggtaaag accccgggca gcaggcgcgc 6600
gtcgaagtag tctatcttgc atccttgcaa gtctagcgcg tgctgccatg cgcgggaggc 6660
aagcgcgcgc tcgtaggggt tgagtggggg accccatggc atgggggtgg tgagcgcgga 6720
ggcgtacatg ccgcaaattg cgtaaacgta gaggggctct ctgagtattc caagatatgt 6780
aggtagcat cttccaccgc ggatgctggc gcgcacgtaa tcgtatagtt cgtcgcaggg 6840
agcagggagg tccggaccga gggtgctacg ggcgggctgc tctgctcgga agactatctg 6900
cctgaagatg gcatgtgagt tggatgatat ggttgacgc tgggaagacgt tgaagctggc 6960
gtctgtgaga cctaccgctg cacgcacgaa ggaggcgtag gagtgcgcga gcttgttgac 7020
cagctcggcg gtgacctgca cgtctagggc gcagtagtcc agggtttccct tgatgatgct 7080
atacttatcc tgtccctttt ttttccacag ctgcgggttg aggacaaact cttcgcggctc 7140
tttccagtag tcttggatcg gaaacccgct gccctccgaa cggtaagagc ctagcatgta 7200
aaactggttg acggcctggt agtcgagca tcccttttct acgggtagcg cgtatgcctg 7260
cgcggccttc cggagcgagg tgtgggtgag cgcaaagggtg tccctgacca tgactttgag 7320
gtactggtat ttgaagttag tgtcgtcgca tccgcctgc tcccagagca aaaagtccgt 7380
gcgctttttg gaacgcggat ttggcagggc gaaggtgaca tcgttgaaga gtatctttcc 7440
cgcgcgaggc ataaagttag gtgtgatgag gaaggtccc ggcacctcgg aacggttgtt 7500
aattacctgg gcggcgagca cgatctcgct aaagccgttg atgttgtggc ccacaatgta 7560
aagttccaag aagcgcggga tgccttgat ggaagcaat tttttaagtt cctcgtaggt 7620
gagctcttca ggggagctga gcccgctgct tgaaggggcc cagtctgcaa ggtatgcctg 7680
ggaagcgacg aatgagctcc acaggtcacg ggccattagc atttgcaggt ggtcgcgaaa 7740
ggtcctaacc tggcgacctg tggccatttt ttctggggtg atgcagtaga aggtaaagcgg 7800
gtcttgttcc cagcggctcc atccaaggtt cgcggctagg tctcgcgcgg cagtactag 7860
aggctcatct ccgccgaact tcatgaccag catgaagggc acgagctgct tccc aaaggc 7920
ccccatccaa gtataggtct ctacatcgta ggtgacaaag agacgctcgg tgcgaggatg 7980
cgagccgatc gggagaact ggatctccc ccaccaattg gaggagtggc tattgatgtg 8040
gtgaaagtag aagtcctgct gcggggccga acactcgtgc tggcttttgt aaaaacgtgc 8100
gcagtactgg cagcggtgca cgggctgtac atcctgcacg aggttgacct gacgaccgag 8160
cacaaggaag cagagtggga atttgagccc ctgcctggc gggtttggct ggtggtcttc 8220
tacttcggct gcttgtcctt gaccgtctgg ctgctcgagg ggagttacgg tggatcggac 8280
caccacgccc cgcgagccca aagtccagat gtccgcgcgc ggcggctcga gcttgatgac 8340
aacatcgcgc agatgggagc tgtccatggt ctggagctcc cgcggcgtca ggtcaggcgg 8400
gagctcctgc aggtttacct cgcatagacg ggtcagggcg cgggtagat ccaggtgata 8460
cctaatttcc aggggctggc tggtggcggc gtcgatggct tgcaagaggc cgcattccc 8520
cggcgcgact acggtaccgc gcggcggggc gtgggcccgc ggggtgtcct tggatgatgc 8580
atctaaaagc ggtgacgcgg gcgagccccc ggaggtaggg ggggctccgg acccgcggg 8640
agagggggca ggggcacgct ggcgcgcgc gcgggcagga gctgggtgctg cgcgcgtagg 8700
ttgctggcga acgcgacgac gcggcggttg atctcctgaa tctggcgcct ctgcgtgaag 8760
acgacgggccc cggtagctt gagcctgaaa gagagttcga cagaatcaat ttcggtgtcg 8820
ttgacggcgg cctggcgcaa aatctcctgc acgtcctctg agttgtcttg ataggcgatc 8880
tcggccatga actgctcgat ctcttctcc tggagatctc cgcgtccggc tcgctcccag 8940
gtggcggcga ggtcgttga aatgcggggc atgagctgcg agaaggcgtt aggcctccc 9000
tcgttccaga cgcggctgta gaccacgccc cttcggcat cgcgggcccgc catgaccacc 9060
tgccgcgagat tgagctccac gtgcccggcg aagacggcgt agtttcgcag gcgctgaaag 9120
aggtagttga ggggtggtggc ggtgtgttct gccacgaaga agtacataac ccagcgtcgc 9180
aacgtggatt cgttgatctc ccccaaggcc tcaaggcgtc ccatggcctc gtagaagtcc 9240
acggcgaagt tgaaaaactg ggagtgcgc gccgacacgg ttaactcctc ctccagaaga 9300
cggatgagct cggcgacagt tccgcgtcaa aggctacagg ggctcttct 9360
tcttcttcaa tctcctcttc cataagggcc tccccttctt cttcttctgg cgcgggtggg 9420
ggagggggga cacggcggcg acgacggcgc accgggaggc ggtcgacaaa gcgctcgatc 9480
atctccccgc ggcgacggcg catggtctcg gtgacggcgc ggccgttctc gcgggggcgc 9540
agttagaaga cgcgccctgt catgtcccgg ttatgggttg gcggggggct gccatgcggc 9600
agggatacgg cgctaacgat gcatctcaac aattgtgtg taggtactcc gccgccgagg 9660
gacctgagcg agtccgcatc gaccggatcg gaaaacctct cgagaaaggc gtctaaccag 9720
tcacagtcgc aaggtaggct gagcaccgtg gcgggcggca gcgggcccgc gtcggggttg 9780
tttctggcgg aggtgctgct gatgatgtaa ttaaagttag cggctctgag acgcgggatg 9840
gtcgacagaa gcaccatgtc cttgggtccg gcctgtgaa tgcgcaggcg gtcggccatg 9900
ccccaggctt cgttttgaca tcggcgcagg tctttgtagt agtcttgcat gagctttct 9960
accggcaact cttcttctcc ttctcttgt cctgcattc ttgcatctat cgtcgcggcg 10020
gcggcggagt ttggccgtag gtggcgcct cttcctcca tgcgtgtgac cccgaagccc 10080
ctcatcggct gaagcagggc taggtcggcg acaacgcgct cggctaatat ggctgctgc 10140
acctgcgtga gggtagactg gaagtcatcc atgtccacaa agcggtggtg tgcgccctg 10200
  
```

ES 2 731 528 T3

	ttgatggtgt	aagtgcagtt	ggccataacg	gaccagttaa	cggtctggtg	acccggctgc	10260
	gagagctcgg	tgtacctgag	acgcgagtaa	gccctcgagt	caaatacgtg	gtcgttgcaa	10320
	gtccgcacca	ggtactggtg	tcccaccaa	aagtgcggcg	gctggctggcg	gtagaggggc	10380
	cagcgtaggg	tggccggggc	tccggggggc	agatcttcca	acataaggcg	atgatataccg	10440
5	tagatgtacc	tggacatcca	ggtgatgccg	gctggcgggtg	tggagggcgcg	cgaaagtgcg	10500
	cggacgcggg	tccagatggt	gctgacggcg	aaaaagtgtc	ccatggtcgg	gacgctctgg	10560
	ccggtcaggg	gcgcgcaatc	gctgacgctc	tagaccgtgc	aaaaggagag	cctgtaagcg	10620
	ggcactcttc	cgtggtctgg	tggataaatt	cgcaagggtg	tcataggcga	cgaccggggg	10680
	tcgagccccg	tatccggccg	tccgcccgtg	tccatgcggt	taccgcccgc	gtgtcgaacc	10740
10	caggtgtgcg	acgtcagaca	acgggggag	gctccttttg	gcttccttcc	aggcgcggcg	10800
	gctgctgctc	tagctttttt	ggccactggc	cgctgcgagc	gtaagcgggt	aggctggaaa	10860
	gctgaaagcat	taagtggctc	gctccctgta	gctggagggg	tattttccaa	gggttgagtc	10920
	gctgggaccca	cggttcgagt	ctcggaccgg	ccggaactgc	gctgaaaggg	gtttgcctcc	10980
	ccggtcaggg	gcaccccgtc	tgcaaatccc	tccggaaca	gggacgagcc	ctttttttgc	11040
15	ttttccaga	tgcacccggt	gctgcccag	atgcgcccc	ctcctcagca	gcggcaagag	11100
	caagagcagc	ggcagacatg	cagggcaccc	tcccctcctc	ctaccgcgct	aggagggggc	11160
	acatccgcgg	ttgacgcggc	agcagatggt	gattacgaac	ccccgcggcg	ccgggcccgg	11220
	cactacctgg	acttgagga	gggagggggc	ctggcgcggc	taggagcggc	ctctcctgag	11280
	cggtaaccaa	gggtgcagct	gaagcgtgat	acgctgaggg	cgtacgtgcc	gcggcagaac	11340
20	ctggttcgcg	accgagggg	agaggagccc	gaggagatgc	gggatcgaaa	gttccacgca	11400
	gggagcagcg	tgcggcatgg	cctgaatcgc	gagcggttgc	tgcgagagga	ggactttgag	11460
	cccgcagggc	gaaccgggat	tagtcccgg	cgctcacacg	tggcggccgc	gcactgggta	11520
	accgcatacg	agcagacggt	gaaccaggag	attaactttc	aaaaaagctt	taacaaccac	11580
	gtgctgacgc	ttgtggcggc	cgaggagggtg	gctataggac	tgatgcatct	gtgggacttt	11640
25	gtaagcgcgc	tggagcaaaa	cccaaatagc	aagccgctca	tggcgcagct	gttccttata	11700
	gtgcagcaca	gcagggacaa	cgaggcattc	agggatgcgc	tgctaaacat	agttagagccc	11760
	gagggccgct	ggctgctcga	tttgataaac	atcctgcaga	gcatagtggg	gcaggagcgc	11820
	agcttgagcc	tggctgacaa	ggtggcccgc	atcaactatt	ccatgcttag	cctgggcaag	11880
	ttttacggcc	gcaagatata	ccatacccct	tacgttccca	tagacaagga	gttaaagatc	11940
30	gaggggttct	acatgcgcat	ggcgtgaaag	gtgcttacct	tgagcgacga	cctgggctgt	12000
	tatcgcaacg	agcgcaccca	caaggccgtg	agcgtgagcc	ggcggcgcga	gctcagcgac	12060
	cgcgagctga	tgcacagcct	gcaaagggcc	ctggctggca	cgggcagcgg	cgatagagag	12120
	gccgagtcct	actttgacgc	gggagcgtg	ctgctgctgg	ccccaaagcc	acgcccctg	12180
	gagggcagctg	gggcccggacc	tgggctggcg	gtggcaccgc	cgctgcgctg	caactgcggc	12240
35	ggcgtggagg	aatatgacga	ggacgatgag	tacgagccag	aggacggcga	gtactaagcg	12300
	gtgatgtttc	tgatcagatg	atgcaagacg	caacggacc	ggcgggtgcg	gcggcgtgc	12360
	agagccagcc	gtccggcctt	aactccacgg	acgactggcg	ccaggtcatg	gaccgcatca	12420
	tgtcgtgac	tgcgcgcaat	cctgacgcgt	tccggcagca	gctgcagggc	aaccggctct	12480
	ccgcaattct	ggaagcgtg	gtcccggcgc	gctgcaaac	cacgcacgag	aagtgctgg	12540
40	cgatcgtaaa	cgctgctggc	gaaaacaggg	ccatccggcc	cgacgaggcc	ggcctgggtc	12600
	acgacgcgct	gcttcagcgc	gtggctcgtt	acaacagcgg	caactgcag	accaacctgg	12660
	accgctgggt	gggggatgtg	cgcgaggccg	tggcgcagcg	tgagcgcgcg	cagcagcagg	12720
	gcaacctggg	tccatggtt	gcactaaacg	cctcctgag	tacacagccc	gccaactgct	12780
	cgcggggaca	ggaggactac	accaactttg	tgagcgcact	gctgctaagt	gtgactgaga	12840
45	caccgcaaag	tgaggtgtac	cagtctgggc	cagactatct	tttccagacc	agttagacaag	12900
	gcctgcagac	cgtaaacctg	agccaggcct	tcaaaaactt	gcaggggctg	tggggggtgc	12960
	gggctcccac	aggcgaccgc	gctgaccgtg	ctagcttgct	gacgccaac	tcgctcctgt	13020
	tgctgctgct	aatagcggcc	ttcacggaca	gtggcagcgt	gtcccgggac	acatacctag	13080
	gtcacttgct	gacactgtac	cgcgaggcca	taggtcaggg	gcatgtggac	gagcatactt	13140
50	tccagggatg	tacaagtgtc	agccgcgcgc	tggggcagga	ggacacgggc	agcctggagg	13200
	caaccctaaa	ctacctgctg	accaaccggc	ggcagaagat	cccctcgttg	cacagtttaa	13260
	acagcgagga	ggagcgcatt	ttgctgctac	tgacgacag	cgtgagcctt	aacctgatgc	13320
	gctgacgggg	aacgcccagc	gtggcgtggt	acatgaccgc	gctgcaacat	gaaccgggca	13380
	tgatgctctc	aaaccggccg	tttatcaacc	gcctaatgga	ctacttgcat	cgctcggccg	13440
55	ccgtgaaccc	cgagtatttc	accaatgcca	tcttgaaccc	gcactggcta	ccgcccctg	13500
	gtttctacac	cgggggattc	gaggtgcccg	agggtaacga	tggattcctc	tgggacgaca	13560
	tagacagacg	cgtgttttcc	cgcaaacgcg	agaccctgct	agagttgcaa	cagcgcgagc	13620
	aggcagaggc	ggcgtgcga	aaggaaagct	tccgcaagcc	aagcagcttg	tccgatctag	13680
	gctgctgctc	cccgcggtca	gatgctagta	gcccatttcc	aagcttgata	gggtctctta	13740
60	ccagcactcg	caccacccgc	ccgctcctgc	tgggagagga	ggagtaccta	aacaactcgc	13800
	tgctgcagcc	gcagcgcgaa	aaaaacctgc	ctccggcatt	tcccaacaac	gggatagaga	13860
	gcctagtggg	caagatgagt	agatggaaga	cgtacgcgca	ggagcacagg	gacgtgccag	13920
	gcccgcgccc	gcccaccctg	cgtcaaaggc	acgaccgtca	gctggggtctg	gtgtgggagg	13980

65

ES 2 731 528 T3

	acgatgactc	ggcagacgac	agcagcgtcc	tggatttggg	agggagtggc	aacccgtttg	14040
	cgcaccttcg	ccccaggctg	gggagaatgt	tttaaaaaaa	aaaaagcatg	atgcaaaata	14100
	aaaaactcac	caaggccatg	gcaccgagcg	ttggttttct	tgtattcccc	ttagtatgcg	14160
	gcgcgcggcg	atgtatgagg	aaggtcctcc	tccctcctac	gagagtgtgg	tgagcgcggc	14220
5	gccagtggcg	gcggcgctgg	gttctccctt	cgatgctccc	ctggaccgcc	cgtttgtgcc	14280
	tccgcggtac	ctgcggccta	ccggggggag	aaacagcatc	cgttactctg	agttggcacc	14340
	cctattcgac	accacccgtg	tgtacctggt	ggacaacaag	tcaacggatg	tggcatccct	14400
	gaactaccag	aacgaccaca	gcaactttct	gaaccaggtc	attcaaaaca	atgactacag	14460
	cccgggggag	gcaagcacac	agaccatcaa	tcttgacgac	cggtcgcact	ggggcggcga	14520
10	cctgaaaacc	atcctgcata	ccaacatgcc	aaatgtgaac	gagttcatgt	ttaccaataa	14580
	gtttaaggcg	cgggtgatgg	tgtcgcgctt	gcctactaag	gacaatcagg	tgagctgaa	14640
	atacgagtgg	gtggagttca	cgctgcccga	gggcaactac	tccgagacca	tgaccataga	14700
	ccttatgaac	aacgcgatcg	tggagcacta	cttgaaagtg	ggcagacaga	acggggttct	14760
	ggaaagcgta	atcggggtaa	agtttgacac	ccgcaacttc	agactggggg	ttgacccctt	14820
15	cactgtcctt	gtcatgcctg	gggtatatac	aaacgaagcc	ttccatccag	acatcatttt	14880
	gctgccagga	tgcggggtgg	acttcaccca	cagccgcctg	agcaacttgt	tgggcatccg	14940
	caagcggcaa	cccttccagg	agggctttag	gatcacctac	gatgatctgg	aggggtgtaa	15000
	cattcccgca	ctggtgatg	tggacgccta	ccaggcgagc	ttgaaagatg	acaccgaaca	15060
20	gggcgggggt	gycgcaggcg	gcagcaacag	cagtggcagc	ggcgcggaag	agaactccaa	15120
	cgcggcagcc	gcggcaatgc	agccggtgga	ggacatgaac	gatcatgcc	ttcgcggcga	15180
	cacctttgcc	acacgggctg	aggagaagcg	cgctgaggcc	gaagcagcgg	ccgaagctgc	15240
	gcgcccgctc	gcgcaaccgc	aggtcgagaa	gcctcagaag	aaaccggtga	tcaaacctct	15300
	cagcagtttt	agcaagaaac	gcagttacaa	cctaataagc	aatgacagca	ccttcaccca	15360
25	gtaccgcagc	tggtagcttg	catacaacta	cggcgaccct	cagaccggaa	tccgctcatg	15420
	gaccctgctt	tgcactcctg	acgtaacctg	cggctcggag	caggtctact	ggtcgttgcc	15480
	agacatgatg	caagaccccg	tgaccttccg	ctccacgcgc	cagatcagca	actttccggt	15540
	ggtgggcgcc	gagctgttgc	ccgtgcactc	caagagcttc	tacaacgacc	aggccgtcta	15600
	ctcccaactc	atccgcccagt	ttacctctct	gaccacagtg	ttcaatcgct	ttcccagaaa	15660
30	ccagattttg	gcgcgcccgc	cagccccccac	catcaccacc	gtcagtgaaa	acgttccctgc	15720
	tctcacagat	cacgggacgc	taccgctgcy	caacagcatc	ggaggagtcc	agcagtgac	15780
	cattactgac	gccagacgcc	gcacctgccc	ctacgtttac	aaggccctgg	gcatagtctc	15840
	gccgcgcgct	ctatcgagcc	gcactttttg	agcaagcatg	tccatcctta	tatcgcccag	15900
	caataacaca	ggctggggcc	tgcgcttccc	aagcaagatg	tttggcgggg	ccaagaagcg	15960
35	ctccgaccaa	cacccagtg	gcgtgcgcgg	gactaccgc	gcgccctggg	gcgcgcacaa	16020
	acgcggccgc	actgggcgca	ccaccgtcga	tgaccgcatc	gacgcggtgg	tggaggaggc	16080
	gcgcaactac	acgcccacgc	cgccaccagt	gtccacagtg	gacgcggcca	ttcagaccgt	16140
	tgacttggca	gcccggcgct	atgctaaaat	gaagcagcgg	cggaggcgcg	tagcagctcg	16200
	ccaccgcccgc	cgaccgggca	ctgccgccc	acgcgcggcg	gcggccctgc	ttaaccgccc	16260
40	acgtcgcacc	ggccgacggg	cggccatgcy	ggccgctcga	aggctggccg	cgggtattgt	16320
	caactgtgcc	cccaggtcca	ggcgacgagc	ggccgcgca	gcagccgagg	ccattagtgc	16380
	tatgactcag	ggtcgcaggg	gcaacgtgta	ttgggtgcgc	gactcgggta	gcggcctgcy	16440
	cgtgcccgctg	cgcacccgcc	ccccgcgcaa	ctagattgca	agaaaaaact	acttagactc	16500
	gtactgttgt	atgtatccag	cggcggcggg	gcgcaacgaa	gctatgtcca	agcgcaaaat	16560
45	caaagaagag	atgctccag	tcatcgcgcc	ggagatctat	ggcccccgca	agaaggaaga	16620
	gcaggattac	aagccccgaa	agctaaagcg	ggtcaaaaag	aaaaagaaaag	atgatgatga	16680
	tgaacttgac	gacgaggtgg	aactgctgca	gcctaccgcy	cccaggcgac	gggtacagtg	16740
	gaaaggtcga	cgcgtaaaac	gtgttttgcg	acccggcaacc	accgtagtct	ttacgcccgg	16800
	tgagcgctcc	acccgcacct	acaagcgcgt	gtatgatgag	gtgtacggcg	acgaggacct	16860
50	gcttgagcag	gccaacgagc	gcctcgggga	gtttgcctac	ggaaagcggc	ataaggacat	16920
	gctggcgctg	ccgctggacg	agggcaaccc	aacacctagc	ctaaagcccc	taacactgca	16980
	gcaggtgctg	cccgcgcttg	caccgtccga	agaaaagcgc	ggcctaaagc	gcgagtctgg	17040
	tgacttggca	cccaccgtgc	agctgatggt	acccaagcgc	cagcgactgg	aagatgtctt	17100
	ggaaaaaatg	accgtggaac	ctgggctgga	gcccagggtc	cgcgtgcggc	caatcaagca	17160
55	ggtggcgccc	ggactgggcy	tgcagaccgt	ggacgttcag	ataccacta	ccagtagcac	17220
	cagtattgcc	accgccacag	agggcatgga	gacacaaacg	tccccggttg	cctcagcggg	17280
	ggcggatgcc	gcggtgcagg	cggctcgtgc	ggccgcgctc	aagacctcta	cggaggtgca	17340
	aacggacccg	tggatgtttc	gcgtttcagc	cccccgggc	ccgcgcggtt	cggaggaagta	17400
	cggcgccgcc	agcgcgctac	tgcccgaata	tgccctacat	ccttccattg	gcctacccc	17460
60	cggctatcgt	ggctacacct	accgccccag	aagcagagca	actaccggac	gccgaaccac	17520
	cactggaacc	cgcgcgccc	gtcgcgctgc	ccagcccgtg	ctggccccga	tttccgtgcy	17580
	caggggtggc	cgcaaggag	gcaggacctc	ggtgctgcca	acagcgcgct	accaccccag	17640
	catcgtttaa	aagccggtct	ttgtggttct	tgacagatag	gccctcacct	gccgcctccg	17700
	tttcccgggtg	ccgggattcc	gaggaagaat	gcaccgtagg	aggggcatgg	ccggccacgg	17760

65

ES 2 731 528 T3

	cctgacgggc	ggcatgcgtc	gtgcgcacca	cggcgggcgg	cgcgcgctgc	accgtcgcat	17820
	gcgcgggcgg	atcctgcccc	tccttattcc	actgatcgcc	gcgcggattg	gcgccgtgcc	17880
	cggaattgca	tccgtggcct	tgcaggcgca	gagacactga	ttaaaaacaa	gttgcatgtg	17940
	gaaaaatcaa	aataaaaagt	ctggactctc	acgctcgctt	ggtcctgtaa	ctatthttgta	18000
5	gaatggaaga	catcaacttt	cgctctctgg	ccccgcgaca	cggtcgcgpc	ccgttcatgg	18060
	gaaactggca	agatatacggc	accagcaata	tgagcgggtg	cgcttcagc	tggggctcgc	18120
	tgtggagcgg	cattaaaaat	ttcggttcca	ccgttaagaa	ctatggcagc	aaggcctgga	18180
	acagcagcac	aggccagatg	ctgagggata	agttgaaaga	gcaaaatttc	caacaaaagg	18240
	tggtagatgg	cctggcctct	ggcattagcg	gggtgggtgga	cctggccaac	caggcagtgc	18300
10	aaaataagat	taacagtaag	cttgatcccc	gccctcccgt	agaggagcct	ccaccggccg	18360
	tggagacagt	gtctccagag	ggcggtggcg	aaaagcgtcc	gcgccccgac	aggggaagaa	18420
	ctctggtgac	gcaaatagac	gagcctccct	cgtacgagga	ggcactaaag	caaggcctgc	18480
	ccaccacccg	tcccatacgcg	cccataggct	ccggagtget	gggccagcac	acaccctgta	18540
	cgctggacct	gcctcccccc	cccgcacacc	agcagaiaacc	tgtgctgcca	ggcccgcctg	18600
15	ccgttggttg	aaccctcctt	agccgcgcgt	agctgcgccc	cgccgccagc	ggctccgcat	18660
	cgttgcgggc	cgtagccagt	ggcaactggc	aaagcacact	gaacagcatc	gtgggtctgg	18720
	gggtgcaatc	cctgaagcgc	cgacgatgct	tctgaatagc	taacgtgtcg	tatgtgtgtc	18780
	atgtatgctg	ccatgtcgcc	gccagaggag	ctgctgagcc	gcccgcgccc	cgctttccaa	18840
	gatggctacc	ccttcgatga	tgccgcagtg	gtcttacctg	cacatctcgg	gccaggacgc	18900
20	ctcggagtac	ctgagccccg	ggctgggtgca	gthtgccccg	gccaccgaga	cgtaacttcag	18960
	cctgaataac	aagthtagaa	acccccaggt	ggcgcctacg	cacgacgtga	ccacagaccg	19020
	gtcccagcgt	ttgacgctgc	ggttcatccc	tgtggaccgt	gaggatactg	cgtactcgta	19080
	caagggcggg	ttcaccctag	ctgtgggtga	taaccgtgtg	ctggacatgg	cttccacgta	19140
	ctttgacatc	cgcgccgctgc	tggacagggg	ccctacttht	aagccctact	ctggcactgc	19200
25	ctacaacgcc	ctggctccca	agggtgcccc	aaatccttgc	gaatgggatg	aagctgctac	19260
	tgtcttgtaa	ataaacctag	aagaagagga	cgatgacaac	gaagacgaag	tagacgagca	19320
	agctgagcag	caaaaaactc	acgtatthtg	gcaggcgcct	tattctggta	taaatattac	19380
	aaaggagggt	attcaaatag	gtgtcgaagg	tcaaacacct	aaatatgccg	ataaaacatt	19440
	tcaacctgaa	cctcaaatag	gagaatctca	gtggtacgaa	actgaaatta	atcatgcagc	19500
30	tgggagagtc	cttaaaaaga	ctaccccaat	gaaacctatg	tacggttcat	atgcaaaacc	19560
	cacaaatgaa	aatggagggc	aaggcattct	tgtaaagcaa	caaaatggaa	agctagaaag	19620
	tcaagtggaa	atgcaattht	tctcaactac	tgaggcgacc	gcaggcaatg	gtgataactt	19680
	gactcctaaa	gtggatthtg	acagtgaaga	tgtagatata	gaaaccccag	acactcatat	19740
	ttcttacctg	cccactatta	aggaaggtaa	ctcacgagaa	ctaatgggccc	aacaatctat	19800
35	gcccacacagg	cctaattaca	ttgctthtag	ggacaattht	attggtctaa	tgtattacaa	19860
	cagcacgggt	aatatgggtg	ttctggcggg	ccaagcatcg	cagttgaaatg	ctgthttaga	19920
	ttgagagagc	agaaacacag	agctthcata	ccagctthtg	cttgattcca	ttggtagatg	19980
	aaccaggtag	thttctatgt	ggaatcaggc	tgttgacagc	tatgatccag	atgthtagaat	20040
	tattgaaaat	catggaactg	aagatgaact	tccaaattac	tgctthccac	tgggagggtg	20100
40	gattaataca	gagactctta	ccaaggtaaa	acctaataca	ggtcaggaaa	atggatggga	20160
	aaaagatgct	acagaattht	cagataaaaa	tgaataaga	gttgaaata	atthtgccat	20220
	ggaaatcaat	ctaaatgcc	acctgtggag	aaatthcctg	tactccaaca	tagcgtgta	20280
	thtgcccagc	aagctaaagt	acagtccctc	caacgtaaaa	atthctgata	acccaaacac	20340
	ctacgactac	atgaacaagc	gagtgggtgg	tcccgggtta	gtggactgct	acatthacct	20400
45	tggagcacgc	tggtcccttg	actatagga	caacgtcaac	ccatthaac	accaccgcaa	20460
	tgtggcctg	cgctaccgct	caatgttgct	gggcaatggt	cgctatgtgc	ccttccacat	20520
	ccagggtgct	cagaagthct	thtgccattaa	aaacctcctt	ctcctgcccg	gctcatcac	20580
	ctacgagtgg	aacttcagga	aggatgthaa	catgthctg	cagagctccc	taggaaatga	20640
	cctaagggtt	gacggagcca	gcattaagtt	tgatagcatt	tgcctthaac	ccaccttctt	20700
50	ccccatggcc	cacaacaccg	cctccacgct	tgaggccatg	cttagaaacg	acaccaacga	20760
	ccagtcctht	aacgactatc	tctccgcgcg	caacatgctc	taccctatac	ccgccaacgc	20820
	taccaacgtg	cccatacca	tcccctcccg	caactggcg	gctthccgcg	gctgggcctt	20880
	caagcgcctt	aagactaagg	aaaccccatc	actgggctcg	ggctacgacc	cttattcac	20940
	ctactctggc	tctataccct	acctagatgg	aacctthtct	ctcaaccaca	cctthtagaa	21000
55	ggtggccatt	acctthgact	cttctgtcag	ctggcctggc	aatgaccgccc	tgctthacccc	21060
	caacgagtht	gaaatthagc	gctcagthga	cggggagggt	tacaacgthg	cccagthgaa	21120
	catgaccaa	gactgthtcc	tgttacaat	gctagctaac	tacaacattg	gctaccaggg	21180
	cttctatctc	ccagagagct	acaaggaccg	catgtactcc	thctthtagaa	acttccagcc	21240
	catgagacgc	caggtggthg	atgatactaa	atacaaggac	taccaacagc	tgggacactc	21300
60	acaccaacac	aacaactctg	gatttgthgg	ctacctthgccc	cccacctgc	gcgaaggaca	21360
	ggcctaccct	gctaacttcc	cctatccgct	tataggcaag	accgcagthg	acagcattac	21420
	ccagaaaaag	thtctthtgcg	atcgcacctt	thggcgcatc	ccatthctcca	gtaactthtat	21480
	gtccatgggc	gcactcacag	acctgggcca	aaactthctc	tacgccaact	ccgcccacgc	21540

65

ES 2 731 528 T3

	gctagacatg	acttttgagg	tggatcccat	ggacgagccc	acccttcttt	atgttttggt	21600
	tgaagtcttt	gacgtggtcc	gtgtgcaccg	gccgcaccgc	ggcgtcatcg	aaaccgtgta	21660
	cctgocgacg	cccttctcgg	ccggcaacgc	cacaacataa	agaagcaagc	aacatcaaca	21720
	acagctgccg	ccatgggctc	cagtgagcag	gaactgaaag	ccattgtcaa	agatcttggg	21780
5	tgtgggcat	attttttggg	cacctatgac	aagcgctttc	caggctttgt	ttctccacac	21840
	aagctcgcct	gcgccatagt	caatacggcc	ggtcgcgaga	ctggggggcgt	acactggatg	21900
	gcctttgcct	ggaacccgca	ctcaaaaaca	tgctacctct	ttgagccctt	tggcttttct	21960
	gaccagcgac	tcaagcaggt	ttaccagttt	gagtacgagt	cactcctgcg	cogtagcgcc	22020
	attgcttctt	cccccgaccg	ctgtataacg	ctgaaaagt	ccacccaaag	cgtacagggg	22080
10	cccaactcgg	ccgcctgtgg	actattctgc	tgcatgtttc	tccacgcctt	tgccaactgg	22140
	ccccaaactc	ccatggatca	caaccccacc	atgaacctta	ttaccggggg	acccaactcc	22200
	atgctcaaca	gtccccaggt	acagcccacc	ctgcgtcgca	accaggaaca	gctctacagc	22260
	ttcctggagc	gccactcgcc	ctacttccgc	agccacagtg	cgcagattag	gagcgcact	22320
	tctttttgtc	acttgaaaaa	catgtaaaaa	taatgtacta	gagacacttt	caataaaggc	22380
15	aaatgctttt	atgtgtacac	tctcgggtga	tattttacc	ccacccttgc	cgtctgcgcc	22440
	gtttaaaaat	caaaggggtt	ctgccgcgca	tcgctatgcg	ccactggcag	ggacacgttg	22500
	cgatactggt	gtttagtgtc	ccacttaaac	tcaggcacia	ccatccgcgg	cagctcggtg	22560
	aagttttcac	tccacaggct	gcgcaccatc	accaacgcgt	ttagcaggtc	gggocccgat	22620
20	atcttgaagt	cgcagttggg	gcctccgccc	tgccgcgcgcg	agttgcgata	cacaggggtg	22680
	cagcactgga	acactatcag	cgccgggtgg	tgcacgctgg	ccagcacgct	cttgtcggag	22740
	atcagatccg	cgtccaggct	ctccgcggtg	ctcagggcga	acggagtcaa	ctttggtagc	22800
	tgcttccca	aaaagggcgc	gtgccaggc	tttgagttgc	actcgcaccg	tagtggcatc	22860
	aaaaggtgac	cgtgcccggg	ctggcggtta	ggatacagcg	cctgcataaa	agccttgatc	22920
	tgcttaaaag	ccacctgagc	ctttgcgcct	tcagagaaga	acatgccgca	agacttgccg	22980
25	gaaaactgat	tggccggaca	ggccgcgctg	tgcacgcagc	accttgcgct	ggtgttgag	23040
	atctgcacca	catttcggcc	ccaccggttc	ttcacgatct	tggccttgct	agactgctcc	23100
	ttcagcgcgc	gctgcccgtt	ttcgctcgtc	acatccattt	caatcacgtg	ctccttattt	23160
	atcataatgc	ttccgtgtag	acacttaagc	tcgccttcga	tctcagcgca	gcggtgcagc	23220
30	cacaacgcgc	agcccgtggg	ctcgtgatgc	ttgtaggtca	cctctgcaaa	cgactgcagg	23280
	taocgctgca	ggaatcgccc	catcatcgct	acaaaggtct	tgttgctggt	gaaggtcagc	23340
	tgcaaccgcg	ggtgctcctc	gttcagccag	gtcttgcata	cggccgcag	agcttccact	23400
	tggtcaggca	gtagttttaa	gttcgccttt	agatcgttat	ccacgtggta	cttgtccatc	23460
	agcgcgcgcg	cagcctccat	gcccttctcc	cacgcagaca	cgatcggcac	actcagcggg	23520
35	ttcatcaccg	taatttcact	ttccgcttog	ctgggctctt	cctcttcctc	ttgogtccgc	23580
	ataccacgcg	ccactgggtc	gtcttcattc	agccgcgcga	ctgtgcgctt	acctcctttg	23640
	ccatgcttga	ttagcaccgg	tgggttgetg	aaaccacca	tttgtagcgc	cacatcttct	23700
	ctttcttctc	cgctgtccac	gattacctct	ggtgatggcg	ggcgtcggg	cttggggagaa	23760
	gggocgtctc	ttttcttctc	gggcgcaatg	gccaaatccg	ccgccgaggt	cgatggccgc	23820
40	gggctgggtg	tgccgcggcac	cagcgcgctc	tgtgatgagt	cttcctcgct	ctcggactcg	23880
	atacgcgcgc	tcacccgctt	ttttgggggc	gcccgggag	gcggcggcga	cggggacggg	23940
	gacgacacgt	cctccatggt	tgggggacgt	cgccgcgcac	cgcgctccgcg	ctcgggggtg	24000
	gtttcgcgct	gctcctcttc	ccgactggcc	atcttcttct	cctataggca	gaaaaagatc	24060
	atggagttag	tcgagaagaa	ggacagccta	accgccccct	ctgagttcgc	caccaccgcc	24120
45	tccaccgatg	ccgccaacgc	gcctaccacc	ttccccgtcg	aggcaccccc	gcttgaggag	24180
	gaggaagtga	ttatcgagca	ggaccagggt	tttgtaagcg	aagacgacga	ggaccgctca	24240
	gtaccaacag	aggataaaaa	gcaagaccag	gacaacgcag	aggcaaacga	ggaacaagtc	24300
	gggcgggggg	acgaaaggca	tggcgactac	ctagatgtgg	gagacgacgt	gctgttgaag	24360
	catctgcagc	gccagtgccg	cattatctgc	gacgcgttgc	aagagcgcag	cgatgtgccc	24420
50	ctcgcctatg	cggatgtcag	ccttgccctac	gaacgccacc	tattctcacc	gcgcgtacct	24480
	cccaaacgcc	aagaaaacgg	cacatgcgag	cccaaccgcg	gcctcaactt	ctaccccgta	24540
	tttgccgtgc	cagaggtgct	tgccacctat	cacatctttt	tccaaaactg	caagataccc	24600
	ctatcctgcc	gtgccaaccg	cagccgagcg	gacaagcagc	tggccttgcg	gcagggcgct	24660
	gtcatacctg	atatcgcttc	gctcaacgaa	gtgccaaaaa	tctttgaggg	tcttggacgc	24720
55	gacgagaagc	gcgcggcaaa	cgctctgcaa	caggaaaaa	gcgaaaatga	aagtcactct	24780
	ggagtgttgg	tggaactcga	gggtgacaac	cgcgccctag	ccgtactaaa	acgcagcatc	24840
	gaggtcacc	actttgccta	ccccggcactt	aacctacccc	ccaaggtcat	gagcacagtc	24900
	atgagtgagc	tgatcgtgcg	ccgtgcgcag	cccctggaga	gggatgcaaa	tttgcaagaa	24960
	caaacagagg	agggcctacc	cgcagttggc	gacgagcagc	tagcgcgctg	gcttcaaacg	25020
60	cgcgagcctg	ccgacttggg	ggagcgaocg	aaactaatga	tggccgcagt	gctcgttacc	25080
	gtggagcttg	agtgcattgca	gcggttcttt	gctgacccgg	agatgcagcg	caagctagag	25140
	gaaacattgc	actacacctt	tcgacagggc	tacgtacgcc	aggcctgcaa	gatctccaac	25200
	gtggagctct	gcaacctggt	ctcctacctt	ggaattttgc	acgaaaaccg	ccttgggcaa	25260
65	aacgtgcttc	attccacgct	caagggcgag	gcgcgcgcgcg	actacgtccg	cgactgcggt	25320

ES 2 731 528 T3

	tacttatttc	tatgctacac	ctggcagacg	gccatgggcg	tttggcagca	gtgcttggag	25380
	gagtgaacc	tcaaggagct	gcagaaactg	ctaaagcaaa	acttgaagga	cctatggacg	25440
	gccttcaacg	agcgctccgt	ggccgcgcac	ctggcggaca	tcatthtccc	cgaacgcctg	25500
5	cttaaaaccc	tgcaacaggg	tctgccagac	ttcaccagtc	aaagcatggt	gcagaacttt	25560
	aggaacttta	tccatagagcg	ctcaggaatc	ttgcccgcga	cctgctgtgc	acttcctagc	25620
	gactttgtgc	ccattaagta	ccgcgaatgc	cctccgcccgc	tttggggcca	ctgctacctt	25680
	ctgcagctag	ccaactacct	tcctaccac	tctgacataa	tggaaagcgt	gagcggtgac	25740
	ggtctactgg	agtgctactg	tcgctgcaac	ctatgcaccc	cgcaaccgctc	cctggtttgc	25800
	aattcgcagc	tgcttaacga	aagtcaaatt	atcggtacct	ttgagctgca	gggtccctcg	25860
10	cctgacgaaa	agtccgcccgc	tccggggttg	aaactcactc	cggggctgtg	gacgtcggct	25920
	taccttcgca	aatttgtacc	tgaggactac	cacgcccacg	agattaggtt	ctacgaagac	25980
	caatcccggc	cgccaaatgc	ggagcttacc	gcctgcgtca	ttaccagggg	ccacattcct	26040
	ggccaattgc	aagccatcaa	caaagcccgc	caagagtthc	tgctacgaaa	gggacggggg	26100
	gtttacttgg	accccagtcg	cggcgaggag	ctcaacccaa	tccccccgce	gccgcagccc	26160
15	tatcagcagc	agcccgggc	ccttgcttc	caggatggca	ccccaaaaga	agctgcagct	26220
	gccgcccgca	cccacggacg	aggaggaata	ctgggacagt	caggcagagg	aggthtttga	26280
	cgaggaggag	gaggacatga	tggaaagactg	ggagagccta	gacgaggaag	cttccgaggt	26340
	cgaagagggtg	tcaagcga	caccgtcacc	ctcggtcgca	ttcccctcgc	ggcgccccca	26400
	gaaatcggca	accggttcca	gcattggctac	aacctccgct	cctcaggcgc	cgccggcact	26460
20	gcccgttcgc	cgaccacaacc	gtagatggga	caccactgga	accagggccg	gtaagtccaa	26520
	gcagccgccc	ccgttagccc	aagagcaaca	acagcgccaa	ggctaccgct	catggcggcg	26580
	gcacaagaac	gccatagttg	cttgcttgca	agactgtggg	ggcaacatct	ccttcgccc	26640
	ccgctttcct	ctctaccatc	acggcgtggc	cttccccctg	aacatcctgc	attactaccg	26700
25	tcatctctac	agcccatact	gcaccggcgg	cagcggcagc	ggcagcaaca	gcagcggcca	26760
	cacagaagca	aaggcgaccg	gatagcaaga	ctctgacaaa	gcccaga	tccacagcgg	26820
	cggcagcagc	aggaggagga	gcgctgcgct	tggcgcccaa	cgaaccgta	tgcaccgcg	26880
	agcttagaaa	caggatthtt	cccactctgt	atgctatatt	tcaacagagc	aggggccaag	26940
	aacaagagct	gaaaataaaa	aacaggtctc	tgcgatccct	caccgcgagc	tgctgtatc	27000
30	acaaaagcga	agatcagctt	cggcgcacgc	tggaaagcgc	ggaggctctc	ttcagtaaat	27060
	actgcgcgct	gactcttaag	gactagtthc	gcgccccttc	tcaaatttaa	ggcgaaaac	27120
	tacgtcatct	ccagcggcca	caccggcgc	cagcacctgt	cgtcagcgc	attatgagca	27180
	aggaaattcc	cacgcccctac	atgtggagtt	accagccaca	aatgggactt	gggctggag	27240
	ctgcccaaga	ctactcaacc	cgaataaact	acatgagcgc	gggaccccac	atgatatccc	27300
35	ggytcaacgg	aatccgcgcc	caccgaaacc	gaattctctt	ggaacaggcg	gctattacca	27360
	ccacacctcg	taataacctt	aatccccgta	gthggcccgc	tgccctggtg	taccaggaaa	27420
	gtcccgctcc	caccactgtg	gtacttccca	gagacgccc	ggccgaagtt	cagatgacta	27480
	actcagggct	gcagcttgcg	ggcggttthc	gctcacaggt	gcggtcgccc	ggcgaggta	27540
	taactcacct	gacaatcaga	ggcgaggta	ttcagctcaa	cgacgagctg	gtgagctcct	27600
40	cgcttggct	ccgtccggac	gggacatttc	agatcggcgg	cgccggccgt	ccttcattca	27660
	cgctcgctca	ggcaatccta	actctgcaga	cctcgtcctc	tgagccgcgc	tctggaggca	27720
	ttggaactct	gcaatttatt	gaggagtttg	tgccatcggg	ctactttaac	cccttctcgg	27780
	gacctcccgg	ccactatccg	gatcaattta	ttcctaactt	tgacgcggta	aaggactcgg	27840
	cggacggcta	cgactgaatg	ttaagtggag	aggcagagca	actgcgcctg	aaacacctgg	27900
45	tccactgtcg	ccgccacaag	tgctttgccc	gcgactccgg	tgagthttgc	tactttgaat	27960
	tgcccggaac	tcatatcgag	ggcccggcgc	acggcgtccg	gcttaccgcc	cagggagagc	28020
	ttgcccgtag	cctgattcgg	gagthtacc	agcgcctcct	gctagttgag	cgggacaggg	28080
	gaccctgtgt	tctcactgtg	atthtgaact	gtcctaacct	tggattacat	caagatcttt	28140
	gttgccatct	ctgtgctgag	tataataaat	acagaaatta	aaatatactg	gggctcctat	28200
50	cgccatcctg	taaacgccac	cgtcttcacc	cgcccaagca	aaccaaggcg	aaccttacct	28260
	ggtactthta	acatctctcc	ctctgtgatt	tacaacagtt	tcaaccaga	cggagtgagt	28320
	ctacgagaga	acctctccga	gctcagctac	tccatcagaa	aaaacaccac	cctccttacc	28380
	tgccgggaac	gtacgagtg	gtcaccggcc	gctgcaccac	acctaccgcc	tgaccgtaaa	28440
	ccagacttht	tccggacaga	cctcaataac	tctgthtacc	agaacaggag	gtgagcttag	28500
55	aaaaccctta	gggtattagg	ccaaaggcgc	agctactgtg	gggtthtga	acaattcaag	28560
	caactctacg	ggctattcta	atthcagtht	ctctagaatc	gggtthggg	thattctctg	28620
	tcttgtgatt	ctctthtattc	thataactaac	gcttctctgc	ctaaaggctg	ccgctgctg	28680
	tgtgcacatt	tgcatthtatt	gtcagcttht	taaacgctgg	ggtcgccacc	caagatgatt	28740
	aggtacataa	tccatagtht	actcaccctt	gcgctcagccc	acggtaccac	ccaaaagggtg	28800
60	gattthtaag	agccagcctg	taatgttaca	ttcgagctg	aagctaatga	gtgcaccact	28860
	cttataaaat	gcaccacaga	acatgaaaag	ctgctthtcc	gccacaaaaa	caaatthggc	28920
	aagtatgctg	thtatgctat	thggcagcca	ggtgacacta	cagagtataa	thttacagtt	28980
	thccagggtg	aaagtataa	aactthtattg	tatactthtcc	catthtattga	aatgtgcgac	29040
	attaccatgt	acatgagcaa	acagtataag	thgtggcccc	cacaaaattg	thtgga	29100

65

ES 2 731 528 T3

actggcactt tctgctgcac tgctatgcta attacagtgc tcgctttggt ctgtacccta 29160
 ctctatatta aatacaaaaag cagacgcagc tttattgagg aaaagaaaat gccttaattt 29220
 actaagttac aaagctaattg tcaccactaa ctgctttact cgctgcttgc aaaacaaatt 29280
 caaaaagtta gcattataat tagaatagga tttaaacccc ccggtcattt cctgctcaat 29340
 5 accattcccc tgaacaattg actctatgtg ggatatgctc cagcgtaca accttgaagt 29400
 caggcttcct ggatgtcagc atctgacttt ggccagcacc tgtcccgcgg atttgttcca 29460
 gtccaactac agcgaccac cctaacagag atgaccaaca caaccaacgc ggccgcccgt 29520
 accggactta catctaccac aaatacacc caagtttctg cctttgtcaa taactgggat 29580
 aacttgggca tgtggtggtt ctccatagcg cttatgtttg tatgccttat tattatgtgg 29640
 10 ctcatctgct gcctaaagcg caaacgcgcc cgaccacca tctatagtcc catcattgtg 29700
 ctacacccaa acaatgatgg aatccataga ttggacggac tgaaacacat gttcttttct 29760
 cttacagtat gattaaatga gacatgattc ctcgagtttt tatattactg acccttgttg 29820
 cgcttttttg tgcgtgctcc acattggctg cgttttctca catogaagta gactgcattc 29880
 cagccttcac agtctatttg ctttacggat ttgtcaccct cagctcatc tgcagctca 29940
 15 tcaactgtgg catcgccttt atccagtgca ttgactgggt ctgtgtgcgc tttgcataatc 30000
 tcagacacca tccccagtac agggacagga ctatagctga gcttcttaga attctttaat 30060
 tatgaaatth actgtgactt ttctgctgat tatttgcacc ctatctgctg tttgttcccc 30120
 gacctccaag cctcaaagac atatatcatg cagattcact cgtatatgga atattccaag 30180
 ttgctacaat gaaaaaagcg atcctttccga agcctgggta tatgcaatca tctctgttat 30240
 20 cgtgttctgc agtaccatct tagccctagc tatatatccc taccttgaca ttggctgaa 30300
 ccgaatagat gccatgaaacc acccaacttt ccccgcgccc gctatgcttc cactgcaaca 30360
 agttgttgcc ggcggctttg tcccagccaa tcagcctcgc cccacttctc ccacccccac 30420
 tgaatcagc tactttaatc taacaggagg agatgactga caccctagat ctgaaatgg 30480
 acggaattat tacagagcag cgcctgctag aaagacgcag ggcagcggcc gagcaacagc 30540
 25 gcatgaatca agagctccaa gacatgggta acttgcacca gtgcaaaagg ggtatctttt 30600
 gtctggtaaa gcaggccaaa gtcacctacg acagtaatac caccggacac cgccttagct 30660
 acaagttgcc aaccaagcgt cagaaattgg tggatcggg gggagaaaag cccattacca 30720
 taactcagca ctcggtagaa accgaaggct gcatcactc accttgtcaa ggacctgagg 30780
 atctctgcac ccttattaag accctgtgcg gtctcaaaga tcttattccc tttactaat 30840
 30 aaaaaaaaaat aataaagcat cacttactta aatcagttg gcaatttct gtccagttta 30900
 ttcagcagca cctccttgcc ctccctccag ctctgggtatt gcagcttctt cctggctgca 30960
 aactttctcc acaatctaaa tggaatgtca gtttctctct gttcctgtcc atccgcaccc 31020
 actatcttca tgttgttgca gatgaagcgc gcaagaccgt ctgaagatac cttcaacccc 31080
 gtgtatccat atgacacgga aaccggctct ccaactgtgc ctttcttag cctcccttt 31140
 35 gtatccccca atgggtttca agagagctcc cctgggggtac tctctttgcg cctatccgaa 31200
 cctctagtta cctccaatgg catgcttgcg ctcaaatgg gcaacggcct ctctctggac 31260
 gaggccggca accttacctc ccaaatgta accactgtga gccacctct caaaaaaacc 31320
 aagtcaaaaca taaacctgga aatatctgca cccctcacag ttacctcaga agccctaact 31380
 gtggctgccc cgcacctct attggtcgcg ggcaacacac tcacctgca atcacaggcc 31440
 40 ccgtaaacgc tgcacgactc acaacttagc attgccacc aaggaccctc cacagtgtca 31500
 gaaggaaagg tagccctgca aacatcagg cccctacca ccaccgatag cagtcacctt 31560
 actatcactg cctcaccccc tctaactact gccactggta gcttgggcat tgacttgaaa 31620
 gagccattt atacacaaaa tggaaaacta ggactaaagt acggggctcc tttgcatgta 31680
 acagacgacc taaacacttt gaccgtagca actggctcag gtgtgactat taataatact 31740
 45 tcttgcaaaa ctaaaagtac tggagccttg ggttttgatt cacaaggcaa tatgcaactt 31800
 aatgtagcag gaggactaag gattgattct caaacacagac gccttatact tgatgttagt 31860
 tatccgtttg atgctcaaaa ccaactaat ctgaactag gacagggccc tctttttata 31920
 aactcagccc acaacttggga tattaactac aacaaaggcc tttacttgtt tacagcttca 31980
 aacaattcca aaaagcttga ggtaacctc agcactgcca aggggttgat gtttgacgct 32040
 50 acagccatag ccattaatgc aggagatggg cttgaatttg gttcacctaa tgcaccaaac 32100
 acaaatcccc tcaaaacaaa aattggccat ggcctagaat ttgattcaaa caaggctatg 32160
 gttcctaaac taggaactgg ccttagtttt gacagcacag gtgccattac agtaggaaac 32220
 aaaaataatg ataagctaac tttgtggacc acaccagctc catctcctaa ctgtagacta 32280
 aatgcagaga aagatgctaa actcactttg gtcttaacaa aatgtggcag tcaataactt 32340
 55 gctcagttt cagttttggc tgttaaaggc agtttggctc caatatctgg aacagttcaa 32400
 agtgctcatc ttattataag atttgacgaa aatggagtgc tactaaacaa ttccttctg 32460
 gaccagaat attggaactt tagaaatgga gatcttactg aaggcacagc ctatacaaac 32520
 gctggtggat ttatgcctaa cctatcagct tatccaaaat ctacggtaa aactgcaaaa 32580
 agtaacattg tcagtcaagt ttacttaaac ggagacaaaa ctaaacctgt aacactaacc 32640
 60 attacactaa accgtacaca ggaacagga gacacaactc caagtgcata ctctatgtca 32700
 ttttcatgg atctgtctgg ccacaactac attaatgaaa ttttgccac atcctcttac 32760
 actttttcag acattgcca agaataaaga atcgtttggt ttatgtttca acgtgtttat 32820
 ttttcaattg cagaaaatth caagtcattt ttcattcagt agtatagccc caccaccaca 32880

ES 2 731 528 T3

	tagcttatac	agatcaccgt	accttaatac	aactcacaga	accctagtat	tcaacctgcc	32940
	acctccctcc	caacacacag	agtacacagt	cctttctccc	cggctggcct	taaaaagcat	33000
	catatcatgg	gtaacagaca	tattccttagg	tgttatattc	cacacggttt	cctgtcgagc	33060
5	caaacgctca	tcagtgatat	taataaactc	cccgggcagc	tcacttaagt	tcatgtcgct	33120
	gtccagctgc	tgagccacag	gctgctgtcc	aacttgccgt	tgcttaacgg	gcgccgaagg	33180
	agaagtccac	gcctacatgg	gggtagagtc	ataatcgtgc	atcaggatag	ggcgggtggtg	33240
	ctgcagcagc	gcgcgaataa	actgctgccg	ccgccgctcc	gtcctgcagg	aatacaacat	33300
	ggcagtggtc	tcctcagcga	tgattcgcac	cgcccgcagc	ataaggcgcc	ttgtcctccg	33360
10	ggcacagcag	cgcaccctga	tctcacttaa	atcagcacag	taactgcagc	acagcaccac	33420
	aatattgttc	aaaatcccac	agtgcaaggc	gctgtatcca	aaagtcatgg	cggtgaccac	33480
	agaaccacag	tggccatcat	accacaagcg	caggtagatt	aaagtggcgag	ccccataaaa	33540
	cacgctggac	ataaacatta	cctcctttgg	catgttgtaa	ttcaccacct	cccggtagca	33600
	tataaacctc	tgattaaaca	tggcgccatc	caccaccatc	ctaaaccagc	tggccaaaac	33660
15	ctgcccgcgg	gctatacact	gcagggaacc	gggactggaa	caatgacagt	ggagagccca	33720
	ggactcgtaa	ccatggatca	tcattgctcgt	catgatatca	atgttggcac	aacacaggca	33780
	cacgtgcata	cacttctca	ggattacaag	ctcctcccgc	gttagaacca	tatcccaggg	33840
	aacaaccat	tctgaatca	gcgtaaatcc	cacactgcag	ggaagacctc	gcacgtaact	33900
	cacgttgtgc	attgtcaaag	tgttacattc	gggcagcagc	ggatgatcct	ccagtatggt	33960
20	agcgcggggt	tctgtctcaa	aaggaggtag	acgatcccta	ctgtacggag	tgcgccgaga	34020
	caaccgagat	cgtgttggtc	gtagtgtcat	gccaaatgga	acgcccagc	tagtcatatt	34080
	tcctgaagca	aaaccaggtg	cgggcgtgac	aaacagatct	gcgtctccgg	tctcgccgct	34140
	tagatcgctc	tgtgtagtag	ttgtagtata	tccactctct	caaagcatcc	aggcgccccc	34200
	tggcttcggg	ttctatgtaa	actccttcat	gcgccgctgc	cctgataaca	tccaccaccg	34260
25	cagaataagc	cacaccacag	caacctacac	attcgttctg	cgagtcacac	acgggaggag	34320
	cgggaagagc	tggaagaacc	atgttttttt	ttttattcca	aaagattatc	caaaacctca	34380
	aatgaagat	ctattaagtg	aacgcgctcc	cctccgggtg	cggtggtcaaa	ctctacagcc	34440
	aaagaacaga	taatggcatt	tgtaaatgt	tgcacaatgg	cttccaaaag	gcaaacggcc	34500
	ctcacgtcca	agtggacgta	aaggctaaac	ccttcagggt	gaatctcctc	tataaacatt	34560
30	ccagcacctt	caaccatgcc	caaataattc	tcattctgcc	accttctcaa	tatatctcta	34620
	tgcaaatccc	gaatattaag	tccggccatt	gtaaaaatct	gctccagagc	gcccaccacc	34680
	ttcagcctca	aatagcgaat	catgattgca	aaaattcagg	ttcctcacag	acctgtataa	34740
	gattcaaaaag	cggaacatta	acaaaaatc	cgcgatcccg	taggtccctt	cgcagggcca	34800
35	gctgaacata	atcgtgcag	tctgcacgga	ccagcgcggc	cacttccccg	ccaggaacca	34860
	tgacaaaaga	accacactg	attatgacac	gcatactcgg	agctatgcta	accagcgtag	34920
	ccccgatgta	agcttgttgc	atgggcggcg	atataaaatg	caaggtgctg	ctcaaaaaat	34980
	caggcaaagc	ctcgcgcaaa	aaagaaaagc	catcgtagtc	atgctcatgc	agataaaggc	35040
	aggtaagctc	cggaaccacc	acagaaaaag	acaccatttt	tctctcaaac	atgtctgagg	35100
40	gtttctgcat	aaacacaaaa	taaaataaca	aaaaaacatt	taaacattag	aagcctgtct	35160
	tacaacagga	aaaacaaccc	ttataagcat	aagacggact	acggccatgc	cggcgtgacc	35220
	gtaaaaaaac	tggtcaccgt	gattaaaaag	caccaccgac	agctcctcgg	tcattgtccg	35280
	agtcataatg	taagactcgg	taaacacatc	aggttgattc	acatcggcca	gtgctaaaaa	35340
	gcgaccgaaa	tagcccgggg	gaatacatac	ccgcaggcgt	agagacaaca	ttacagcccc	35400
45	cataggaggt	ataacaaaat	taataaggaga	gaaaaacaca	taaacacctg	aaaaacctc	35460
	ctgcctaggc	aaaatagcac	cctcccgtc	cagaacaaca	tacagcgctt	ccacagcggc	35520
	agccataaca	gtcagcctta	ccagtaaaaa	agaaaacctt	ttaaaaaac	accactcgac	35580
	acggcaccag	ctcaatcagt	cacagtgtaa	aaaaggccca	agtgcagagc	gagtatatat	35640
	aggactaaaa	aatgacgtaa	cggttaaagt	ccacaaaaaa	caccagaaa	accgcacgcg	35700
50	aacctacgcc	cagaaacgaa	agccaaaaaa	cccacaactt	cctcaaatcg	tcacttccgt	35760
	tttcccacgt	tacgtaactt	cccattttta	gaaaactaca	attcccaca	catacaagtt	35820
	actccgccct	aaaacctacg	tcaccgcgcc	cgttcccacg	ccccgcgcca	cgtcacaac	35880
	tccaccccct	cattatcata	ttggcttcaa	tccaaaataa	ggtatattat	tgatgatg	35938

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Un adenovirus recombinante en el que la proporción de la isoforma E1B-156R aumenta en relación con el nivel en el adenovirus de tipo salvaje equivalente, en el que el adenovirus tiene un efecto oncolítico en una célula cancerosa, y en el que el adenovirus recombinante lleva una mutación en la secuencia del gen E1B del adenovirus y la mutación en el gen E1B es A3216G en donde la numeración es relativa al genoma Ad5 del adenovirus (número de acceso AC_000008.1) (SEQ ID NO: 41) (posición 1503 en el gen E1B (SEQ ID NO: 1)) o una mutación puntual de guanina en una posición equivalente a 3216 en cualquier otro serotipo de adenovirus.
- 10 **2.** El adenovirus recombinante de la reivindicación 1, en el que el adenovirus es adenovirus serotipo Ad5, tal como adenovirus serotipo Ad5 cepa pTG3602.
- 3.** El adenovirus recombinante de cualquier reivindicación precedente, donde el gen E1B tiene la secuencia de polinucleótido de acuerdo con SEQ ID NO: 1.
- 15 **4.** El adenovirus recombinante de cualquier reivindicación precedente, donde:
- (a) la proporción de la isoforma E1B-156R aumenta con relación a la isoforma E1B-496R;
- 20 (b) la proporción de la isoforma E1B-496R disminuye en relación con los niveles de tipo salvaje;
- (c) la proporción de la isoforma E1B-156R aumenta con relación a la isoforma E1B-93R;
- (d) la proporción de la isoforma E1B-156R aumenta con relación a la isoforma E1B-84R; y/o
- (e) la proporción de la isoforma E1B-93R disminuye en relación con los niveles de tipo salvaje.
- 25 **5.** El adenovirus recombinante de cualquier reivindicación precedente, donde la proporción de la isoforma E1B-156R se incrementa en por lo menos 2 veces, 4 veces, 10 veces, 100 veces, 1000 veces o 10.000 veces y/o la proporción de la isoforma E1B-496R se disminuyó al menos 2 veces, 4 veces, 10 veces, 100 veces, 1000 veces o 10.000 veces.
- 30 **6.** El adenovirus recombinante de cualquier reivindicación precedente, donde la proporción de isoformas E1B-156R, E1B-496R, E1B-93R, o E1B-84R se refiere a:
- (a) el nivel de la proteína isoforma que se expresa; y/o
- (b) el nivel del ARNm de la isoforma que se transcribe.
- 35 **7.** El adenovirus recombinante de cualquier reivindicación precedente, donde:
- (a) La isoforma E1B-156R tiene una secuencia de polinucleótidos que tiene al menos un 80% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 2;
- (b) la isoforma E1B-156R tiene una secuencia polipeptídica que tiene al menos un 80% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 3;
- 40 (c) La isoforma E1B-496R tiene una secuencia de polinucleótidos que tiene al menos un 80% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 4;
- (d) la isoforma E1B-496R tiene una secuencia polipeptídica que tiene al menos un 80% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 5;
- 45 (e) la isoforma E1B-93R tiene una secuencia de polinucleótidos que tiene al menos un 80% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 6;
- (f) la isoforma E1B-93R tiene una secuencia polipeptídica que tiene al menos un 80% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 7;
- (g) la isoforma E1B-84R tiene una secuencia de polinucleótidos que tiene al menos un 80% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 8; y/o
- 50 (h) la isoforma E1B-84R tiene una secuencia polipeptídica que tiene al menos un 80% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 9.
- 8.** El adenovirus recombinante de cualquier reivindicación precedente, donde la célula cancerosa es una célula neoplásica.
- 55 **9.** El adenovirus recombinante de cualquier reivindicación precedente, donde el efecto oncolítico medido por:
- (a) infección viral de células;
- 60 (b) la replicación selectiva del genoma viral en células cancerosas que conduce a una lisis celular mediada por virus preferencial en células cancerosas y la liberación de partículas virales para futuros eventos de infección.
- 10.** Un polinucleótido que codifica el adenovirus recombinante de cualquier reivindicación precedente, que es opcionalmente un vector adecuado para la producción de adenovirus en una célula huésped.
- 65 **11.** Una célula huésped aislada que comprende un polinucleótido que codifica el adenovirus recombinante de cualquier

reivindicación precedente.

5 **12.** Un adenovirus recombinante para uso en el tratamiento del cáncer, en el que el adenovirus recombinante se caracteriza porque la proporción de la isoforma E1B-156R aumenta en relación con el nivel en el adenovirus de tipo salvaje equivalente, y en el que el adenovirus tiene un efecto oncolítico en una célula cancerosa.

10 **13.** Una composición que comprende un adenovirus recombinante para uso como agente terapéutico, en donde el adenovirus recombinante se caracteriza porque la proporción de la isoforma E1B-156R aumenta con respecto al nivel en el adenovirus de tipo salvaje equivalente, y en el que el adenovirus tiene un efecto oncolítico en una célula cancerosa.

15 **14.** Una composición que comprende un adenovirus recombinante para uso en el tratamiento de un paciente con cáncer, en donde el adenovirus recombinante se caracteriza porque la proporción de la isoforma E1B-156R se incrementa en relación con el nivel en el adenovirus de tipo salvaje equivalente, y en el que el adenovirus tiene un efecto oncolítico en una célula cancerosa.

20 **15.** Un método para convertir un adenovirus oncolítico mediante la modificación de la secuencia del gen E1B para aumentar el nivel de la isoforma E1B-156R en relación con el nivel en el adenovirus de tipo salvaje equivalente, en donde el gen E1B está mutado a A3216G donde la numeración es relativa al genoma Ad5 de adenovirus (número de acceso AC_000008.1) (SEQ ID NO: 41) (posición 1503 en el gen E1B (SEQ ID NO: 1)) o una mutación de punto de guanina en una posición equivalente a 3216 en cualquier otro serotipo de adenovirus.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

FIGURA 1

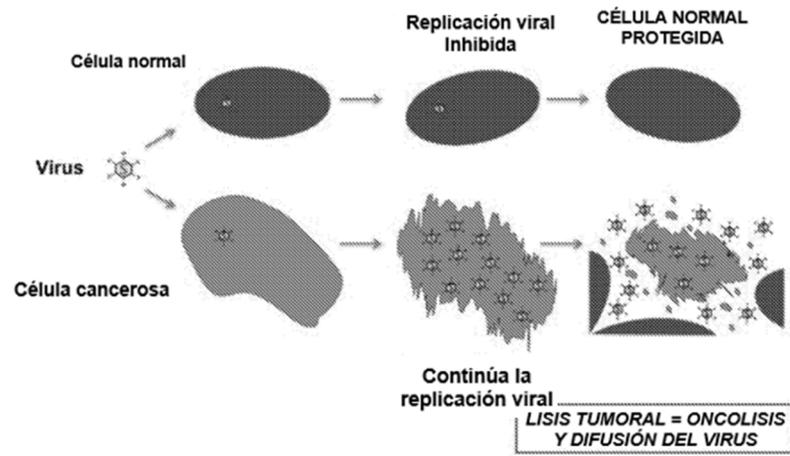


FIGURA 2

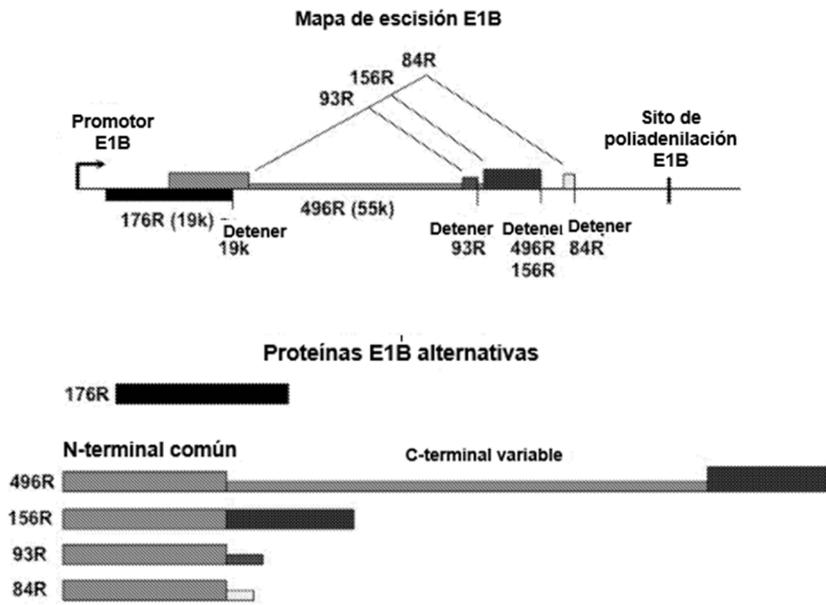


FIGURA 3

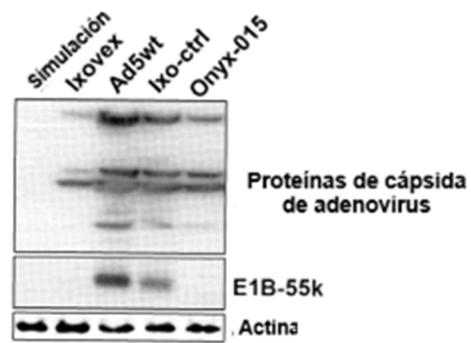


FIGURA 4

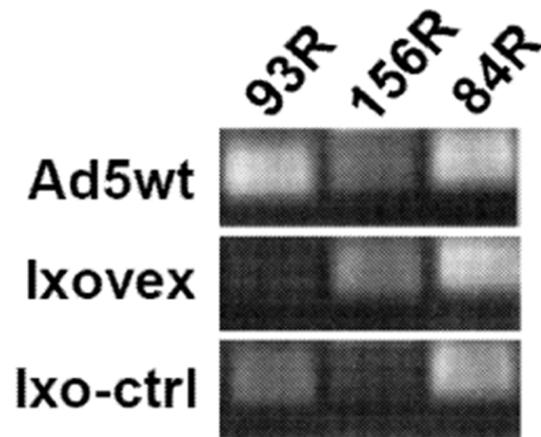


FIGURA 5

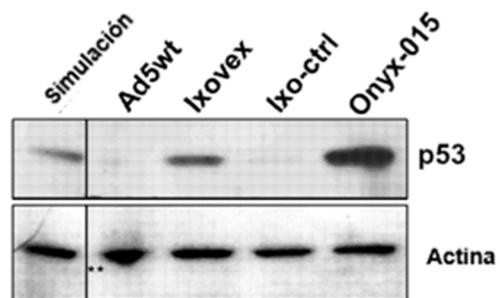


FIGURA 6

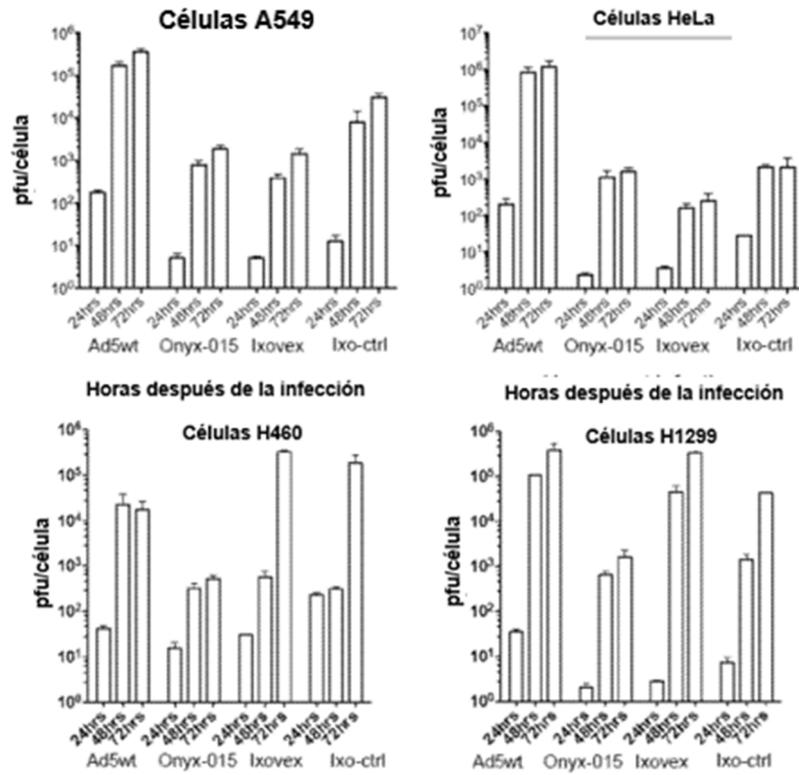
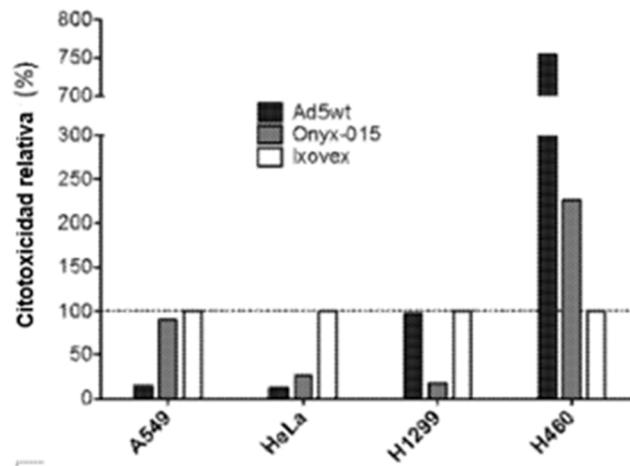


FIGURA 7



	CE50 (pfu/ml)			Citotoxicidad relativa (%)		
	Ad5wt	Onyx-015	Ixovex	Ad5wt	Onyx-015	Ixovex
A549	10	1,7	1,5	15	91	100,00
HeLa	5,9	2,7	0,71	12	26	100,00
H1299	0,40	2,2	0,39	97	17	100,00
H460	34	120	260	750	230	100,00

FIGURA 8

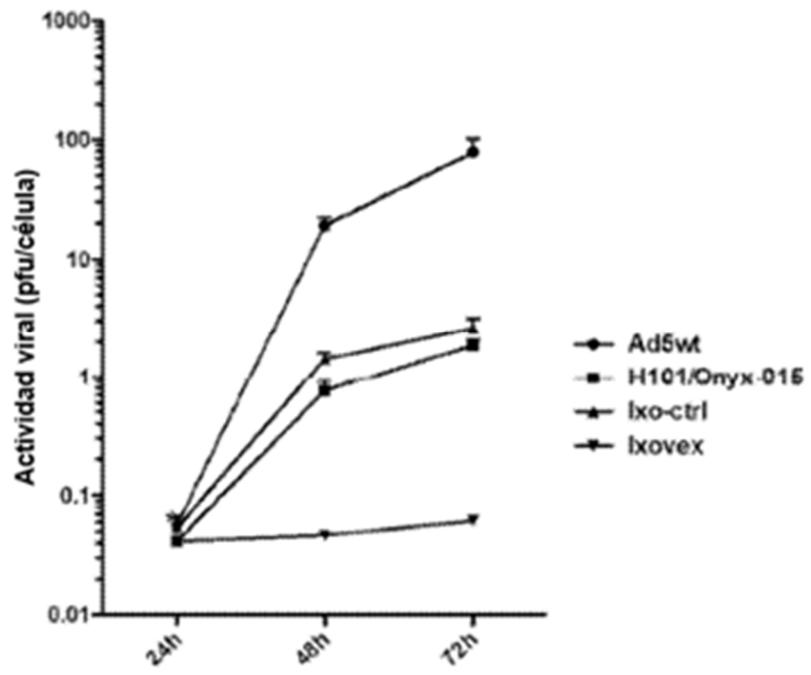


FIGURA 9

Células NHBE	Ad5wt	Onyx-015	Ixo-ctrl	Ixovex
CE50 (pfu/célula)	0,042	0,63	0,031	23
CE50 relativo	535	36	735	1,0

FIGURA 10

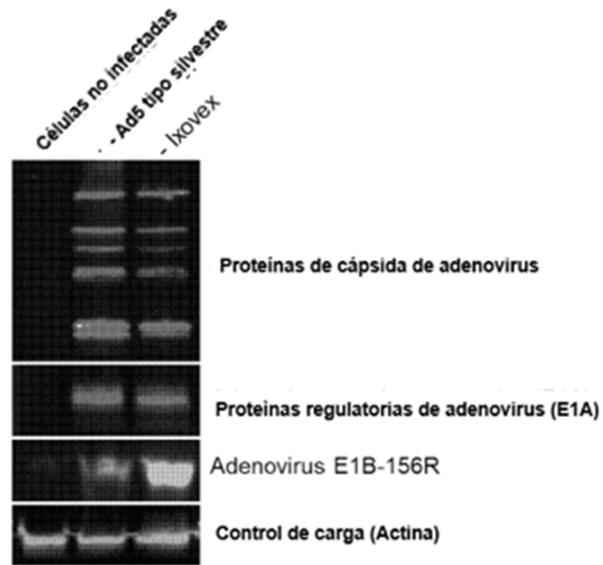


FIGURA 11

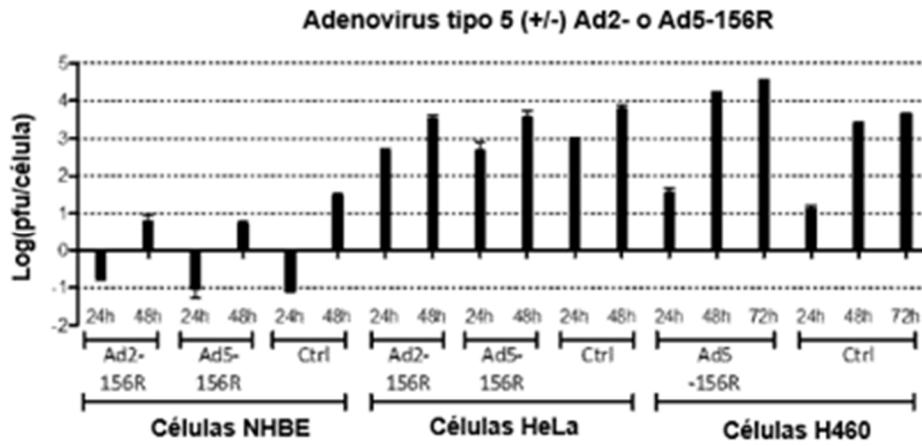


FIGURA 11B

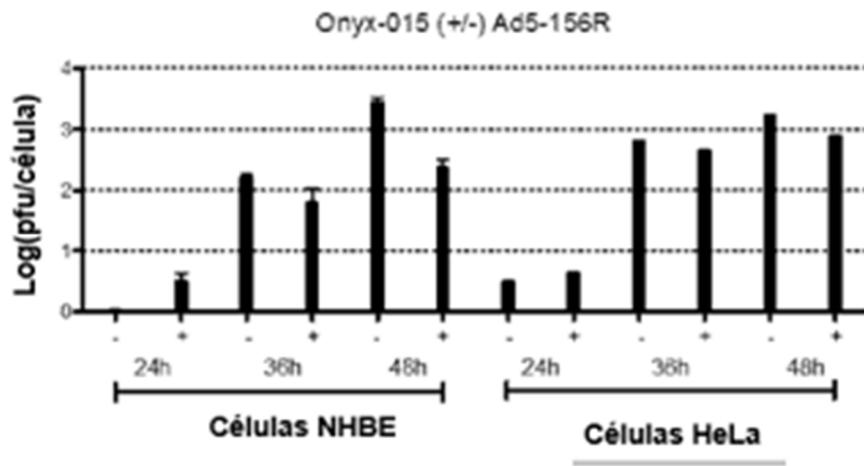


FIGURA 11C

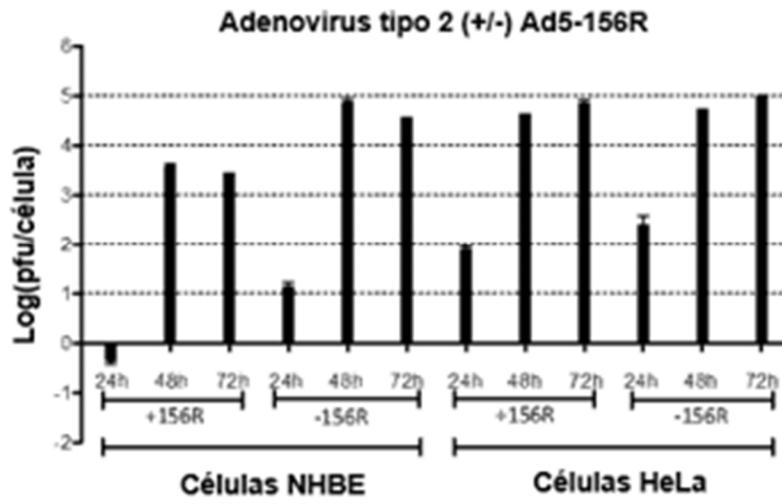


FIGURA 12

Experimento	Capacidad de replicación / pfu/célula				OI
	a	b	c	d	(a/b)/(c/d)
Virus / AdX-156R / Célula cancerosa utilizada / Célula normal utilizada					
Ad5 / Ad5-156R / HeLa / NHBE	3710	5.13	5989	31.0	3.7
Ad5 / Ad5-156R / H460 / NHBE	32662	5.13	4447	31.0	44
Ad5 / Ad2-156R / HeLa / NHBE	3366	6.26	5989	31.0	2.8
ONYX015 / Ad5-156R / HeLa / NHBE	805	242	1715	2835	5.5
Ad2 / Ad5-156R / HeLa / NHBE	39037	3731	50945	73170	15

Donde:

A = Células cancerosas (Hela o H460) + AdX-156R

B = Células normales (NHBE) + AdX-156R

C = Células cancerosas (Hela o H460) + AdX-156R

D = Células normales - AdX-156R

Y el índice oncolítico (OI) = $(OV_{\text{célula cancerosa}}(\mathbf{a}) / OV_{\text{célula normal}}(\mathbf{b})) / (WT_{\text{célula cancerosa}}(\mathbf{c}) / WT_{\text{célula normal}}(\mathbf{d}))$ donde OV es capacidad de replicación de virus oncolítico y WT es capacidad de replicación de virus de tipo silvestre.

FIGURA 13



Campo sombreado: Las similitudes dentro del grupo C. Los huecos indican dónde se difieren.
Subrayado en Ad5: Los aminoácidos que separarían Ad5-156R del otro 156R en la subfamilia C.

FIGURA 14

